

Tesis de Posgrado

Participación del neuropéptido Somatostatina en el sistema nervioso central de ratones genéticamente modificados

Otero Corchón, Verónica

2000

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. 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. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Otero Corchón, Verónica. (2000). Participación del neuropéptido Somatostatina en el sistema nervioso central de ratones genéticamente modificados. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3280_OteroCorchon.pdf

Cita tipo Chicago:

Otero Corchón, Verónica. "Participación del neuropéptido Somatostatina en el sistema nervioso central de ratones genéticamente modificados". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2000.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_3280_OteroCorchon.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ciencias Biológicas

“Participación del Neuropeptido Somatostatina en el Sistema Nervioso Central de Ratonés Genéticamente Modificados”

Autor: Lic. en Ciencias Biológicas Verónica Otero Corchón
FCEyN, Universidad de Buenos Aires

Director: Dr. Marcelo Rubinstein
Profesor Regular Adjunto, Dto. de Cs. Biológicas., FCEyN, UBA
Investigador independiente, Conicet.

Lugar de Trabajo: Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (CONICET).

Tesis presentada para optar al título de Dr. de la Universidad de Buenos Aires

2000

50 2

“Podría decirse que todo acerca de la Somatostatina, inclusive su descubrimiento, fue inesperado”, (Guillemin, 1992).

En su excelente revisión acerca de la historia singular de este neuropéptido, Guillemin opina que para no caer en el debate interminable acerca de la nomenclatura pro-función de otros péptidos biológicamente activos, debería haberse llamado al nuevo péptido serendipina o serendiptina, nombre que sería tan adecuado actualmente como lo hubiera sido hace 20 años (Roger Guillemin, 1992). La palabra mas relacionada que encuentro en el diccionario, *serendipity* se describe como la facultad de encontrar valor en aquellas cosas que no fueron buscadas con tal intención y coincidohubiera sido el nombre mas adecuado porque a 30 años de su descubrimiento nos sigue llenando de sorpresas.

INTRODUCCION

La somatostatina,

1. Reseña histórica de su descubrimiento

El primero de los péptidos hipotalámicos, la hormona liberadora de tirotrófina (TRH) había sido caracterizado en el año 1969 por Roger Guillemin y colaboradores y fue seguido inmediatamente por la caracterización del factor liberador de gonadotrofinas (GnRH) en 1971. Instalados en el nuevísimo laboratorio de neuroendocrinología del Instituto Salk en La Jolla, California, estos investigadores se adentraron en la fisiología de estos factores recientemente descubiertos; y en la búsqueda de aquellos cuyas observaciones fisiológicas implicaban la existencia factores del resto de las hormonas hipotalámicas tales como el de la hormona de crecimiento, el de la corticotrofina o el factor inhibidor de la liberación de prolactina.

En 1972 Paul Brazeau, un postdoctorando recién incorporado al grupo, había sido el encargado del diseño de un radioinmunoensayo (RIA) para la detección de la hormona de crecimiento de rata. El RIA proporcionaría un método mas apropiado para la cuantificación de los efectos producidos por posibles factores hipofisiotrópicos, que no podían medirse con el antiguo y poco sensible, test de la longitud de la tibia. Este test, realizado en la rata, se había utilizado hasta entonces como un sistema in vivo para la cuantificación de los efectos producidos por determinados factores que eran posteriormente evaluados en el crecimiento longitudinal de la tibia.

El método de Paul Brazeau comenzó a utilizarse aplicado a un ensayo biológico basado en la incubación de un cultivo de células hipofisarias disociadas con diferentes extractos hipotalámicos. Los primeros intentos en la búsqueda del factor liberador no funcionaron de acuerdo con las expectativas. El simple cambio del medio de cultivo de las células hipofisarias estimulaba de por si entre un 15 y 20% la secreción basal de GH. Esta estimulación basal fue tomada en cuenta en los cálculos de liberación de GH con los diferentes extractos hipotalámicos. Los primeros resultados no mostraron incrementos en la secreción de GH mas allá de los

esperados para los cambios en el medio de cultivo. Cuando los cultivos de células hipofisarias fueron incubados con extractos hipotalámicos apareció, en cambio, una inhibición de la secreción producida por el cambio de medio donde el aumento de la concentración del extracto estaba correlacionado con una inconfundible disminución en la secreción basal de GH. Esta serie de experimentos fue repetida durante más de un mes y los resultados fueron tan consistentes que, estos investigadores, decidieron con “poco entusiasmo” que deberían investigar qué elemento en los extractos hipotalámicos era el responsable del efecto inhibitorio en la secreción de GH. Con “poco entusiasmo”, menciona Guillemin, ya que las evidencias fisiológicas y experimentales demostraban que la prolactina parecía estar controlada por algún tipo de factor inhibitorio, ninguna evidencia alentaba la presencia de un control hipotalámico inhibitorio en la secreción de GH. La verdad es que, dice Guillemin, habían aparecido dos citas y una nota de Krulich y colaboradores donde se postulaba la existencia de un factor inhibidor de la liberación de GH proveniente del hipotálamo (Kraulich et al., 1969).

Ninguno de los integrantes del grupo de Guillemin se había impresionado con la publicación ya que dudaban, en primer lugar, de la significancia estadística. En segundo lugar y sobre todo, dice Guillemin, porque hablaba de “nuestra incapacidad” para encontrar al esperado factor de liberación de GH.

La actividad responsable de la inhibición de la secreción de GH fue hallada, más tarde, en uno de los extractos hipotalámicos utilizados para la caracterización de GnRH. En los 4 meses siguientes la nueva sustancia fue aislada y secuenciada. La síntesis química de la secuencia peptídica resultó completamente activa en los ensayos biológicos (Ling et al., 1973).

El nuevo péptido de 14 aminoácidos fue llamado somatostatina (SST) debido a su capacidad de funcionar como antagonista fisiológico de la acción somatotrópica de GH. Su utilización fue propuesta con considerable interés clínico como inhibidor de la liberación de GH, útil en el tratamiento de las retinopatías diabéticas, donde se aconsejaba la hipofisectomía, y en

el tratamiento de la acromegalia. La nota describiendo estas primeras observaciones fue publicada en 1973 en la revista Science (Brazeau et al., 1973).

Alícuotas de la forma reducida y oxidada del péptido sintético fueron entregadas a aquellos interesados en estudiar el control hipotalámico de la secreción de GH. En marzo de 1973 Charles Gale en Seattle comunicó que el péptido inhibía marcadamente la secreción de GH. Estos estudios realizados en baboons mostraron además que por la acción de la SST se observaba una alteración en la conducta atribuída a una importante hipoglucemia (Koerker et al., 1974). Días mas tarde sería confirmado que esta hipoglucemia estaba relacionada con una aguda disminución en la concentración plasmática de glucagón e insulina. Yen y colaboradores confirmaron estas observaciones en una serie de estudios clínicos en pacientes acromegálicos (Yen et al., 1973).

Las sorpresas sobre los posibles roles de la SST se fueron multiplicando. La escasa vida media de la somatostatina condujo a los investigadores a dudar acerca del origen hipotalámico de la acción de esta hormona sobre la regulación de la insulina y el glucagon (Vale et al., 1975). Maurice Dubois un fisiólogo en veterinaria, del CNRS de Francia fue el primero en realizar una inmunohistoquímica de páncreas a pedido de Guillemin buscando la fuente que suministrara la SST periférica. Dubois observó que cada una de las células δ del páncreas de rata (de función desconocida hasta entonces) se teñían con el anticuerpo de SST en las todas las secciones del tejido (Dubois et al., 1975). Paralelamente, Rolf Luft y colaboradores, a los que también se les había mandado alícuotas del péptido sintético para trabajar en una serie de estudios clínicos relacionados con la diabetes, llegaron a la conclusión de que los efectos de la somatostatina sobre el glucagon y la insulina no podían deberse al péptido de origen hipotalámico y que debía buscarse una fuente periférica alternativa. También ellos observaron inmunorreactividad positiva en las células δ pancreáticas. De esta forma ese laboratorio fue el primero en publicar el posible papel de la somatostatina en el control fisiológico de la glucemia y la etiología de la diabetes (Hockfelt et al., 1975).

En menos de dos años la SST no sólo había sido descubierta e involucrada en el control hipotalámico de la secreción de GH sino que su presencia en las células δ pancreáticas parecía relacionarla con el control fisiológico de la secreción de insulina y glucagon. Y aún mas, quedaba pendiente el rol del neuropéptido en las restantes áreas del cerebro cuyo origen era de dudosa procedencia hipotalámica .

2. El gen de sst

2.1 Origen evolutivo y unidad transcripcional

Los primeros estudios que permitieron la caracterización del gen de la SST, del precursor completo y del ARN mensajero maduro se realizaron en peces, como el *Lophius americanus* y el bagre. El hallazgo de dos péptidos precursores (somatostatina I y II) sintetizados en el páncreas hizo suponer la existencia de mas de un gen involucrado en la regulación de la actividad hormonal atribuída a la SST (Hobart et al., 1980). Sin embargo, los estudios de las similitudes estructurales y las relaciones filogenéticas entre ambos precursores demostraron que estos genes surgieron por un único evento de duplicación en un ancestro común al bagre; y que esta aparición resultó posterior en la evolución a la divergencia entre peces y mamíferos (Su et al., 1988).

La mayoría de las moléculas que actúan como neurotransmisores y neuropéptidos son filogenéticamente muy antiguas pero, las neuronas específicamente no existieron hasta la evolución de los invertebrados superiores y las glándulas endócrinas, hasta la aparición de los vertebrados. Estos hallazgos lideraron la hipótesis que los sistemas neuronales, endócrinos e inmunes han evolucionado de manera Darwiniana a partir de un neuropéptido ancestral ya presente en los organismos unicelulares (Brown, 1994).

Hoy sabemos que la SST así como otros neuropéptidos provienen de un ancestro común. La SST ha sido encontrada en los organismos unicelulares protozoarios, en plantas (tabaco), en

los invertebrados y por último en muchos tejidos de diferentes especies de vertebrados (Brown, 1994).

Desde el punto de vista evolutivo, los estudios acerca del origen filogenético de la SST coinciden en que tanto la molécula como el o los gen/es han evolucionado desde antes de la aparición de la diferenciación, la especialización y la comunicación celular en los organismos vivos (Reichlin, 1983).

La organización completa del gen de SST de rata y la secuencia de ADN complementario (ADNc) de cerebro fue deducida por el grupo de Richard Goodman y consta de una unidad transcripcional de 2 kilobases que incluye dos exones de 238 (exón 1) y 367 (exón 2) pares de bases (pb) separados por un único intrón de 621 pb (Montminy et al., 1984; Andrisani et al., 1990).

2.2 Control transcripcional del gen de sst

La expresión célula-específica de los genes depende de la interacción entre secuencias de ADN presentes en las cercanías de la unidad transcripcional y factores de transcripción nucleares existentes en un subtipo particular de células. La región ubicada hacia el extremo 5' del sitio de inicio de la transcripción es el promotor y resulta esencial para ensamblar al complejo mayor de transcripción formado por la ARN polimerasa II.

Los promotores de una amplia variedad de genes comparten secuencias consenso como la *TATAA box*, la *CAATbox* y la *CG box* que reconocen factores de transcripción ubicuos. Sin embargo esta región es necesaria pero no suficiente para promover la expresión específica de genes en una determinada subpoblación celular.

Las secuencias de ADN localizadas en *cis* (adyacentes a la unidad transcripcional) son capaces de interactuar con factores nucleares presentes en una subpoblación restringida de células asegurando un patrón de expresión espacial y temporal único para cada gen. La

regulación de los niveles de expresión puede estar además, controlada por otros elementos presentes en la secuencia de ADN de acuerdo a estados fisiológicos celulares.

Las secuencias que controlan los aumentos en la transcripción de un gen son los *enhancers* mientras que las que disminuyen su nivel transcripcional son los *silencers*.

La identificación de los elementos en *cis* que dirigen la expresión célula-específica de los genes eucariotas constituye un valioso aporte no sólo al estudio de las bases moleculares que rigen este tipo de interacciones sino también a los mecanismos que regulan la diferenciación y la especialización celular. Además, estas secuencias reguladoras ha permitido aislar, identificar y caracterizar varios de los factores que participan en los mecanismos que regulan la transcripción.

2.3 Antecedentes en la identificación de elementos de regulación transcripcional del gen de sst

La caracterización de las secuencias de ADN que contienen los elementos en *cis* necesarios para la transcripción de la SST en un grupo particular de neuronas y células endócrinas ha estado limitada a sistemas *in vitro* y de cultivos celulares. Los primeros estudios utilizados para identificar aquellos elementos regulatorios en *cis* del gen de la SST fueron realizados mediante transferencia genética a líneas celulares apropiadas. En estos experimentos se utilizaron genes reporteros como el de la cloranfenicol acetiltransferasa (CAT) puestos bajo el control de las diferentes longitudes del promotor de la SST (SST-CAT) y transfectados a una línea celular de origen paratiroides productora de SST (CA-77). El análisis delecional de 750 pb de la región flanqueante 5' de gen SST demostró que la presencia de un elemento en *cis* localizado entre los nucleótidos -60 y -43 era requerido para la máxima expresión del gen y que las deleciones dentro los nucleótidos -48 y -42 reducían al 9% la actividad del promotor (Andrisani et al. 1987).

Las mismas deleciones introducidas en otra línea celular (PC12) sensible a la regulación por AMP cíclico (AMPC), demostraron que la transcripción a partir del promotor de SST requería un elemento localizado entre -71 y -48 (Montminy et al.,1986) que incluía una

secuencia palindrómica de 8 nucleótidos. La comparación con otros promotores en genes también regulados transcripcionalmente por AMPc permitió proponer a la secuencia TGCATGCA como el elemento CRE por elemento de respuesta a AMPc (*cyclic AMP responsive element*).

La utilización de técnicas de DNase I footprinting y geles de retardo en el promotor de SST confirmó la interacción ADN-proteína sobre el sitio CRE. Utilizando una columna de afinidad con la secuencia específica CRE del promotor de la SST se aisló a partir de extractos nucleares de la línea PC12 una proteína de 43KD que se denominó CREB por proteína de unión al elemento de respuesta a AMPc (Montminy et al., 1987).

El promotor de la SST cumplió, entonces, con un importante papel histórico al permitir la identificación inicial de del sitio CRE y el posterior aislamiento del factor transcripcional CREB.

La expresión célula-específica de un neuropéptido hipotalámico utilizando animales transgénicos ha sido descrita con éxito por primera vez para el gen de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH). En estos estudios se utilizó una construcción de 13.5 kb que contenía el gen completo de GnRH, y secuencias flanqueantes de 5 y 3.5 kb extendidas en sentido 5' y 3' respectivamente (Mason et al., 1986). La idea de la utilización de un gen completo en la construcción de transgenes fue tomada por otros investigadores para el estudio de las secuencias regulatorias evitando así las construcciones con genes de fusión.

Un análisis posterior de las secuencias que controlan la expresión célula-específica de la SST en el hipotálamo se realizó utilizando una construcción que contenía al gen de la SST de ratón, en lugar de utilizar genes reporteros. El diseño de este transgén contaba, además de la unidad transcripcional completa del gen de la SST de ratón, con dos secuencias flanqueantes de 7 y 2 kb en sentido 5' y 3' respectivamente (Rubinstein M et al.,1991). Estos resultados demostraron que las secuencias que regulan la expresión específica de la SST en las neuronas hipotalámicas no estaban contenidas en el fragmento utilizado; pero, que, así como en el caso de

otros neuropéptidos hipotalámico-hipofisarios, estos elementos podrían estar contenidos en secuencias distales del promotor (Young, et al.,1998).

La utilización de un transgén donde las secuencias flanqueantes 5' y 3' provienen de fragmentos de DNA genómico homólogo (de la misma especie) garantiza la compatibilidad de los factores celulares con las “posibles” secuencias regulatorias que se pretenden analizar.

Además, las construcciones que contienen la unidad transcripcional completa del gen cuyas secuencias se quieren estudiar, aseguran la presencia de “potenciales” regiones regulatorias intragénicas que pudieran participar en alguna de las etapas que controlan la expresión del gen.

Varios estudios han propuesto que los cambios en los niveles transcripcionales y secretorios de la SST en el hipotálamo durante el desarrollo, tendrían un papel importante en la maduración de los procesos que conducen a la secreción de GH en la hipófisis (Jansson et al.,1985; Chowen et al.,1996; Leal et al.,1998; Murray et al.,1999; Murray et al.,1999).

El conocimiento de las secuencias que regulan el control transcripcional de la SST en las neuronas del N Pe del hipotálamo, podría esclarecer el papel específico de esta hormona en la regulación del eje hipotalámico-hipofisario.

3. La proteína SST como neuropéptido y neuromodulador

3.1 Procesamiento, secreción y transporte

La secuencia de aminoácidos de la prepro-somatostatina de rata ha sido deducida a partir de tumores secretorios de SST (Reichlin et al.,1986). Así como otros péptidos secretorios, la SST, se sintetiza a partir de una prepro-hormona en el retículo endoplasmático de las neuronas y de las células epiteliales especializadas para su posterior secreción. Más tarde es translocada al aparato de Golgi utilizando una secuencia líder que es escindida de la pro-hormona. Este precursor es procesado enzimáticamente dentro de los gránulos secretorios dando origen a una familia de péptidos relacionados tales como la SST-14 y la SST-28, SST-28 (1-12) y la pro-

somatostatina (pro-S), un péptido de 92 aminoácidos que contiene a la SST-28 en su extremo carboxilo terminal (Hobart et al., 1980; Reichlin et al., 1983; Patel et al., 1986). En algunos casos la pro-hormona existe como tal y es secretada junto con los péptidos maduros biológicamente activos (Zingg et al., 1982).

La SST-14 y SST-28 son las dos formas bioactivas más importantes. Su función es cualitativamente similar pero difieren en la potencia de su actividad biológica, en la afinidad por los distintos receptores y en la abundancia relativa de los distintos tejidos. SST-14, SST-28 y la Pro-S están presentes en los extractos hipotalámicos de rata en una relación molar 15:4:1 y son liberadas desde la eminencia media hacia la hipófisis. De ellas, la SST-28 es la molécula más eficiente en la inhibición de la secreción de GH hipofisaria. La SST-14 es la responsable de las funciones cognitivas de la SST en el sistema nervioso central (Srikant et al., 1981). En el tracto gastrointestinal, SST-14 y SST-28 poseen la misma eficiencia para inhibir la liberación de glucagón de las células α del páncreas, mientras que SST-28, que se expresa en forma mayoritaria, resulta más potente que SST-14 en la inhibición de la secreción de insulina en las células β (Mandarino et al., 1981).

El procesamiento postraduccional de la prepro-somatostatina es un importante sitio de control en la fisiología de la SST ya que cada una de las formas de esta hormona despliega una función diferente según su localización.

En las células epiteliales los gránulos secretorios son translocados junto con el citoesqueleto hacia la membrana plasmática para su secreción mientras que en las neuronas los gránulos se mueven desde los cuerpos celulares hacia los terminales por transporte axonal (Reichlin, 1986).

3.2 Distribución anatómica

Las células productoras de SST son neuronas típicas que pueden ser encontradas en el sistema nervioso central o células de tipo endócrinas presentes en el tracto gastro intestinal (TGI). En todos los sistemas neuronales estudiados la SST está localizada en los gránulos

secretorios de las terminales nerviosas donde es liberada ante un estímulo químico o eléctrico (Reichlin, 1986).

En el sistema nervioso, las neuronas SSTérgicas se localizan en el NPe del hipotálamo, la corteza cerebral, el tallo encefálico, el núcleo reticular del tálamo y el sistema límbico (hipocampo y amígdala) y la médula espinal.

Las funciones neuroendócrinas de la SST son ejercidas a través de la SST proveniente del hipotálamo. Las células SSTérgicas de los núcleos hipotalámicos proyectan sus axones hacia la eminencia media liberando la SST contenida en sus gránulos secretorios a los vasos portales que la comunican con el lóbulo anterior y neural de la hipófisis (Reichlin, 1986).

La presencia de la SST en áreas extrahipotalámicas como la corteza cerebral y el sistema límbico sugiere la participación neuromoduladora del péptido en procesos cognitivos y de memoria (Haroutunian et al., 1987; DeNoble et al., 1989).

Fuera del sistema nervioso la SST está distribuída en las células secretoras del estómago, del intestino delgado, de los islotes de Langerhans pancreáticos, las glándulas salivales y del sistema uro-excretor de algunas especies en los que inhibe la secreción de hormonas y péptidos pancreáticos y digestivos (Reichlin, 1986).

3.3 Distribución de la somatostatina en el sistema nervioso

3.3.1 La somatostatina en el hipotálamo y la corteza cerebral

La mayor cantidad de cuerpos celulares y fibras que contienen SST están localizadas en la parte anterior del núcleo periventricular (NPe) del hipotálamo. Esta capa de 3 a 4 células de espesor corre paralela a la pared del tercer ventrículo y se extiende desde el núcleo preóptico hasta el borde anterior del núcleo ventromedial (NVM). Las células de esta capa son de tamaño mediano (12 a 16 μm de diámetro) y junto con sus axones constituyen el sistema tuberoinfundibular. Otros núcleos del hipotálamo como el paraventricular (PVN), el arcuato

(NArc), el ventromedial (NVM), el supra- y retroquiasmático y la región supramamilar contienen una menor densidad de fibras (Brownstein et al., 1975).

La mayor parte de las proyecciones provenientes del NPe (80%) giran lateralmente hasta el núcleo supraquiasmático y se reorganizan en la parte posterior en un paquete de fibras que se proyecta hacia la eminencia media (EM) recibiendo un pequeño aporte de fibras del núcleo arcuato dorsal. En la eminencia media el contenido de las terminales es liberado al torrente sanguíneo a través de los vasos portales destinados a perfundir la hipófisis: en la hipófisis anterior ejercen el control sobre la liberación de GH y en la neurohipófisis modulan la secreción de oxitocina y vasopresina (Patel et al., 1986).

Un segundo grupo de fibras proveniente del NPe se proyecta, por un lado, dentro del hipotálamo a través de una red de fibras cortas a otros núcleos como el preóptico, el supraquiasmático, el ventromedial, el arcuato y el núcleo ventral premamilar ; y se extiende, por otro, al sistema límbico innervando el tubérculo olfatorio, el septum, la habénula, la amígdala (Am) y el hipocampo (Hip) (Patel et al., 1986).

El último y menos abundante grupo de células dirige sus proyecciones caudalmente hacia el tallo encefálico y la médula espinal (Reichlin, 1983; Patel et al., 1986). En esta región las terminales interdigitan con otras fibras provenientes de nervios sensoriales y las provenientes de un sistema SSTérgico independiente propio de la materia gris de la médula espinal (Reichlin, 1983).

Todas las capas de la corteza cerebral contienen cuerpos celulares de neuronas productoras de SST. Mientras que la concentración de SST en la corteza cerebral resulta ser la mas baja comparativamente con otras áreas del SNC, los dos hemisferios tomados en conjunto contienen la mayor proporción de somatostatina del cerebro. Toda la SST de la corteza cerebral proviene de un sistema intrínseco intraneuronal totalmente independiente del hipotálamo (Reichlin, 1983).

En el sistema límbico, la SST está presente en las células piramidales del CA1 del hipocampo y el giro dentado (GD). Las células piramidales del hipocampo constituyen la vía de comunicación más importante entre la información sensorial proveniente de la corteza cerebral y el hipocampo. El hipocampo recibe y proyecta terminales a otras áreas del cerebro como al Amígdala y el hipotálamo, funcionando como una importante matriz asociativa entre las distintas estructuras cerebrales. Por este motivo, la SST en el hipocampo ha sido considerada como un potencial neuromodulador de los procesos cognitivos.

3.3.2 La somatostatina en el sistema nervioso periférico

En general las fibras de somatostatina que se proyectan desde la periferia hasta el eje neural están involucradas en la mayoría de los sistemas sensoriales incluyendo aquellos sensibles al dolor, tacto, a la temperatura, la visión y el oído.

Los axones se proyectan desde los cuerpos celulares que están en los ganglios sensoriales espinales hasta el asta dorsal de la columna vertebral donde las terminales nerviosas hacen contacto con las terminales nerviosas de otro tipo de neuronas sensoriales y con células productoras de endorfinas. Las conexiones con este tipo de neuronas tienen un importante papel en la transmisión sensorial ya que las endorfinas son capaces de elevar el umbral al dolor (analgesia) (Reichlin, 1983).

Otras células sensoriales que contienen somatostatina están localizadas en el nervio auditivo y en varios niveles del camino visual incluyendo la retina, el nervio óptico y el tectum (Takatsuki et al., 1981; Rorstad et al., 1979; Yamada et al., 1980).

3.4 Distribución de la somatostatina en el tracto gastrointestinal . Páncreas , intestino y estómago

La SST en el páncreas está presente tanto en las llamadas células δ (endócrinas) como en las terminales nerviosas pancreáticas. En humanos las células δ están distribuidas irregularmente junto con otras poblaciones celulares características de estas estructuras del páncreas (células α y β) islotes de Langerhans. Esta íntima asociación con otras poblaciones celulares que tienen receptores para SST le da a este péptido el carácter de regulador parácrino.

La SST contenida en las células epiteliales de la pared estomacal, también llamadas δ , están presentes en el tracto digestivo de todas las especies animales. En los humanos la concentración de estas células disminuye en forma de gradiente desde el estómago hasta el colon. Estas células están localizadas en invaginaciones del epitelio y tienen contacto con el lumen del estómago y del intestino a través de microvellosidades y son las responsables de sensar los cambios en las concentraciones de protones y otros nutrientes, en los contenidos del estómago.

La SST es secretada tanto hacia el espacio intersticial de la pared estomacal como hacia el lumen. En el espacio intersticial las proyecciones de las células δ se extienden liberando su contenido hacia otras células secretoras del epitelio como las de gastrina, glucagon, secretina y colecistoquinina. Mediante este mecanismo de regulación parácrino la SST inhibe la secreción de todos estos péptidos.

4. Receptores de SST (SSTRs)

Las acciones biológicas de la SST se inician con la unión a receptores específicos presentes en la membrana celular (Schonnbun et al., 1978). Todos los receptores de SST (SSTRs) identificados hasta el momento están acoplados a múltiples caminos de señalización intracelular a través de proteínas G. Los receptores de SST inhiben la actividad adenilato ciclasa, reducen la apertura de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, y estimulan la apertura de

canales de K^+ acoplados a proteínas G_o y G_i sensibles a la toxina Pertusis. También estimulan la actividad tirosina fosfatasa (inhibiendo la proliferación celular) e inhiben los intercambiadores Na^+-H^+ a través de vías no sensibles a esta toxina (Reisine et al., 1995).

4.1 Estructura de los receptores de SST

La existencia de receptores funcionales para la SST fue demostrada por primera vez en células GH4C1, una línea celular proveniente de un tumor hipofisario de rata que sintetiza y secreta prolactina y GH (Schonbrun A et al., 1978). Estudios posteriores permitieron identificar la presencia de estos receptores específicos en cerebro, hipófisis, glándulas adrenales, páncreas endócrino y exócrino y el tracto gastrointestinal así como en numerosas líneas celulares (Srikant et al., 1981; Viguerie et al., 1988; Sreedharan et al., 1989).

La primera identificación de dos poblaciones de receptores fue propuesta en base a la actividad biológica diferencial de la SST-14 y la SST-28 en el cerebro, la hipófisis y los islotes pancreáticos (Srikant et al., 1981). Estudios posteriores confirmaron que no existían sólo dos grupos selectivos de unión (SST-14 y SST-28) sino que además, el grupo de la SST-14 podía ser resuelto en varios subtipos (Tran et al., 1985; Reubi et al., 1984). Estos estudios fueron completados mediante el uso de análogos sintéticos de SST como el SMS 201-955, MK 678 y CGP 23996 que permitieron distinguir poblaciones farmacológicamente diferentes de receptores (Reisine et al., 1995).

Los estudios funcionales también alentaron la presencia de varios subtipos de SSTRs. Por un lado la SST-14 y SST-28 disparaban efectos opuestos sobre los canales de K^+ en cultivos neuronales (Wang et al., 1990; Wang et al., 1990) y por otro, la SST-28 era un efector más potente en la inhibición de la secreción de insulina en las células δ pancreáticas (Mandarino et al., 1981; Brown et al., 1977).

El clonado de los receptores de SST fue facilitado por su abundante expresión en las células pancreáticas y por la similitud con miembros de la super familia de receptores acoplados a proteínas G (Reisine et al., 1995). La estrategia utilizada para clonar un nuevo miembro de

estas proteínas de membrana fue la amplificación del fragmento de interés mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y partiendo de ARNm proveniente de los islotes pancreáticos de humano como sustrato de la reacción.

El resultado permitió la identificación de dos receptores, SSTR1 y SSTR2 (Yamada et al., 1992). La identificación de los restantes SSTRs estuvo facilitada gracias a la homología de las secuencias de los diferentes SSTRs y a la ausencia de intrones en las regiones codificantes. Todos los genes relacionados pudieron ser fácilmente identificados utilizando el rastreo de bibliotecas de ADN complementario y sondas pertenecientes a SSTR1 o SSTR2. El éxito en el clonado de los SSTRs fue seguido por el del SSTR1 de rata (Li et al., 1992); el SSTR3 de ratón, rata y humano (Yasuda et al., 1992; Meyerhof et al., 1992; Yamada et al., 1992); el del SSTR4 de rata y humano (Bruno et al., 1992; Rohrer et al., 1993; Demchyshyn et al., 1993) y por último el del SSTR5 de rata y humano (O'Carroll et al., 1992; Panetta et al., 1994).

Con excepción del SSTR2 de ratón que posee un intrón críptico, el resto de los SSTRs carecen de intrones en la secuencia codificante para la proteína y por lo tanto las secuencias del ARN mensajero y del gen en esta región son colineares. La remoción del intrón críptico en el SSTR2, da como resultado dos isoformas SSTR2A y SSTR2B que fueron encontradas en algunos tejidos de ratón y de otras especies (Vanetti et al., 1992).

Los genes de los 5 subtipos de receptores a SST en humanos se encuentran distribuidos en diferentes cromosomas (Yamada et al., 1993; Yasuda et al., 1993; Corness et al., 1993; Demchyshyn et al., 1993). Así como otros miembros de los receptores acoplados a proteína G, los SSTRs, se caracterizan por la presencia de 7 dominios α -hélice transmembrana. La comparación de las secuencias de los diferentes subtipos de distintas especies indica que el SSTR1 es el más conservado con un 97% de identidad entre humanos y roedores, mientras que el SSTR5 es el más divergente de todos con 81% de identidad entre los mismos grupos. La identidad del resto de los integrantes varía según SSTR2, SSTR3 y SSTR4 92, 86 y 89% respectivamente (Reisine et al., 1995).

4.2 Distribución de los SSTRs en el sistema nervioso central y periférico

Tabla 1. Expresión tejido específica relativa de los diferentes SSTRs

CEREBRO	1	2	3	4	5
Corteza	++++	++++	++	++	++
Estriado	+-	+	++	+	++
Hipocampo	++	++	++	++	++
Amígdala	+++++	++	+++	+	++
Bulbo Olfatorio	++	++	++	++	++
Tálamo	++	+	+	+-	++
Hipotálamo	++	++	+	+-	+++++
Area preóptica	+	+	+	+	+++++
Cerebelo	+	+	+++++		
PERIFERIA					
Hipófisis		+++			
Páncreas		+			
Islotes		++++			
Estómago		+			
Intestino delgado		+			
Hígado		-			
Pulmón		-	-		
Riñón		+	+		
Corazón	+	-	+		
Bazo	++	+	++++		
Glándulas adrenales	+	++++	+		

4.2.1 Distribución de los SSTRs en cerebro e hipófisis

Los ARNm para todos los SSTRs están distribuidos en casi todos los tejidos de roedores y humanos y su nivel de expresión es variable según el subtipo, el tejido y la especie. Cada uno

de las isoformas presenta un patrón característico que puede superponerse con el de otras isoformas.

Los 5 subtipos de SSTRs están expresados en el hipotálamo sugiriendo que deberían estar todos involucrados en la función neuroendócrina de la SST en el control de la GH hipofisaria (Kong et al., 1994; Breder et al., 1992; Perez et al., 1994). Las isoformas SSTR1 y SSTR2 son las más abundantes y están expresadas en el núcleo arcuato (NArc) del hipotálamo (Martin et al., 1991; Bertherat et al., 1992; McCarthy et al., 1992).

La importancia de la somatostatina está demostrada por la presencia de SSTR1 y SSTR2 en las células productoras de GHRH en el núcleo arcuato del hipotálamo. Varios estudios realizados, inclusive en ratones mutantes deficientes en SSTR2, han postulado que el control hipotalámico negativo sobre la secreción de GH podría ser ejercido mediante la acción de la SST sobre las neuronas de GHRH (Zheng et al., 1997; Tannenbaum et al., 1998; Bertherat et al., 1992).

Los patrones de expresión de los SSTRs en el sistema nervioso han sido estudiados mediante hibridación *in situ* (Li et al., 1992; Kong et al., 1994; Breder et al., 1992; Perez et al., 1994). Estos estudios mostraron la presencia de los mensajeros de los SSTRs1-4 en la corteza cerebral, el hipocampo, y la amígdala de acuerdo con el rol de la SST en la regulación de las actividades complejas de integración como la locomoción, la memoria y el aprendizaje. La expresión de estos mismos subtipos en la corteza piriforme y olfatoria sugiere, además, el papel de la SST en el procesamiento y la modulación de la información sensorial. Las isoformas SSTR2 y SSTR4 están expresadas en altos niveles en la habénula y las estructuras mesolímbicas del núcleo del rafe que contiene las células productoras de serotonina regulando probablemente la comunicación entre las distintas áreas del cerebro (Kong et al., 1994; Perez et al., 1994).

La SST fue descubierta originalmente en virtud de su acción inhibitoria en la secreción de ciertas hormonas como la GH, la tirotrófina y la prolactina en la hipófisis (Krulich et al., 1968; Brazeau et al., 1973; Vale et al., 1975). Además, la acción inhibitoria de la SST en la secreción de

adenocorticotropina (ACTH) ha sido demostrada utilizando cultivos celulares hipofisarios (Lamberts et al., 1989; Stalla et al., 1994; Richardson et al., 1981). La presencia de SSTRs en cada una de las subpoblaciones celulares hipofisarias (somatotrofos, tirotrofos, corticotrofos y lactotrofos) es una evidencia más en favor de la importancia que ejerce la SST en la fisiología de esta glándula.

En el lóbulo anterior de la hipófisis los diferentes subtipos de SSTRs están presentes en proporciones variables a pesar que todas las isoformas están representadas. El análisis de colocalización por hibridación *in situ* donde se ha marcado por un lado el tipo celular hipofisario (somatotrofos, corticotrofos, gonadotrofos, lactotrofos y tirotrofos) y por otro los distintos subtipos de receptores indica la presencia mayoritaria de SSTR2 y SSTR5. De éstos, el último es el más abundante en todos los tipos celulares. La abundancia relativa de cada una de estas formas para cada tipo celular es variable. Mientras que los somatotrofos, tirotrofos y lactotrofos expresan ambos subtipos, los gonadotrofos y corticotrofos expresan casi exclusivamente SSTR5 (Day et al., 1995; Mezey et al., 1998).

4.2.2 Distribución de los SSTRs en los tejidos periféricos

La mayoría de los tejidos periféricos carecen de la expresión de algunos de los SSTRs o la tienen a muy bajos niveles.

Los islotes pancreáticos de rata también expresan los 5 SSTRs, siendo la más abundante el SSTR2 y el menos abundante y casi ausente el SSTR4. Los estudios inmunocitoquímicos han revelado la coexpresión del SSTR2A y glucagon en las células α del páncreas sugiriendo que esta isoforma del receptor participa en la inhibición de la liberación pancreática de la hormona (Hunyady et al., 1997). Por otra parte, estudios similares demostraron, la colocalización de insulina con el SSTR5 en las células β del páncreas aportando evidencias adicionales del papel regulatorio de la SST en la fisiología del páncreas. (Mitra et al., 1999).

5. Fisiología de la somatostatina

5.1 Aspectos neuroendócrinos: SST y GH

La hormona de crecimiento (GH), somatotropina u hormona somatotrópica es secretada a partir de una subpoblación celular de la hipófisis anterior: los somatotrofos desde donde es liberada a la circulación periférica y hacia el hígado. Allí estimula la liberación de las somatomedinas o factores de crecimiento similares a la insulina (IGFs). Las somatomedinas son las moléculas a través de las cuales GH promueve el crecimiento somático de todas las células del cuerpo como los músculos y los huesos; la diferenciación celular y el metabolismo de lípidos y carbohidratos.

La liberación de GH hipofisaria no es constante sino que es secretada de forma pulsátil o intermitente. La pulsatilidad de GH es sexualmente dimórfica y la intermitencia de su secreción tiene importantes consecuencias en el crecimiento somático diferencial entre machos y hembras y en el hígado (Jansson et al., 1995).

5.1.1 Regulación de GH hipofisaria por SST y GHRH

Las funciones de la hipófisis anterior están reguladas por factores de liberación e inhibición provenientes del hipotálamo. Estos factores están presentes en las terminales de las neuronas cuyo destino final es la eminencia media (EM) del hipotálamo basal. El contenido de estas terminales es liberado al torrente sanguíneo a través de los vasos portales que comunican el hipotálamo con la hipófisis anterior.

La secreción GH está controlada por la acción conjunta de dos neuropéptidos hipotalámicos: SST y GHRH.

Los primeros estudios *in vivo* que mostraron indicios de la presencia de estos factores inhibitorios y estimulatorios fueron realizados mediante lesiones de distintas áreas del hipotálamo.

El núcleo arcuato (NArc) y el núcleo ventro medial (VMN) del hipotálamo contienen una gran cantidad de fibras de GHRH. La destrucción mecánica y las lesiones electrofólicas o farmacológicas en estos núcleos se caracterizan por la disminución en el crecimiento longitudinal (mas pronunciado en los machos), el descenso de los niveles de GH hipofisaria y la ausencia de pulsos en la secreción de GH (Reichlin, 1961; Martin et al., 1974). En cambio, las lesiones en el núcleo periventricular (NPe) o la interrupción de las fibras que proyectan hacia la eminencia media, resultan en incrementos sustanciales en los niveles de GH plasmática y una disminución en los contenidos de SST en la eminencia media (Jansson et al., 1985; Crithlow et al., 1981).

Tanto las células del NPe del hipotálamo (productoras de SST) como las del NArc (productoras de GHRH) contienen receptores para GH. De esta forma, los niveles elevados de GH en el plasma podrían ser censados y regulados por la acción de GH sobre sus receptores localizados en el NPe, estimulando la liberación de SST; y en el NArc, inhibiendo la liberación de GHRH (Burton et al., 1992; Phelps et al., 1993; Hurley et al., 1992).

La liberación de GHRH podría ser, a la vez, modulada por la acción de la SST sobre SSTR1 y SSTR2, en las células del NArc productoras de GHRH (Zhang et al., 1999; Zheng et al., 1997).

La comunicación entre las neuronas productoras de SST en el NPe y las productoras del GHRH en el NArc está demostrada, además, a través de estudios combinados de inmunohistoquímica y microscopía electrónica. Estos estudios confirman la presencia de sinapsis bidireccionales entre los axones del NArc que contienen GHRH y los cuerpos celulares y las dendritas que contienen SST en el NPe del hipotálamo (Horvath et al., 1989).

De esta forma, las neuronas de GHRH y SST que proyectan sus terminales hacia la eminencia media podrían coordinar sus actividades mediante la inervación recíproca en el hipotálamo y regular la posterior secreción de GH en la hipófisis.

5.1.2 Pulsatilidad de la hormona de crecimiento

En todos los mamíferos estudiados los pulsos de liberación de GH ocurren varias veces en el día y son sexualmente dimórficos (Finkelstein et al., 1972; Tannenbaum et al., 1976; Davis et al., 1977). En ratas, los machos generan pulsos con una frecuencia de 3 a 4 horas y en cada pulso de liberación el nivel de GH puede elevarse a varios cientos de ng/ml y descender hasta niveles basales casi indetectables. Por el contrario las hembras tienen un ritmo de secreción más continuo con picos de menor amplitud y niveles basales superiores a los observados en los machos (Saunders et al., 1979; Edén et al., 1979). Las mismas conclusiones pueden obtenerse de los estudios realizados en ratón.

Para realizar estos estudios, los ratones fueron canulados con un sistema que permite su libre movimiento minimizando así los efectos potenciales del estrés en la medición de GH plasmática. Las muestras de sangre fueron colectadas cada 15 minutos por 8 horas consecutivas. Los resultados de estos experimentos mostraron que el patrón secretorio de la hormona de crecimiento es, en el ratón, también, sexualmente dimórfico. Así como se había observado en las ratas, en los machos los pulsos de liberación se producen en ciclos repetidos con una periodicidad de 3 o 4 horas. Las concentraciones plasmáticas llegan a su pico máximo de 200 pg/ μ l para luego caer a niveles basales que se encuentran al límite de la sensibilidad del ensayo (1 a 2 pg/ μ l) donde permanecen por el lapso de 2 horas. En cambio, en el patrón secretorio de las hembras, el intervalo entre los picos de máxima concentración está reducido en un 50% (51 min.) respecto del de los machos (2 horas), indicando la presencia de pulsos más frecuentes. A diferencia del patrón secretorio de las ratas, los niveles basales de las hembras son semejantes a los de los machos. Por otro parte, la concentración media de GH plasmática en las hembras es mayor que en los machos a pesar de que la amplitud, el ancho, y el área contenida debajo de los picos se mantienen invariables entre los sexos (McLeod et al., 1991).

5.1.3 La pulsatilidad y el dimorfismo sexual

A pesar que los patrones en la secreción de GH son sexualmente dimórficos esta diferencias no se hacen evidentes hasta la adultez. Uno de los fenómenos fisiológicos que evidencian el dimorfismo sexual es el crecimiento. En el momento de la aparición de la pubertad los machos comienzan a crecer mas velozmente que las hembras y esta diferencia es debida, al menos en parte, a las diferencias de los patrones secretorios en la pulsatilidad de GH (Edén et al., 1979; Jansson et al., 1985).

Varios estudios han demostrado que los pulsos de liberación poco frecuentes separados por niveles extremadamente bajos de GH plasmática promueven el crecimiento (aumento de peso y longitud de los huesos) de forma mas eficiente que niveles constantes de la hormona en el plasma (Thorngren et al., 1977; Jansson et al., 1985).

Las características pulsátiles de GH pueden ser explicadas en el marco de la influencia de los esteroides sexuales durante el desarrollo embrionario y la adultez. La presencia de esteroides gonadales y la de sus receptores difieren tanto en la etapa embrionaria como después de la pubertad. De esta forma las estructuras anatómicas sexualmente dimórficas se desarrollan naturalmente en el sistema nervioso central y son moduladas por la presencia de los esteroides gonadales (Chowen et al., 1983; Chowen et al., 1996).

Los experimentos realizados en ausencia de esteroides sexuales durante la etapa embrionaria, adulta o en una combinación de ambas demostraron la importancia de la testosterona y el estradiol en el crecimiento, un parámetro indicador del patrón de secreción de GH.

La tasa de crecimiento de los machos que fueron gonadectomizados durante la etapa embrionaria no mostraba diferencias con la de las hembras y podía ser totalmente restablecida a valores normales mediante la administración exógena de testosterona en el desarrollo; pero sólo parcialmente si eran administrados en la adultez. Los machos que fueron gonadectomizados después de la pubertad y posteriormente tratados con dosis suprafisiológicas de testosterona no

tuvieron alteraciones en el crecimiento (Jansson et al., 1985; Chowen et al., 1996; Argente et al., 1993).

Las hembras ovariectomizadas que recibieron tratamientos con testosterona durante el desarrollo o en la etapa adulta demostraron un leve aumento en la tasa de crecimiento con respecto a las hembras que no habían sido ovariectomizadas. Mientras que las hembras que recibieron el tratamiento en ambas etapas aumentaron su tasa de crecimiento a niveles similares a los de los machos (Chowen et al., 1996; Argente et al., 1993).

Los tratamientos con estradiol en las hembras, no modifican su normal crecimiento, mientras que los efectos sobre los machos durante la pubertad feminizan el crecimiento elevando los niveles basales de la hormona y aumentando la frecuencia de los pulsos en determinados casos (Chowen et al., 1996; Argente et al., 1993; Painson et al., 1992).

Esta serie de experimentos ha conducido a la idea que a exposición de un cerebro en desarrollo a esteroides gonadales (*imprinting*), como la testosterona, durante el período embrionario resulta en cambios morfológicos permanentes que determinan el establecimiento del dimorfismo sexual en el cerebro (Chowen et al., 1989). Estas diferencias morfológicas en el SNC son traducidas después de la experiencia gonadal a diferencias en la fisiología de determinadas funciones (Leal et al., 1998; Jansson et al., 1985; Chowen et al., 1996; Rhodes et al., 1999).

Con el objeto de discriminar las diferencias morfológicas entre los sexos de las que provienen de la fisiología de la función se ha convenido en atribuir a las primeras el término de “dimorfismo sexual” y a las últimas el de “diérgismo sexual” (Rhodes et al., 1999).

Además del dimorfismo sexual encontrado en el tamaño y número de neuronas de los distintos núcleos cerebrales, la expresión de varios genes que controlan la biosíntesis de neurotransmisores y la interacción con distintos receptores son, también, sexualmente diérgicas (Leal et al., 1998; Jansson et al., 1985, Rhodes et al., 1999).

La SST y GHRH pueden ser reguladas por esteroides sexuales durante la etapa embrionaria y adulta; y por este motivo han sido considerados potencialmente importantes en la

organización final del patrón secretorio de la hormona de crecimiento (Argente et al., 1993; Chowen et al., 1993). Los estudios sobre la presencia de receptores a andrógenos (AR) en el hipotálamo muestran que, en los machos, el 60% de las células que producen somatostatina coexpresan estos receptores en el núcleo periventricular del hipotálamo mientras que muy pocas células los expresan en las hembras (Chowen et al., 1989). La expresión de los receptores a estrógenos en el hipotálamo no está tan bien caracterizada (Herbison et al.,Herbison et al., 1993). Su influencia ha sido demostrada por el hecho que los estrógenos son capaces de inducir receptores de prolactina en las membranas de las células hepáticas, un hecho relacionado con pulsos mas frecuentes de GH (Posner et al., 1975). Por otra parte, la exposición de los machos a los estrógenos durante la etapa adulta altera el patrón de los pulsos de secreción de GH así como la tasa de crecimiento somático, sugiriendo que la importancia fisiológica de los esteroides gonadales en el control de los ritmos de GH no está limitada sólo al momento del *imprinting* en la etapa embrionaria (Painson et al., 1992). La presencia de receptores a estrógenos y a andrógenos en la hipófisis y el hipotálamo basal también fortalecen la hipótesis del rol de los esteroides gonadales sobre en la determinación de la patrón secretorio de GH (Worsted et al., 1982; Herbert et al., 1983).

Numerosas líneas de estudio investigaron la posibilidad que las diferencias en el patrón de liberación de GH en los machos y en las hembras, fueran consecuencia de dimorfismo sexual en la neuronas del hipotálamo que controlan su secreción. Los estudios de hibridaciones *in situ* e inmunohistoquímica revelaron que, efectivamente, existe un dimorfismo sexual en la expresión de GHRH y SST. Tanto el número de neuronas, de GHRH en el núcleo arcuato y de SST en el núcleo periventricular, como su capacidad de producir ARN mensajero y proteína, estaban aumentadas en los machos (Leal et al., 1998). En las hembras, en cambio, los niveles de ambos neuropéptidos permanecen relativamente constantes a través del desarrollo (Nurhidayat et al., 1999; Argente et al., 1993; Painson et al., 1991).

Los efectos de la SST no pueden ser sólo evaluados por presencia o ausencia de la hormona en sus sitios de influencia sino en el entorno de la interacción con sus receptores (SSTRs). Varias líneas de investigación apoyan la idea que la presencia de SSTRs tanto en la hipófisis como en el núcleo arcuato del hipotálamo proveería el nexo necesario entre las neuronas de SST y GHRH, para concertar el control hipotalámico de la secreción de GH. Por un lado, la expresión de los receptores SSTR1 y SSTR2 es sexualmente dimórfica en las neuronas del arcuato y de la hipófisis lo que sugiere un rol diferencial de las isoformas en la regulación de la secreción de GH (Zhang et al., 1999; Tannenbaum et al., 1998; Bertherat et al., 1992). Por otro lado, los niveles de ARN mensajero de los SSTRs pueden ser regulados por la acción de los estrógenos (Kimura et al., 1998).

Todas estas observaciones aportan evidencias cada vez más sólidas sobre la participación de la SST en el establecimiento de los ritmos de secreción que generan las diferencias sexuales y su relación con el *imprinting* producido por los esteroides gonadales.

La utilización de nuevos modelos de estudio que incluyan una ablación total de la SST en el hipotálamo y sus áreas de influencia permitirían determinar con más precisión de que forma la hormona participa en el control hipotalámico que rige los patrones de secreción de GH hipofisaria.

5.1.4 La pulsatilidad y sus efectos en el hígado

En 1958 Yates describió el papel de los andrógenos en la regulación del metabolismo de algunos esteroides producidos en el hígado, las enzimas citocromo p450 oxidasas (Yates et al., 1958). Estas enzimas pertenecen a un subgrupo de las enzimas microsomales que catalizan la hidroxilación de los esteroides en determinadas posiciones. En estos estudios los machos gonadectomizados mostraban un aumento en la actividad de algunas enzimas, normalmente más activas en las hembras, que participan en la modificación de esteroides. Estos niveles podían ser revertidos a los encontrados en los machos en condiciones normales mediante el tratamiento con

testosterona, sugiriendo que la testosterona podría actuar sobre receptores hepáticos induciendo o reprimiendo la actividad de estas enzimas. La ausencia de receptores de andrógenos en el hígado condujo a los investigadores a dudar sobre el efecto directo de los esteroides gonadales sobre el hígado. Por otra parte, las hipofisectomías tanto de los machos como de las hembras suprimían las diferencias sexuales observadas en la actividad de las citocromo p450 oxidasas sugiriendo el rol esencial de la hipófisis como mediadora en el control de la actividad de las enzimas hepáticas (Denef et al., 1974; Gustafsson et al., 1983). El tratamiento de los machos con estrógenos también estaba acompañado por un cambio en la actividad de estas enzimas indicando que el *imprinting* neonatal podía ser revertido, aún en los machos adultos, por los estrógenos (Stenberg 1975....; Denef et al., 1969).

Estos estudios concluyeron la existencia un mecanismo de control de las hormonas sexuales sobre el metabolismo de los esteroides cuyos efectos no estaban ejercidos directamente sobre el hígado sino sobre la hipófisis (Gustafsson et al., 1983).

De las hormonas hipofisarias que se testearon en la búsqueda del supuesto “factor feminizante” la hormona de crecimiento demostró ser la responsable del mantenimiento del tipo femenino en el metabolismo de los esteroides de la rata. Los experimentos realizados con inyecciones de GH a intervalos de tiempo frecuentes (simulando el patrón de secreción de las hembras) mostraron que existía una feminización en la expresión de las enzimas responsables de la modificación de los esteroides sexuales (Gustafsson et al., 1983).

Así como en el crecimiento corporal, las diferencias en el ritmo secretorio de la hormona de crecimiento también tienen profundos efectos en el hígado, el tejido blanco mas importante de la hormona de crecimiento.

El hígado es un tejido sexualmente diferenciado y estas diferencias pueden observarse en varias de sus funciones como la actividad de ciertas enzimas metabolizadoras de esteroides y xenobióticos (citocromo oxidasas y toxinas), en la concentración de proteínas que unen

esteroides y receptores hormonales (receptores de prolactina), y en la producción de ciertas proteínas del plasma (proteínas mayoritarias de la orina).

Las enzimas Citocromo p450 tienen un papel fisiológico importante en la modificación de hormonas esteroideas endógenas y proveen el nexo que vincula la experiencia gonadal durante el desarrollo embrionario y el origen del dimorfismo sexual. Los análisis provenientes de estudios realizados en varias cepas de ratas y de ratones demuestran: que los sustratos utilizados en las rutas metabólicas de los esteroides no son todos modificados con la misma eficiencia en las diferentes cepas; que la proporción de la actividad enzimática entre hembras y machos varía según los sustratos; que las diferencias observadas entre machos y hembras se hacen evidentes recién en la pubertad (los animales inmaduros de ambos sexos tienen idénticos perfiles en la actividad de estas enzimas) y por último; que las distintas formas de una misma enzima que participa en la ruta de los esteroides puede ser dominante en las hembras o los machos dependiendo de la cepa (Pasleau et al., 1984). Estas diferencias han sido herramientas muy útiles para demostrar que además del control hormonal, los factores genéticos también afectan la expresión de estas enzimas (Pasleau et al., 1984).

El ritmo en la secreción de GH, que controla las diferencias en el metabolismo de los esteroides, es también importante en otros sistemas como el de la regulación de las proteínas mayoritarias de la orina (MUPs). Estas proteínas no tienen, hasta el momento, una función conocida y son sintetizadas en el hígado, además de otros tejidos, en respuesta a una serie de estímulos hormonales como los andrógenos, la hormona de crecimiento, los glucocorticoides y la tiroxina. Las MUPs constituyen entre el 1 y 2% del ARN mensajero total del hígado desde donde son secretadas al plasma y liberadas más tarde abundantemente en la orina de los machos. Así como las citocromo oxidases, su patrón de secreción depende del modo de administración de la hormona de crecimiento. En las hembras donde la secreción de GH tiene un ritmo constante, se expresan en muy bajas cantidades, a diferencia de los machos cuyos pulsos de liberación son más definidos (Hussman et al., 1985; Shahan et al., 1987)

Por último, los receptores de prolactina, están presentes en el hígado y son mas abundantes en las hembras que en los machos en el momento de la pubertad. Las ratas hipofectomizadas reducen los niveles de Pro R y pueden revertir a sus valores normales mediante el tratamiento con GH. De la misma forma la inducción de los receptores de prolactina puede hacerse en los machos mediante las inyección continua de GH (Norstedt et al., 1987).

La regulación de la expresión de estas proteínas expresadas en el hígado ha sido estudiada en diferentes modelos de ratones aprovechando la existencia de cepas deficientes y que expresan constitutivamente GH. La exposición crónica a GH ha sido evaluada en cepas que producen constitutivamente GH y en cepas deficientes (*little*) en las que se ha mimetizado una presencia constante de GH plasmática mediante el agregado exógeno de la hormona. Este modelo de exposición crónica conduce a un hígado feminizado que se caracteriza por la expresión elevada de receptores de prolactina (ProR) y disminuida de las proteínas del plasma (MUPs). Mientras que la administración transiente de la hormona de crecimiento a cepas deficientes (*little*) masculiniza la expresión de estos genes elevando los niveles de las proteínas mayoritarias del plasma (MUPs) y disminuyendo los de receptores de prolactina (Norstedt et al., 1984). Las evidencias que provienen de los estudios realizados con tumores hipofisarios ectópicos que sobreproducían hormona de crecimiento (Lamartiniere, 1985), también revelaron una feminización de estas proteínas del hígado.

El papel de la hormona de crecimiento en la regulación de estas enzimas y proteínas hace suponer, la potencial intervención de los neuropéptidos hipotalámicos que controlan su secreción. Varias observaciones muestran a la somatostatina como la responsable, al menos en parte, de mediar la expresión y la actividad de estas proteínas del hígado a través de su participación en el patrón secretorio de la hormona de crecimiento. Las evidencias que apoyan esta idea son por un lado, las lesiones electrofíticas en el hipotálamo anterior, donde se destruyen, en los machos, las neuronas productoras de SST del núcleo periventricular y la eminencia media y que resultan en un patrón de expresión alterado de algunas de las enzimas que

participan del metabolismo de esteroides hepáticos (Gustafsson et al., 1975). Por otro lado, el bloqueo de la somatostatina *in vivo* mediante la utilización de anticuerpos, también produjo una marcada feminización del hígado en el análisis de la expresión de los receptores de prolactina en los machos tratados con el antisuero (Norstedt et al., 1983)

La pulsatilidad de la hormona de crecimiento ha puesto en evidencia el problema de las determinaciones plasmáticas de GH en el modelo de ratón. La correlación entre la forma de administración de la hormona de crecimiento y la expresión de estas proteínas puede ser utilizada como un marcador indirecto de la pulsatilidad en el estudio de la posible intervención de péptidos que intervienen en el patrón de secreción de GH. Por otro lado, los estudios de lesión en núcleos hipotalámicos y la inmunización pasiva con anticuerpos anti-SST sugieren a la SST como el péptido que podría participar como nexo entre el patrón de secreción de la hormona de crecimiento y regulación de la expresión de proteínas sexualmente dimórficas.

5.2 La somatostatina y el eje hipotalámico hipofisario adrenal

El centro del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA) está constituido por un grupo de neuronas ubicadas dentro del núcleo paraventricular (PVN) del hipotálamo quienes expresan el factor liberador de corticotrofinas (CRH o CRF). Estas neuronas envían proyecciones hacia el plexo portal hipotalámico en la EM. Los sitios de expresión central de CRH incluyen además del hipotálamo, la corteza (Cx), el sistema límbico (Hipocampo), el cerebelo y la médula espinal. Esto explica la gran variedad de efectos producidos por la administración intracerebroventricular (i.c.v) de CRH como la inhibición de conductas sexuales, características del estrés emocional, el retardo del crecimiento, el incremento en la actividad del sistema simpático, la supresión de GnRH, y una serie de conductas vinculadas con la ansiedad. Los altos niveles de CRH, también, estimulan la producción de citokinas y otros agentes mediadores de procesos inflamatorios provenientes del sistema inmune (Handa et al., 1994).

La CRH que es secretada desde las células del PVN es transportada a través de sus axones hacia la hipófisis donde estimula la secreción de ACTH en los corticotrofos hipofisarios. La ACTH circulante es mas tarde la encargada de estimular la síntesis y secreción de corticosterona (CORT) en la corteza adrenal. Los esteroides adrenales (glucocorticoides) cumplen diferentes funciones en los tejidos periféricos. En los casos de estrés, son los responsables de asistir al organismo aumentando la disponibilidad de sustratos de alta energía y desencadenar respuestas como las de escape ante un predador. Pero, además son los encargados de ejercer el control negativo en la secreción de CRH a nivel de las células hipotalámicas, la glándula pituitaria u otras áreas cerebrales como el hipocampo (McCormick et al., 1998).

La acción de la corticosterona está mediada por la unión específica a dos tipos de receptores intracelulares, los receptores a mineralocorticoides (MRs) y los receptores a glucocorticoides (GRs). Los glucocorticoides actúan por un mecanismo de feedback tanto sobre la hipófisis como sobre el hipotálamo; en la hipófisis, regulando negativamente la liberación de ACTH y en el hipotálamo y áreas extrahipotalámicas mediante la interacción con los GRs y MRs en la inhibición de la secreción de CRH (Handa et al., 1994).

El eje HPA es también sexualmente dimórfico en roedores y otros mamíferos. Los estudios realizados en ratas revelan que las hembras poseen las glándulas adrenales de mayor tamaño que las de los machos. De la misma forma, los niveles de CORT y ACTH circulantes en condiciones basales así como en las respuestas al estrés tienen niveles exacerbados en las hembras (Spinedi et al., 1992; Handa et al., 1994).

Como en otros casos de dimorfismo sexual, la influencia de los esteroides gonadales durante la etapa embrionaria y adulta, es también, esencial en el establecimiento de los componentes que regulan el HPA. Una prueba de la influencia de los esteroides sexuales en la fisiología del HPA, es el incremento en las respuestas al estrés de machos que han sido gonadectomizados. Este efecto, puede ser revertido mediante la administración exógena de testosterona, sugiriendo que la acción supresora de la esta hormona es necesaria para mantener

los bajos niveles plasmáticos de ACTH y CORT en los machos (Handa et al., 1994; Bingaman et al., 1994).

En ambos sexos la administración de estrógenos produce aumentos en los niveles basales del CORT y ACTH plasmáticos (Vamvakopoulos et al., 1994; Handa et al., 1994). Los elevados niveles del CORT encontrados en las hembras son el producto combinado, por un lado, de la liberación muy prolongada de ACTH y por otro de una deficiencia en el *feedback* a nivel central de CRH donde están involucrados los GR (Burguess et al., 1992). Los estudios de inmunocitoquímicos y de hibridación *in situ* demuestran, que junto con estos cambios en la secreción hormonal, la presencia de estrógenos incrementa el número de neuronas y los niveles de ARNm de CRH en el núcleo paraventricular del hipotálamo (Handa et al., 1994).

A diferencia de lo que sucede con los receptores de andrógenos, los receptores de estrógenos, están abundantemente expresados en las células magnocelulares del núcleo paraventricular del hipotálamo y por lo tanto activan en forma directa las células de CRH. La vía por la cual los andrógenos activan las células de CRH está menos conocida, a pesar que la ausencia de receptores a andrógenos en el núcleo paraventricular de hipocampo sugiere un camino alternativo de activación del HPA. En este sentido, hay evidencias que muestran que la expresión de *c-fos* en el núcleo paraventricular puede ser activada después de someter a machos gonadectomizados a un estrés de novedad. La inducción de la expresión de *c-fos* en el núcleo paraventricular del hipotálamo ha sido muy útil como marcador de la actividad neuronal después de la aplicación de diferentes tipos de estrés (Handa et al., 1994). Estas evidencias sugieren que la sensibilidad a los andrógenos podría ser mediada por un mecanismo de activación trans-sináptica, es decir que estas hormonas podrían modular la activación de CRH a través de la activación de neuronas que se proyecten hacia el núcleo paraventricular del hipotálamo. Varias líneas de trabajo indican al hipocampo, el área preóptica, el *septum* lateral y el *bed nucleus* de la *stria terminalis* como los potenciales sitios de acción de los andrógenos en la activación del HPA (Handa et al., 1994)

Las reacciones inmunes e inflamatorias son también de mayor intensidad en las hembras que en los machos sugiriendo, también, la importancia de los estrógenos en la activación de los componentes del sistema inmune (Grossman et al., 1991).

Este conjunto de observaciones, no sólo justifican los valores elevados del CORT plasmático y las respuestas exageradas al estrés, sino que además podría explicar por qué los desórdenes emocionales, como la depresión y la ansiedad, así como las enfermedades autoinmunes tienen mayor incidencia en las mujeres (Vamvakopoulos et al., 1994).

El efecto directo de los estrógenos sobre la regulación positiva de CRH muestra la importancia de los esteroides ováricos en el establecimiento del dimorfismo sexual en las funciones del HPA.

Los estudios realizados con estrógenos proveen las evidencias que sugieren interacciones entre los ejes HPA y HPG . De la misma forma los glucocorticoides son el nexo que vincula los ejes HPA y el hipotálamo-hipofisario-somatotrópico (HPS).

Muchas evidencias demuestran la influencia del HPA sobre el eje hipotalámico-hipofisario-gonadal (HPG). Una prueba de este tipo de interacción es la alteración de la capacidad reproductiva en condiciones de estrés o como producto de la inyección i.c.v de CRH (Sirinathsinghji et al., 1983; Rivier et al., 1989). El eje HPG, por su parte, ejerce su influencia sobre el HPA mediante la acción de los esteroides ováricos que estimulan los niveles de CRH (Vamvakopoulos et al., 1994).

Los tratamientos farmacológicos con altas dosis de glucocorticoides producen, además del feedback negativo sobre la secreción de CRH , una reducción marcada en el crecimiento lineal y la secreción de la hormona de crecimiento (Giustina et al., 1992; Lam et al., 1997). Considerando la participación de la SST en el control de la liberación hipofisaria de GH, muchos investigadores han propuesto a esta hormona hipotalámica como la molécula mediadora responsable entre la acción de los glucocorticoides y la secreción de GH en la hipófisis (Weheremberg et al., 1990).

En efecto, los tratamientos con glucocorticoides producen un incremento de la somatostatina, tanto a nivel de proteína como de ARN mensajero, en la eminencia media y en el núcleo periventricular del hipotálamo, sugiriendo el rol mediador de la hormona en la acción de los glucocorticoides sobre la hormona de crecimiento (Fife et al., 1996; Lam et al., 1997).

La presencia de la SST en las células piramidales del hipocampo ha sido postulada, por otra parte, como nexo en el mecanismo por el cual los glucocorticoides ejercen el feedback en el HPA.

La disfunción del HPA puede medirse mediante el test de supresión por dexametasona. Los tratamientos con glucocorticoides como la dexametasona producen una fuerte inhibición de la secreción de CRH a nivel central y ACTH en la hipófisis. La resistencia o escape a los tratamientos con glucocorticoides parecerían estar debidos a una deficiencia en la regulación del feedback sobre el sistema nervioso central. Sus causas han sido atribuídas tanto a una posible depleción en los receptores como a una persistente hipersecreción de CRH y ACTH. La participación de la somatostatina ha sido demostrada en la resistencia a los tratamientos con glucocorticoides mediante el uso de un agente depletor específico de la hormona. En estos tratamientos, la ausencia de la somatostatina causada por Cysteamina, condujo a una inhibición de la acción supresora de los glucocorticoides sobre CRH (Radke et al., 1988). Estas observaciones son consistentes con muchas de las patologías que presentan escape o resistencia al tratamiento con glucocorticoides donde además de la hipersecreción de CRH, existe una reducción de la función SSTérgica central. Tal como sucede en la enfermedad de Alzheimer, el envejecimiento y las lesiones hipocampales inducidas o espontáneas (Ferrara et al., 1991).

De esta forma la somatostatina podría actuar como moduladora de la acción de los glucocorticoides sobre sus receptores ya que estos se expresan, también, en las células piramidales del hipocampo (Handa et al., 1994; Vamvakopoulos et al., 1994; Ferrara et al., 1991).

El esclarecimiento de la función de la somatostatina en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal permitiría revelar el mecanismo por el cual interviene en la regulación del eje HPA tanto en condiciones basales como en las respuestas al estrés. Y asimismo comprender su posible participación en los estados patológicos útil en futuros tratamientos en el diagnóstico de trastornos como la depresión, la ansiedad y las enfermedades autoinmunes.

5.3 La SST extrahipotalámica y su papel en la memoria

Uno de los desafíos mayores de las neurociencias es la comprensión de como el sistema nervioso adquiere, almacena y utiliza la información derivada del mundo sensorial .

La doctrina neuronal propuesta por Cajal en 1894 estableció que el sistema nervioso estaba construido de unidades discretas, las neuronas, y que los procesos de memoria y aprendizaje estarían basados la modificación de las propiedades de las neuronas que serían el resultado de las interacción de por lo menos dos neuronas entre si.

En 1949 , Hebb propuso una regla para explicar la plasticidad sináptica donde la actividad concertada de dos neuronas conectadas entre sí fortalecía su sinapsis. Hoy sabemos que la plasticidad sináptica puede ser expresada de varias formas y que la regla postulada por Hebb puede aplicarse sólo en algunos casos de plasticidad.

La genética y la biología molecular han sido dos herramientas muy poderosas que promovieron, en parte, el esclarecimiento de la complejidad de ciertos procesos biológicos como el aprendizaje y la memoria.

Los estudios realizados mediante el uso ratones transgénicos y deficientes (*knockout*) para ciertas proteínas han permitido seguir los efectos de una mutación a todos los niveles desde el análisis molecular hasta los estudios en el comportamiento. De esta forma la información sobre los procesos celulares y moleculares en el cerebro pueden ser complementadas por los estudios neuroanatómicos y conductuales (Chen et al., 1997).

Los estudios de psicología cognitiva han demostrado que el aprendizaje no es una facultad unitaria sino que requiere de al menos dos procesos diferentes: a) el aprendizaje de personas, lugares y cosas o memoria declarativa y b) el aprendizaje de hábitos y estrategias de percepción o memoria implícita (Silva et al., 1997).

La memoria explícita o declarativa involucra áreas dentro del lóbulo temporal de la corteza cerebral como el hipocampo incluyendo el giro dentado y el complejo subicular; y todas las áreas anatómicamente relacionadas con el hipocampo en especial la corteza entorhinal y perihinal, adyacentes a la amígdala y la corteza parahipocampal (Zola et al., 1993).

La memoria implícita es una colección heterogénea de actitudes no concientes, estímulos y algunas formas del condicionamiento clásico que involucra sistemas sensoriales y motores que son reclutados al momento de la percepción y durante el proceso del aprendizaje (Zola et al., 1993).

El aprendizaje consiste por lo tanto en la adquisición de información nueva o diferente y la memoria es la forma en que ese aprendizaje es almacenado.

La memoria desde el punto de vista molecular puede ser dividida en dos estadios temporalmente diferentes: 1) una de corto plazo que puede extenderse desde minutos a horas y que requiere de proteínas preexistentes susceptibles a modificaciones postraduccionales y 2) la memoria de largo plazo cuya duración puede extenderse desde horas a días e incluso semanas que involucra la síntesis *de novo* de proteínas dependientes de AMPc (Goelet et al., 1986).

La memoria de corto plazo o memoria de trabajo, es un proceso que involucra la modificación postraducciona de proteínas preexistentes. Los estudios realizados en numerosos modelos de invertebrados demostraron que la adquisición de este tipo de memoria necesitaba de la unión del neurotransmisor a su receptor, que a través de segundos mensajeros, era capaz de activar una proteína kinasa y esta de fosforilar a sus sustratos. La adquisición de la memoria de corto plazo depende de la duración de las modificaciones covalentes sobre los sustratos y de la actividad sostenida de las enzimas responsables de la síntesis de segundos mensajeros.

La memoria de largo plazo, en realidad no es más que un mecanismo de perpetuación de la memoria de corto plazo. Dicho de otra manera, durante el período de retención de la memoria de corto plazo, ésta podría ser modulada por los mismos o diferentes neurotransmisores que disparan la síntesis de segundos mensajeros para accionar la memoria de corto plazo, accionando, a la vez, otros sistemas adicionales de segundos mensajeros. El primer sistema, es un sistema de refuerzo de en la modificación covalente de las proteínas que extiende la duración de la memoria a horas. El segundo sistema, involucra la activación transiente de genes y el tiempo de retención de esta memoria depende de las vidas medias de los transcritos de estos genes. El tercer y último sistema, supone la expresión de una secuencia de genes en la cual los genes tempranos conducen a la sostenida expresión de los genes efectores tardíos (Goelet et al., 1986).

Los estudios utilizando agentes que bloquean la síntesis de ARN mensajero y proteínas demostraron que, mientras la memoria de corto plazo no requiere de la síntesis de proteínas *de novo*, la inducción de determinados genes y proteínas es, en cambio, un paso crítico en el establecimiento de la memoria de largo plazo (Davis and Squire, 1984).

Tanto la SST como sus proyecciones y sus receptores han sido localizados en diferentes áreas del SNC que incluyen la corteza cerebral (Cx), septum, estriado y el sistema límbico, amígdala (Am) e hipocampo (HIP). Estas estructuras están, todas, involucradas de alguna manera en los procesos de consolidación de la memoria. El hipocampo fue la primera estructura donde se han encontrado sinapsis que sufrían cambios activos en la eficiencia de su transmisión después de la estimulación con pulsos cortos de alta frecuencia (Bliss et al., 1973). Este efecto ha sido denominado potenciación de larga duración (LTP) y está presente en todas las vías excitatorias del hipocampo y de otras áreas del cerebro. Los LTP son el sustrato neural del aprendizaje y su papel ha sido evaluado mediante la inactivación de genes cuyos productos son esenciales en la formación de los LTP (Silva et al., 1997)

Los diferentes tipos de aprendizaje han sido mapeados mediante la utilización de lesiones en una variedad de estructuras cerebrales (McDonnald et al., 1993; Zola et al., 1993)

Varias evidencias sugieren a la somatostatina como un posible neuromodulador en la formación de los procesos de memoria. Por un lado, existe una fuerte asociación entre la depleción de la somatostatina y la pérdida de las facultades cognitivas y de diferentes tipos de memoria, como ha sido observado en la enfermedad de Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas. En estos estudios tanto la inmunorreactividad como la expresión de la proteína aparecen disminuidas, de forma similar a lo que se observa en la enfermedad de Alzheimer y en el envejecimiento normal. Los experimentos indican que la disminución de la inmunorreactividad y de la proteína no están relacionadas a la pérdida de las neuronas somatostatinérgicas sino mas bien a un déficit en el estado transcripcional de la somatostatina. Así como en la mayoría de las enfermedades neurodegenerativas, la enfermedad de Alzheimer se caracteriza por la disminución de la inmunorreactividad en las células productoras de somatostatina asociada al deterioro de las funciones cognitivas (Tullio et al. 1991; Miettinen et al, 1993).

Por otra parte, las manipulaciones experimentales de los niveles de somatostatina en roedores como su depleción con tratamientos con Cysteamina resultan en la inhabilidad de adquirir, retener o evocar información en los tests de evitamiento activo y pasivo y memoria de trabajo (Harountunian et al. , 1987; Cook et al., 1989; Bakhit et al., 1986). Estas alteraciones pueden ser revertidas o mejoradas mediante la inyección i.c.v de somatostatina así como la de sus análogos (Matsuoka et al, 1994; Matsuoka et al., 1992). La somatostatina también resultó eficaz en el tratamiento de la amnesia provocada por agentes que bloquean los receptores muscarínicos del sistema colinérgico y las producidas por lesiones en el cerebro anterior (Ohno et al 1994; Matsuoka et al, 1991). Estos experimentos sugieren una asociación funcional entre neuronas del sistema somatostatinérgico y colinérgico/adrenérgico en el hipocampo, que podrían

actuar como un sistema de modulación en el proceso de consolidación de la memoria (Matsuoka et al, 1991).

Por último la formación de los LTP, procesos involucrados en la memoria y el aprendizaje, están significativamente incrementados por la adición exógena de somatostatina en las fibras musgosas de la CA3 del hipocampo (Matsuoka et al., 1991), sumando evidencias que sugieren a la somatostatina como una molécula moduladora en los procesos que intervienen en el establecimiento de la memoria.

La participación de la SST en las células del hipocampo y en la corteza cerebral podría indicar el desarrollo de los estados patológicos así como el posible tratamiento de las enfermedades neurodegenerativas.

Modelo de estudio de la función de la somatostatina en el sistema nervioso central

Los avances en el campo de la biología experimental han permitido la introducción de ADN purificado dentro de células de mamíferos. Estas secuencias de ADN permanecen extracromosomales por un tiempo corto luego del cual pueden ser integradas al genoma celular.

El ADN introducido que tiene homología con las secuencias celulares puede ser incorporado al genoma de la célula de forma permanente por dos clases de eventos: al azar o por recombinación homóloga. En el primer caso y mas frecuente, las secuencias de ADN son incorporadas en un sitio al azar por un evento de recombinación no homóloga; pero ocasionalmente el ADN introducido es integrado por un evento de recombinación basado en la homología de secuencias.

La identificación de elementos de acción en *cis* es importante en el estudio de la expresión específica, temporal y espacial de distintos genes; pero la imprevisibilidad del sitio de integración ha sido un obstáculo para muchos experimentos.

La utilización de secuencias con homología dentro del genoma celular ha dado origen al direccionamiento de genes a posiciones definidas en células de mamífero, permitiendo así la inactivación, mutación o corrección de genes específicos. La utilización de esta técnica ha tomado gran impulso desde la disponibilidad de las células proliferativas indiferenciadas de ratón. Evans y Kaufman (1981) demostraron que las células de la masa interna de los blastocistos de ratón pueden ser adaptadas para crecer en cultivo y luego estimuladas a continuar con su programa de desarrollo. Las células pueden ser reintroducidas, luego, en nuevos blastocistos y éstos, implantados en el útero de hembras preparadas hormonalmente para la preñez. La modificación de las células por recombinación homóloga y su uso para generar ratones quiméricos es utilizada actualmente como una vía altamente específica en el estudio de la función de un gen en particular en un entorno fisiológico apropiado. Si la línea germinal de estas quimeras es colonizada por las células modificadas, entonces la modificación introducida *in vitro* puede ser transmitida genéticamente a las generaciones sucesivas (Capecchi, 1989).

En el siguiente trabajo se ha utilizado un modelo de ratón mutante para el gen de la somatostatina producto de la recombinación homóloga de un vector que contiene el gen de la somatostatina inactivado por la presencia de el gen de resistencia a la Neomicina necesario para la selección de las células que han sufrido recombinación homóloga.

En este modelo se estudiarán las posibles funciones de la somatostatina en el sistema nervioso central. Su rol como neurohormona será analizado, en el eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico, como elemento de control en la secreción de la hormona de crecimiento y en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal como molécula mediadora en el control de la función hipofisaria tanto en condiciones normales como en las provocadas por el estrés. La función de neuropéptido modulador de la somatostatina extrahipotalámica será estudiada en distintos paradigmas conductuales.

Objetivos del trabajo

- 1. Estudiar el rol de la somatostatina en el eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico y su participación en la determinación del patrón secretorio de la hormona de crecimiento.**
- 2. Analizar el papel de la somatostatina como mediadora en la regulación del eje hipotalámico-hipofisario-adrenal en condiciones basales y en las respuestas al estrés.**

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Obtención de ADN genómico

Todos los estudios de esta tesis fueron realizados con animales de la 5ª generación de retrocruza con ratones de la cepa parental C57BL/6J (N5C57). Con el objeto de disminuir la variación alélica los ratones F1 heterocigotas (H) para la mutación nula del gen de la SST fueron cruzados por 5 veces consecutivas con ratones de la cepa parental C57BL/6J. Los ratones resultantes N5C57 heterocigotas (H) fueron cruzados entre sí y se obtuvieron descendientes de la frecuencia esperada para una descendencia mendeliana de 25% de homocigotas WT, 50 % de H y 25% de homocigotas KO. Los ratones WT y KO de cada una de las camadas fueron utilizados en los experimentos mientras que los H fueron reservados para nuevos apareamientos. Los ratones WT y KO han sido obtenidos en todos los casos por al apareamiento entre animales heterocigotas. La importancia de tener en la misma camada a los 3 genotipos probables, a pesar de su bajo rendimiento, reside en la posibilidad que todos estén sometidos a las mismas condiciones, como por ejemplo la conducta de la madre, además de mantener la homogeneidad genética. Mientras que las poblaciones de WT generadas a partir de apareamientos de WT y las de KO generadas a partir de apareamientos de KO están, no sólo bajo la influencia de distintas madres sino también camino a la divergencia genética, obteniendo a través de las sucesivas generaciones poblaciones genéticamente diferentes donde se podría confundir el efecto directo provocado por la mutación.

Las camadas de los nuevos ratones fueron sexadas y destetadas a las 3 semanas de edad y el genotipo de los ratones fue identificado mediante una reacción de PCR, utilizando ADN genómico proveniente de un fragmento de cola el ratón. Para este procedimiento los ratones fueron anestesiados intraperitonealmente (i.p) con 0.15 ml/10 g de peso de avertina (Tribromoetanol, ALDRICH) 2% en agua bidestilada. Después de la anestesia, se perforaron las orejas para su identificación y se cortó un fragmento de 0.5 a 1 cm de la porción terminal de la cola que fue cauterizada con un metal caliente. Los fragmentos de cola fueron digeridos en 0.5

ml de una solución acuosa (Tris pH 8, 50 mM; EDTA pH 8, 100 mM y SDS 0.5%) en presencia de 0.5 mg/ml de proteinasa K por 12 hs a 55°C con agitación constante. Las digestiones se centrifugaron a Vmáxima por 20 min. (14000 r.p.m.) y el sobrenadante viscoso (con el ADN) se transfirió a un tubo limpio donde fue precipitado con 0.5 ml de isopropanol (IPA). Después de una centrifugación de 30 min. a V max, el sobrenadante fue descartado con cuidado y los *pellets* de ADN enjuagados con etanol 70% frío, secados con los tubos invertidos sobre una servilleta por 1 h y resuspendidos en 0.5 ml de TE (Tris pH 8 10 mM y EDTA pH 8 1mM).

2. Genotipificación por PCR

Las reacciones de PCR utilizadas en la genotipificación fueron realizadas en un máquina MJ Research PTC-100 con un programa que consta de los siguientes pasos : desnaturalización inicial 4 min. a 94°C; desnaturalización del templado de ADN 1 min. a 94 °C, alineamiento de *primers* al templado 1 min. a 67°C durante 16 ciclos disminuyendo 1°C por ciclo, extensión del fragmento a amplificar 1 min. a 72°C; mas 15 ciclos de desnaturalización 1 min. a 94°C, alineamiento 1 min. a 52°C y extensión 1 min. a 72°C y un ciclo final de extensión de 5 min. a 72 °C.

En la reacción se utilizó 1µl de ADN genómico resuspendido en 0.5 ml de TE y una mezcla de reactivos previamente preparada. En la mezcla se utilizaron, en concentraciones finales, tres primers: 229, 460 y 465, 1µM respectivamente, deoxinucleótidos trifosfato (dNTPs) 0.2 mM, suplementados con MgCl₂ 2.5 mM, buffer de PCR 1X (los dos últimos provistos por la polimerasa Taq Promega o Gibco BRL) y agua hasta completar el volúmen total de 40 µl por tubo. Los tubos fueron colocados en la máquina de PCR, iniciado y terminado el ciclo de desnaturalización inicial de 4 min. a 94°C se agregó a cada tubo 5 µl de una mezcla de H₂O, buffer PCR 1X y 0.8 unidades de Taq polimerasa. Los resultados de la reacción de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa 1% en presencia de bromuro de etidio (10 mg/ml) corridos en buffer TBE 0.5X.

Identificación de bandas

El producto de amplificación de los primers 460 y 465 resultó en una banda de 0.9 kb que corresponde al alelo sano de la SST, mientras que el producto de amplificación con los primers 229 y 465 resultó en una banda de 0.45 kb correspondiente al alelo nulo de la SST.

Los primers utilizados en esta reacción tienen las secuencias que siguen a continuación:

229: 5' CAT AAg CgC ATg CTC CAg AC 3';

460: 5' AgT TTC TgC AgA AgT CTC CTg gC 3' y

465: 5' CAg gAT gTg AAT gTC TTC Cag 3' y fueron sintetizados por el MMI Core Facility, BSAC1 en la Universidad de Oregon.

3. Bioterio

Los ratones fueron mantenidos en jaulas que contenían entre 4 y 5 animales cada una de los dos posibles genotipos WT y KO pero del mismo sexo. Salvo en indicaciones especiales, los animales fueron alimentados *ad libitum* con una dieta comercial Pico Lab y mantenidos a una temperatura de 22°C con intervalos de luz oscuridad de 12 hs.

Los animales que no fueron utilizados fueron sacrificados con gas CO₂ o por dislocación cervical.

4. Inmunohistoquímica

4.1 Tratamiento con colchicina y adsorción de anticuerpos

Para detección de GHRH los ratones fueron inyectados 48 hs antes de la perfusión con colchicina (Sigma) 1.5 µg/g de peso. Las inyecciones se hicieron *free hand* (sin la ayuda del estereotáxico) en el surco a la altura del ventrículo lateral y a 2 mm de la línea media de la calota, utilizando una jeringa Hamilton de 10 µl y una aguja de 23 1/2 G con la ayuda de un tope plástico que deje 2 mm libres de la aguja de tal forma de permitir la perforación de la calota y el acceso al ventrículo. En las inyecciones se utilizaron entre 1 y 2 µl de con una concentración

madre de colchicina de 30 mg/ml en solución fisiológica recién preparada. La acción de la colchicina fue confirmada por la presencia de síntomas de enfermedad en los días siguientes a la inyección y en las secciones por la presencia de lesiones en la corteza por sobre el ventrículo lateral.

El anticuerpo contra la SST (anti-SST) fue adsorbido con péptido sintético SS-14 (SS-14 Peninsula 1 mM en H₂O) llevado a concentración final de 10⁻⁵ M en KPBS/ 0.3% de Tritón X-100 y 2% de suero normal e incubado por 16 h a temperatura ambiente.

4.2 Fijación de los tejidos

La fijación de los tejidos se realizó por perfusión cardíaca. Para este procedimiento ratones adultos de 3 meses de edad fueron inyectados con avertina 2% y perfundidos con 5 ml de solución fisiológica enfriada en hielo seguidos por 50 ml de PFA 4 % (4 g de paraformaldehído, PFA, Sigma en PBS disuelto a 70 °C , una vez disuelto tomar el ph que debe estar entre 7 y 9, ajustar con NaOH si fuera necesario, enfriar en hielo).

Una vez disecados los cerebros fueron fijados por 24 hs adicionales en presencia de PFA 4% a 4 °C y seccionados en vibrátomo en cortes de 50 µm en PBS 1X frío, previa remoción de las meninges y el quiasma óptico con la ayuda de una lupa y pinzas Drummond.

En las inmunohistoquímicas realizadas en hipófisis se siguió el mismo protocolo descripto, pero la postfijación de las hipófisis fue realizada en presencia de sacarosa 10% + PFA 4%. Después de la postfijación los tejidos se orientaron e incluyeron en OCT en hielo seco, se cortaron en secciones de 18 µm en un crióstato y se montaron en portaobjetos previamente tratados con Vectabond (Vector Lab.).

4.3 Preservación de las secciones a -20°C

Las secciones de cerebro cortadas en el vibrátomo fueron preservadas a -20°C en presencia de una solución crioprotectora 50% buffer fosfato de sodio ph 7.3 0.05M, 30% de etilenglicol (Sigma) y 20% de glicerol. Esta solución puede ser conservada en la heladera a 4°C para su futura utilización.

4.4 Reacciones con anticuerpo

Las secciones se ubicaron en una placa de 24 pocillos y lavaron 2 x 15 min. en PBS. La acción de la peroxidasa endógena fue eliminada con la incubación en KPBS en presencia de H_2O_2 1% por el término de 1 h o hasta que las burbujas desaparezcan. Las secciones fueron lavadas 2 x 20 min. con KPBS e incubadas (entre 250 y 500 μ l por well dependiendo del número de secciones) con la dilución correspondiente al anticuerpo primario utilizado en KPBS/Triton X-100 0,3 %, suero normal 2% durante 16 hs a 4°C con agitación. Los lavados del anticuerpo primario se hicieron en KPBS 2 x 20 min. y la incubación con el 2° anticuerpo, una IgG anti-Fc de conejo biotinilado hecho en cabra (Vector Lab.) (1:200) en KPBS/Triton X-100 0,3 % 2 hs a temperatura ambiente. Después de los lavados del anticuerpo 2°, 2 x 20 min. en KPBS, se realizó el revelado mediante la amplificación de la señal utilizando el sistema de avidina-biotina ABC (Elite, Vector Lab.). Para esta reacción se incubaron los cortes con una solución preparada previamente de KPBS y los reactivos del kit según se indica por 1 h. Por último la secciones fueron lavadas 2 x 20 min. en KPBS y luego 1x 20 min. en TBS y reveladas en una solución de 25 mg DAB (Diaminobencidina, Sigma) en 100 ml TBS + H_2O_2 0,05 % previamente filtrada, hasta la aparición del color. La reacción de revelado fue detenida con TBS, los cortes montados en un portaobjetos cubiertos con gelatina 1 % y $KCr(SO_4)_2$ 0,1 % y secados a 37°C en estufa por 1 h.

En la detección de SST y GHRH, las secciones fueron contrateñidas 30 seg. con Methal Green (Vector Lab.) y deshidratadas en una concentración ascendente de alcoholes 50%, 75%, 95%, 100% y dos veces por xileno y mas tarde cubiertas con Permount y el cubreobjetos para ser observadas al microscopio óptico.

Las inmunohistoquímicas realizadas en los tejidos incluídos en parafina como el páncreas también siguieron el mismo protocolo descrito, pero antes de iniciar las tinciones los portaobjetos con las secciones fueron desparafinadas en una serie de alcoholes ascendentes 70%,

95%, 100% durante 2 min. cada uno y xileno 2 x 10 min. Los tejidos fueron luego hidratados en una serie de alcoholes descendentes 100%, 95%, 70% y 50% y finalmente H₂O. Para comenzar el protocolo de tinción fueron equilibrados en KPBS y las incubaciones con los anticuerpos realizadas en una cámara húmeda y utilizando un lápiz hidrofóbico (PAP pen o Dako pen) para delimitar el área de incubación sobre el portaobjetos.

4.5 Anticuerpos y diluciones utilizadas

Anti -SST: #669, Anticuerpo policlonal anti-SST hecho en conejo, provisto por el Dr. Ronald Lechan del New England Medical Center, Universidad Tufts y la dilución utilizada 1:2000, anticuerpo secundario, anti-Fc de conejo biotinilado hecho en cabra.

Anti-GHRH: Anticuerpo policlonal anti-GHRH hecho en conejo, provisto por el Dr. F Talamantes del Dto. de Biología de la Universidad de California, dilución utilizada 1:3300 (Endo et al., 1994) anticuerpo secundario, anti-Fc de conejo biotinilado hecho en cabra.

Anti-glucagon: Anticuerpo policlonal anti-glucagon hecho en conejo, provisto por la Dra. Brenda Fung del Dto. de gastroenterología de la Facultad de Medicina, Universidad de Tufts. Dilución utilizada 1:3000, anticuerpo secundario, anti-Fc de conejo biotinilado hecho en cabra.

Anti-insulina: Anticuerpo policlonal anti-insulina hecho en chanco de Guinea, provisto por la Dra. Brenda Fung del Dto. de gastroenterología de la Facultad de Medicina, Universidad de Tufts. Dilución utilizada 1:3000, anticuerpo secundario, anti-Fc chanco de Guinea biotinilado hecho en cabra.

Anti-NPY: Anticuerpo policlonal anti-NPY hecho en conejo, .Dilución utilizada 1:25.000, anticuerpo secundario, anti-Fc de conejo biotinilado hecho en cabra.

Anti-calretinina: Anticuerpo policlonal anti-calretinina hecho en conejo, Chemicon (lote AB149). Anticuerpo secundario, anti-Fc de conejo biotinilado hecho en cabra.

Anti-calbindina: Anticuerpo monoclonal anti-calbindina hecho en ratón, Sigma (clon CL-300). Dilución utilizada 1:1000 en suero normal de caballo, anticuerpo secundario; anti-Fc de ratón biotinilado hecho en caballo.

Anti-parvalbúmina: Anticuerpo monoclonal anti-parvalbúmina hecho en ratón , Sigma (clon PA-235). Dilución utilizada 1:1000 en suero normal de caballo; anticuerpo secundario, anti-Fc de ratón biotinilado hecho en caballo.

Todos los anticuerpos contra las hormonas hipofisarias son anticuerpos policlonales hechos en conejo y fueron provistos por el Nacional Hormone and Pituitary Program (NIDDK) y se utilizaron según las siguientes diluciones: anti-ACTH 1:1000; anti-hGH 1:780; anti-rPro 1:25 y anti-r β TSH 1:3000, e incubados con un anticuerpo secundario anti-Fc de conejo biotinilado hecho en cabra (Low et al., 1989).

5. Expresión de proteínas dimórficas en el hígado

5.1 Preparación de ARN total

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se extrajeron los tejidos de interés que fueron congelados en hielo seco y reservados a -70°C para su posterior utilización.

Para las preparaciones de ARN total se utilizaron aproximadamente 100 mg de tejido por muestra. Las muestras se procesaron según el protocolo descrito previamente por Chomczynski (Chomczynski et al., 1987) levemente modificado, utilizando una solución de Isotiocianato de guanidinio (solución D: Isotiocianato de guanidinio 4 M, Citrato de Na ph 7 25 mM, Sarcosyl 0.5% y β -mercaptoetanol 0.1 M).

Para la preparación de ARN total se utilizaron aproximadamente 100 mg de hígado en 3 ml de solución D que fueron homogenizados por 1 min. con un Politron en un tubo de polipropileno de 12 ml e incubados en hielo por 15 min. Después de la incubación se agregaron: 300 μl de ACoNa ph 5.2 3 M, 3 ml de fenol (ácido) ph 4 y 600 μl de isoamílico-cloroformo (IC)

49:1. Cada uno de los agregados fue agitado por inversión y por último agitados vigorosamente con un vortex por 1 min. e incubados en hielo por otros 15 min. Los homogenatos fueron centrifugados a 10.000 r.p.m. por 20 min. a 4°C. La fase acuosa superior, tomada con cuidado, fue reprecipitada en otro tubo con 1 vol. de isopropanol (IPA), 12 hs a -20°C y centrifugada 20 min. a 10.000 r.p.m. a 4°C. El glucógeno fue eliminado de la muestra con 2 ml de Cloruro de litio 4 M.

Las muestras fueron nuevamente centrifugadas 5 min. a 5000 r.p.m. a 4°C, descartado el sobrenadante y el *pellet* resuspendido en 2 ml de solución D (sin β-mercaptoetanol) y reprecipitado con 2 ml de IPA por 2 h a -20°C.

Después de la última centrifugación (20 min. a 4°C a 10.000 r.p.m.) el *pellet* fue enjuagado dos veces con etanol 70%, secado al aire y resuspendido en 500 µl de H₂O. Los ARNs fueron cuantificados con la ayuda de un espectrofotómetro y mantenidos a -70°C hasta su utilización.

Todas las soluciones acuosas fueron preparadas con agua tratada con DEPC (dietilpirocarbonato, Sigma), 0.1 % a 55°C y esterilizada con autoclave.

5.2 Geles y transferencia de ARN

Las muestras de ARN total fueron corridas en geles de agarosa (Gibco BRL) 1.5% en, buffer MOPS (MOPS, Gibco BRL) 1X ph 7 en presencia de 16% de formaldehído. Antes de ser sembradas, las muestras (30 µg) fueron reprecipitadas utilizando 1/10 del vol. total de AcoNa 3M ph 5.2 y 3 volúmenes de etanol 100% frío a -20°C durante 2 hs. El ARN total fue resuspendido en 80% formamida y 1µl de bromuro de etidio (1mg/ml), desnaturalizado 10 min. a 65°C y preservado de la renaturalización en hielo por 10 min. hasta el momento de la siembra. Los marcadores de peso molecular para ARN (4 µl, Gibco, BRL) fueron también tratados con formamida y bromuro de etidio, desnaturalizados y colocados en hielo. Las muestras se corrieron

también en buffer MOPS 1X y formaldehído 16% a 80 Volts por 5 h agitando el buffer de la cuba cada 2 h.

Los geles fueron lavados con H₂O 2 x 20 min. para eliminar los restos de formaldehído, transferidos a membranas de nylon (Duralon-Uvmembrane, Stratagene) por capilaridad en SSC 20X durante 16 hs y las membranas fijadas con UV por 30 seg. a 120 mJ (UVStratalinker 1800, Stratagene).

La eficiencia de la transferencia y la identificación del marcador de peso molecular fue evaluada por tinción con azul de metileno (Methylene blue, Sigma) 0,04 % en AcoNa 0,5 M.

5.3 Sondas utilizadas. Marcado de las sondas y condiciones de hibridación

Para la detección de las proteínas mayoritarias de la orina MUPs, la albúmina y el ARN ribosomal de 18s fueron utilizados los siguientes oligonucleótidos:

MUPs I y II: 5' gAg CAC TCT TCA TCT CTT ACA gT 3' (23 nucleótidos)

MUP III : 5' TCg CAg TCA TTT Cgg TgC 3' (18 nucleótidos), ambos provistos por Diane Robbins, del Dto. de Genética de la Universidad de Michigan.

ARN 18s 5' ACg gTA TCT gAT CgT CTT CgA ACC 3' (24 nucleótidos), provisto por D. Pribnow del BSCA de la Universidad de Oregon.

Albúmina, 5' TCT ACA gCA ggg CTg CCT Cg 5' (20 nucleótidos).

Para la detección de los receptores de prolactina y la citocromo p450 15 α /2A4 se utilizaron fragmentos de ADN complementario:

ProR de 0.5 kb proveniente de la digestión con las enzimas de restricción NcoI/BamHI de un plásmido de expresión provisto por Nadine Binart del Dto. de Endocrinología molecular del INSERM.

CYP 15 α /2A4 de 0.55 kb proveniente de la digestión del ADN complementario con las enzimas de restricción BamHI/EcoRI de un plásmido provisto por Masa Negishi del laboratorio de Farmacología del NIH.

Los oligonucleótidos fueron marcados radiactivamente con dATP y P^{32} utilizando una enzima kinasa del fago T4 partiendo de 300 ng de oligo y de acuerdo con el protocolo sugerido para la utilización de la enzima (T4 PNK, Gibco BRL). Las hibridaciones se realizaron utilizando una solución acuosa (SSC 5X, buffer fosfato de sodio 200 mM PH 7.2, SDS 7%, Denhardt's 1X, ADN de esperma de salmón sonicado 100 μ g/ml) a 55°C durante 16 hs. Las mismas condiciones de temperatura a 55°C se utilizaron en las 2 hs de prehibridación. Los lavados se iniciaron con una solución I (SSC 3X, Denhardt's 10X, SDS 5% y buffer fosfato de sodio 25 mM ph 7.2) 1 x 30 min. a 50 °C y una solución II (SSC 1X y SDS 0.1%) 1 x 30 min. a 50°C. Las membranas fueron expuestas en presencia de una pantalla amplificadora, escaneadas en un *Phosphor Imager* y las bandas cuantificadas por densitometría utilizando un programa *IP Lab Gel*.

Las cuantificaciones fueron normalizadas con los valores obtenidos para el ARN de 18s y los valores definitivos expresados en unidades relativas como la relación (proteína/ARN 18s)*100.

Las sondas de fragmentos de ADN fueron marcadas radioactivamente utilizando dATP α P^{32} mediante la reacción de iniciación por *primers* al azar utilizando 20 ng de templado y de acuerdo con el protocolo provisto por el kit comercial (Random Primed DNA Labeling Kit, Boheringer Manheim Biochemica) y desnaturalizadas por 10 min. a 100°C antes de ser agregada a la solución de hibridación.

Las hibridaciones se realizaron utilizando una solución de hibridación con formamida (50% formamida deionizada, Denhardt's 5X, ADN de esperma de salmón sonicado 100 μ g/ml, EDTA 1 mM ph 8, SSC 6X, SDS 0.5%, buffer fosfato de sodio 25 mM ph 7.2) a 42 °C por 16 hs. Las membranas fueron lavadas en condiciones de alta astringencia 2 x 15 min. a temperatura ambiente (SSC 2X y SDS 0.1%) y 1 x 30 min. a 42°C (SSC 0.1X y SDS0.1%); y expuestas en presencia de un pantalla amplificadora. Las bandas fueron cuantificadas y expresadas de la misma forma que la ya descrita para las sondas de oligonucleótidos.

Después de cada hibridación las membranas fueron hervidas 2 x 10 min. con una solución SSC 0.1X y SDS 0.5% para eliminar vestigios de las sonda anterior y expuestas durante 12 hs para comprobar la ausencia de la marca. Las membranas fueron entonces hibridadas con una nueva sonda.

6. Determinaciones de los niveles de hormonas del estrés

6.1 Determinación de los niveles basales de hormonas del estrés

Para determinar la variación diurna en la secreción basal de las hormonas del estrés Corticosterona (CORT) y ACTH se hicieron determinaciones de los niveles hormonales por la mañana (AM) y por la tarde (PM). Las determinaciones de la mañana se hicieron entre las 7 y las 10 y las de la tarde entre las 5 y las 7.

El experimento se realizó en dos días consecutivos y se utilizaron 4 ratones adultos (3 meses de edad) por sexo y genotipo para cada día y determinación (AM y PM). Para propiciar las condiciones libres de estrés cada animal fue enjaulado individualmente 48 hs antes del experimento y alimentados *ad libitum*. En el momento del experimento cada ratón fue transferido a un cuarto donde fue decapitado separadamente de la presencia del resto de los animales. La sangre proveniente del tronco (0.5 ml) fue colectada con un embudo en presencia de 10 µl EDTA 75 mg/ml, centrifugada inmediatamente y separado el plasma a -70°C para las determinaciones de CORT y ACTH.

6.2 Estrés producido por la inyección LPS

Los experimentos utilizando LPS fueron llevados a cabo en dos días consecutivos con ratones adultos de 4 meses de edad colocados en jaulas individuales y alimentados *ad libitum* 48 hs antes del experimento. La endotoxina bacteriana lipopolisacárido (LPS, Sigma) fue preparada en una concentración madre de 0.25 mg/ml en solución fisiológica estéril. El protocolo de inyección comenzó a las 8 y terminó a las 9:30 de la mañana y se utilizaron 5 ratones por sexo/genotipo/día para cada una de las inyecciones con LPS y vehículo. Las inyecciones se

organizaron en 5 series por día inyectando pares de ratones del mismo sexo y genotipo con vehículo y LPS al mismo tiempo con una frecuencia de 5 min., alternando genotipo y sexo. Por ejemplo, la primera serie se inició con 2 machos WT que recibieron las inyecciones de LPS y vehículo respectivamente y fueron seguidos por 2 machos KO, 2 hembras WT y 2 hembras KO que recibieron el mismo tratamiento. El mismo procedimiento fue utilizado el día 2. Los ratones recibieron la inyección por vía intraperitoneal (i.p) de 100 µl de LPS (25µg) o 100 µl de vehículo (Spinedi et al., 1992) y fueron sacrificados por decapitación 3 hs después de acuerdo a los mismos pares organizados en la inyección. Los 0.5 ml de sangre fueron colectados del tronco en presencia de 10 µl de EDTA 75 mg/ml, centrifugados inmediatamente y reservado el plasma a -70°C para las determinaciones de CORT y ACTH.

6.3 Estrés producido por inmovilización

Estos experimentos fueron realizados en 3 días consecutivos en horas de la mañana y se utilizaron 8 ratones adultos (3 meses de edad) de cada sexo y genotipo que fueron ubicados en jaulas individuales 48 hs antes del experimento y alimentados *ad libitum*. Los ratones fueron sometidos a una inmovilización por el término de 20 minutos en un tubo plástico cilíndrico que dejara libre la cola por donde los animales fueron sangrados.

El experimento fue organizado en 3 series de 4 ratones cada una por día , 1 ratón de cada sexo y genotipo en cada serie. Cada ratón de la primera serie (4) fue transferido en sus jaula cada 5 min. al cuarto donde se realizó la inmovilización. En ausencia de anestesia, los ratones fueron sangrados de la cola antes de ser sometidos a la inmovilización (tiempo 0) y; a los 5 y 20 minutos durante la inmovilización en el tubo plástico (tiempo 5 y 20). Las muestras de sangre de los tiempos 0, 5 y 20 min. fue colectada en tubos capilares de vidrio de 50 µl que fueron posteriormente sellados con plastilina para la centrifugación. Después de los 20 minutos del estrés físico los ratones fueron devueltos a sus jaulas para permitir su recuperación. A los 60 minutos de iniciado el experimento, 40 minutos después de la inmovilización, los ratones fueron

decapitados y se colectaron 0.5 ml de sangre proveniente del tronco en presencia de 10 μ l de EDTA 75 mg/ml que fue inmediatamente centrifugada y reservado el plasma a -70°C para las determinaciones de ACTH y CORT.

Los capilares con la sangre proveniente de los distintos tiempos de inmovilización fueron centrifugados por 40 min. a 4000 r.p.m. y rescatado el suero con la ayuda de una lima para romper el capilar. Fueron colectados unos 15 μ l de suero en cada caso. También fueron reservados a -70°C para las determinaciones de CORT.

7. Ensayos de RIA y determinaciones plasmáticas

Las determinaciones de glucosa e insulina se realizaron en dos días consecutivos utilizando ratones adultos de entre 3 y 5 meses de edad. En el día 1 se colectaron las muestras de sangre por punción cardíaca de ratones ayunados por el término de 16 hs utilizando isofluorano para la anestesia de los animales. Después de la anestesia los ratones fueron devueltos a sus jaulas y al bioterio y alimentados en condiciones *ad libitum* hasta el día 2. En el día 2 los ratones fueron decapitados con la ayuda de una tijera para colectar la sangre proveniente del tronco.

Las determinaciones de glucosa fueron realizadas con un kit comercial Glucotest utilizando cintas descartables mientras que las determinaciones de insulina fueron cuantificadas por duplicado utilizando 100 μ l de plasma y un kit comercial para cuantificar insulina de rata (Rat Insulin RIA Kit, Linco Research Inc.) cuya sensibilidad es de 0.1 ng/ml.

En la cuantificación de SST en los distintos órganos se utilizó un kit comercial de Laboratorios Peninsula RIK-8001, que fue utilizado de acuerdo a las instrucciones del manual provisto por el Kit.

Las determinaciones de IGF-1 plasmáticas se realizaron por RIA utilizando un kit comercial.

La cuantificación de los contenidos de GH hipofisarios se realizó por RIA utilizando un kit con reactivos provistos por el Dr. Parlow bajo convenio con el National Hormone and Pituitary Program (NHHP).

Las determinaciones de Corticosterona, estradiol y testosterona fueron realizadas en una colaboración con el Core Facility del Oregon Regional Primate Research Center dirigido por el Dr, David Hess y siguiendo protocolos puestos a punto en ese laboratorio.

Las determinaciones de ACTH se realizaron en su mayoría por duplicado utilizando 100 μ l de suero y un kit comercial de Nichols Institute Diagnostics para la detección de ACTH humana en plasma por RIA cuya sensibilidad es de 1 pg/ml.

8. Paradigmas conductuales

En todos los paradigmas conductuales los ratones fueron mantenidos en jaulas con 4 individuos del mismo sexo de los dos genotipos a analizar WT y KO. Fueron utilizados ratones adultos entre 9 semanas y 3 meses de edad identificados por el número de la oreja manteniendo ciego su genotipo hasta el final del experimento. En todos los casos los animales fueron aclimatados durante una hora como mínimo en un cuarto especialmente diseñado para la realización de estos experimentos. Se usó guardapolvo como vestimenta y no se permitió la presencia de personas ajenas al experimento, ni perfumes, ni comida ni ruidos ajenos a los normalmente presentes en el cuarto. Los ratones que fueron utilizados en ensayos con shock eléctrico no fueron vueltos a utilizar en posteriores paradigmas que requirieran del uso de estímulos con electricidad. Los aparatos utilizados fueron higienizados entre los ensayos a cada ratón con isopropanol 10% y agua según el caso. Los experimentos conductuales se programaron con anticipación para no coincidir con el día de limpieza de las jaulas.

8.1 Actividad locomotora

La actividad espontánea locomotora de 8 ratones macho de cada genotipo fue ensayada en las cajas locomotoras de Med Associates durante dos días consecutivos y cada día a la misma hora. Debido a que los roedores tienen hábitos nocturnos en sus actividades, la locomoción espontánea de estos ratones fue evaluada por la noche y en ausencia de luz. Para identificar los ratones, se utilizó una luz roja similar a la luz de emergencia del bioterio de 25 Watts. Las cajas

de acrílico de 45 cm por 45 cm están ubicadas dentro de habitáculos oscuros que poseen una luz y un ventilador y un ojo desde el cual se pueden observar a los animales. Los ratones fueron ubicados dentro de estas cajas durante 1 h con la luz apagada y sus movimientos monitoreados mediante una red de rayos infrarrojos que se registraron en una computadora.

La presencia de un monitor permitió, también, visualizar la trayectoria de la actividad realizada que fue cuantificada en unidades relativas de desplazamiento horizontal y vertical.

Además se cuantificó en segundos el tiempo invertido en el movimiento y el de reposo.

Los registros fueron tomados cada 5 minutos de los 60 minutos totales. Las cajas fueron higienizadas entre mediciones utilizando isopropanol 10%. Este experimento nos permitió evaluar la motivación espontánea al movimiento en un ambiente novedoso. Como parámetro normal los animales tienen una mayor actividad en el día 1 en la primer parte del experimento disminuyendo a medida que se familiarizan con el ambiente en el que se desplazan, mientras que en el día 2, los niveles de actividad son mucho menores consecuencia de la ausencia de novedad. Por otra parte los niveles de actividad en general son mucho mayores cuando este ensayo es realizado durante la noche que durante el día. Una vez terminado el test los animales fueron devueltos a sus jaulas y al bioterio.

8.2 Laberinto elevado en cruz

El laberinto elevado en cruz consta de una cruz de acrílico de 4 brazos elevado a 0.50 m del piso por donde es posible el desplazamiento de un ratón, dos de los brazos poseen paredes de acrílico de 15 cm de altura a ambos lados que hacen de estos brazos áreas más protegidas que los que no poseen el balcón o lo tienen de escasa altura (3 cm). Los 10 ratones macho de cada genotipo fueron testeados por única vez por 5 minutos en el laberinto bajo la influencia de una luz de muy baja intensidad. En cada test se cuantificó tanto el número de entradas como el tiempo de permanencia en los espacios abiertos (brazos que no tienen el balcón) y en los

cerrados (brazos que tienen el balcón). El tiempo de permanencia así como el porcentaje de entradas en los espacios cerrados fueron tomados como parámetros indicadores de ansiedad.

8.3 Evitamiento pasivo

Antes de realizar este experimento se realizó una curva de sensibilidad al shock eléctrico de los genotipos y de los sexos utilizando distintas corrientes.

Las diferentes intensidades de corriente utilizadas fueron cuantificadas por la actitud estereotípica de los ratones en 4 grupos diferentes: caminar rápido sobre la grilla como un síntoma de molestia o cosquilleo en las patas, gritar, saltar y gritar y saltar simultáneamente. En los machos el rango de las intensidades utilizadas fue de 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 y 0.4 mA, mientras que el rango de intensidad utilizado para las hembras fue de 0.02, 0.05, 0.07, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35 y 0.40 mA. En este test se sometieron a 10 ratones de cada genotipo a cada una de las intensidades. La intensidad mínima ante la cual el animal cambió de actitud estereotípica fue promediada entre los 10 ratones de cada genotipo y los datos plasmados en un gráfico de barras para evaluar posibles diferencias en la sensibilidad de los dos genotipos al shock.

El evitamiento pasivo fue utilizado como un test para evaluar el aprendizaje asociativo entre un espacio físico y un estímulo no condicionado como un shock eléctrico (Matsuoka et al., 1994). El aparato utilizado consta de una cámara de acrílico dividida en dos compartimentos mediante una puerta. Uno de los compartimentos, desde donde se puede visualizar al ratón, es un espacio sometido a una luz intensa; el otro, un espacio totalmente oscuro cuyo piso es una grilla de metal a través de la cual se puede transmitir un shock eléctrico. En el día 1 o de adquisición del aprendizaje, los 12 ratones (hembras o machos) de cada genotipo fueron ubicados en el compartimento de la luz intensa (estímulo condicionado) y se midió el tiempo tomado por los animales en entrar al sitio oscuro (latencia). Cuatro segundos después de entrar y cuando las 4 patas del ratón estuvieron dentro del lado oscuro, la puerta divisoria fue cerrada y se aplicó al ratón un shock eléctrico (estímulo no condicionado) de 0.12 mA para las hembras y 0.18 mA

para los machos durante 3 segundos. Las intensidades de shock aplicadas fueron elegidas en función de las curvas de sensibilidad al shock. En todos los casos los ratones gritaron y corrieron en la grilla confirmando la intensidad del shock buscada. Inmediatamente después los ratones fueron devueltos a sus jaulas y luego al bioterio. Un grupo de ratones equivalente fue sometido al día 1 de entrenamiento pero a estos animales no se les aplicó el shock. En el día 2 los ratones fueron ubicados nuevamente en la cámara con la luz intensa y se midió la latencia para entrar en la cámara oscura, tomando como máximo 300 segundos. La intensidad del aprendizaje fue relacionada directamente con la latencia invertida en entrar al compartimento oscuro. El grupo control de ratones confirmó que el aumento de la latencia estaba debido a la presencia del shock.

8.4 Condicionamiento por miedo

Este paradigma ha sido utilizado como medio para distinguir entre las formas del aprendizaje exclusivamente dependientes del hipocampo (contextual) e independientes del hipocampo (con claves auditivas) (Ya Ping Tang et al., 1999). El aparato utilizado fue similar al utilizado en el test de evitamiento pasivo con dos compartimentos. Uno de ellos no fue alterado en su apariencia pero la luz no fue utilizada, mientras que el otro compartimento fue reemplazado en su apariencia por otra totalmente diferente generando un espacio físico nuevo.

Durante el día 1 los 8 ratones de cada sexo y genotipo fueron sometidos al entrenamiento inicial de aclimatación al compartimento durante 5 minutos donde se cuantificó el movimiento.

La observación se realizó cada 10 segundos y se cuantificó el número de veces en las que al mirar el ratón durante 1 seg., éste se encontraba en posición característica de “congelamiento” donde el único movimiento presente era el producto de la actividad de la respiración. Inmediatamente después de los 5 min., los animales fueron expuestos a un tono de 85 decibeles durante 30 seg. (estímulo condicionado) que fue seguido inmediatamente de un shock eléctrico por 3 seg. de 0.35 mA (estímulo no condicionado). Después de un intervalo de 1 min., útil en la consolidación de esta experiencia, la serie de sonido seguido por el shock fue repetida 3 veces más. Como confirmación de la intensidad del shock todos los ratones gritaron y

saltaron dentro del compartimento. Después del último minuto de la serie, los ratones fueron devueltos a sus jaulas y al bioterio. El test de la memoria contextual y con claves auditivas se realizó a las 24 hs (día 2); y además, 8 días mas tarde para evaluar la extinción en estos tipos de memoria. En el test los animales fueron colocados por 3 min. en el mismo compartimento que el día anterior donde recibieron el shock pero esta vez no fueron expuestos ni al sonido ni al shock.

También se contaron las veces que permanecieron en la posición característica de “congelamiento” (contextual). La observación se realizó, también, cada de 10 segundos durante los 3 minutos. Los animales descansaron por 2 hs. en el mismo cuarto pero en un sitio diferente de donde fueron aclimatados para evaluar la memoria contextual hasta el momento del test de memoria con claves auditivas. Después de las 2 hs los animales fueron transportados a un nuevo cuarto y aclimatados durante una hora adicional. Con excepción del tamaño, las características del compartimento fueron totalmente modificadas mediante el agregado de acrílico de color diferente a las paredes. Cada uno de los ratones fue colocado en el “nuevo” compartimento por 3 min. que fueron seguidos de otros 3 min. junto con la presentación de un tono de similar intensidad al presentado durante el entrenamiento. En ambos casos, se cuantificó el número de veces donde se encontró al ratón en posición de congelamiento. Cada una de las observaciones fue expresada como el porcentaje de veces donde se observó al ratón en posición de “congelamiento” respecto del total de las observaciones medidas.

RESULTADOS Y DISCUSION

Estudio de la función de la somatostatina

Análisis fenotípico de ratones mutantes deficientes en somatostatina (KO)

1. Generación y diagnóstico de animales deficientes en SST (KO)

1.1 Mutación dirigida al locus de SST por recombinación homóloga

Los ratones mutantes deficientes en SST fueron originados mediante recombinación homóloga de un vector de direccionamiento que contiene una mutación en el gen murino de la SST y unido los alelos normales de la SST presentes en las células embrionarias (ES) de ratón de la cepa 129/O1a.

La estrategia de recombinación homóloga estuvo dirigida al reemplazo del exón 1 de la SST por un minigen de resistencia a la neomicina. Debido a que en el primer exón se encuentra el sitio de iniciación de la traducción de la prepro-hormona, esta estrategia prevé la pérdida selectiva y completa de todas las formas de la SST (Figura 1).

El análisis por Southern del ADN de las células seleccionadas en presencia de G418 y ganciclovir reveló la existencia de un clon que contiene dos bandas, de 6.0 y 7.4 kb, correspondientes al alelo normal y al alelo inactivo de la SST respectivamente. La digestión del ADN con la enzima de restricción Sal I produce un fragmento de mayor tamaño (7.4 kb) en el alelo recombinante ya que incluye el minigen de reemplazo (Figura 1). Las células ES perteneciente a este clon positivo fueron inyectadas en blastocistos C57BL/6J y éstos, transferidos al útero de hembras pseudopreñadas. El desarrollo de estos blastocistos dió origen a 4 ratones quiméricos machos (C57BL/6J -129/O1a) que se aparearon con hembras C57BL/6J. Aquellas quimeras cuya línea germinal provino, al menos en parte, de las células inyectadas pudieron transmitir la mutación a la descendencia (F1). La presencia de la mutación fue evaluada en la descendencia F1 usando un análisis combinado de Southern blot y PCR.

MUTACIÓN DIRIGIDA AL *LOCUS* DE LA SOMATOSTATINA POR RECOMBINACIÓN HOMÓLOGA

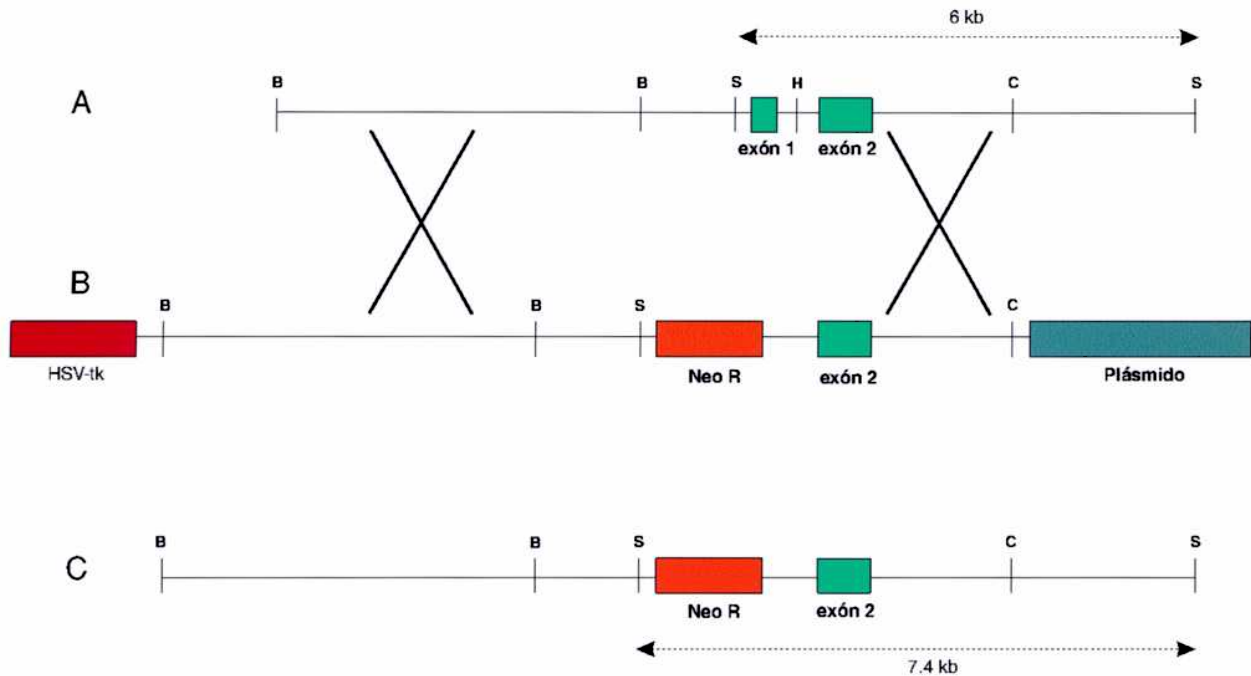


FIGURA 1. Esquema del vector de direccionamiento utilizado en la recombinação homóloga para la obtención de animales (knockout) KO del gen de SST.

En A: Locus endógeno, B: vector de direccionamiento y C: Alelo recombinado.

La presencia de zonas homólogas del gen de SST en el vector de direccionamiento permite la recombinação con uno de los alelos de la SST presentes en las células embrionarias (ES). El alelo recombinado muestra el aumento de tamaño en el fragmento de ADN producto de la incorporación estable del minigen de resistencia a neomicina cuando es cortado con la enzima de restricción Sal II. Minigen de resistencia a neomicina=Neo R; Exón 1 de SST= exón 1; Exón 2 de SST= exón 2; Gen de timidina kinasas del virus de herpes simple=HSV-tk; Sitios de restricción para diferentes enzimas BamHI=B, ClaI=C, SalI=S y HindIII=H.

Con el propósito de obtener ratones homocigotas para el alelo inactivo se hicieron los cruces de los ratones F1 heterocigotas para la mutación dando origen a la generación F2 híbrida de las cepas C57BL/6J y 129/O1a. Los animales se reprodujeron con total normalidad sin mostrar diferencias con los ratones normales en cuanto al número de crías por camada. En todos los casos la descendencia F2 fue viable y mostró la frecuencia mendeliana esperada de 1:2:1 para homocigotas (WT): heterocigotas (H) y homocigotas para la mutación (KO), respectivamente.

1. 2 Genotipificación por PCR

La genotipificación de la descendencia se realizó por PCR utilizando ADN genómico extraído de un fragmento de cola de ratón al momento del destete (3 semanas de edad). En la reacción de PCR, como se describe en la sección de Materiales y Métodos, se utilizaron 3 primers conjuntamente. El *primer 465* es compartido en las dos reacciones y complementario a una secuencia genómica 5' del exón 1 del gen de la *sst*. El *primer 460* es complementario a una secuencia que ha sido perdida en el alelo recombinado y junto con el 465 amplifican únicamente el alelo endógeno de *sst*. En cambio, el primer 465 junto con el 229 que es complementario del minigen de neomicina, amplifican sólo al alelo inactivo.

Como se muestra en la Figura 2 los productos de amplificación de la reacción fueron identificados con dos bandas, una de 0.9 y otra de 0.45 kb que corresponden al alelo normal (WT) y al alelo inactivo (KO) del gen de la SST respectivamente. La aparición de las dos bandas, por lo tanto, indica la presencia de ambos alelos (H).

GENOTIPIFICACIÓN POR PCR DE RATONES WT Y KO

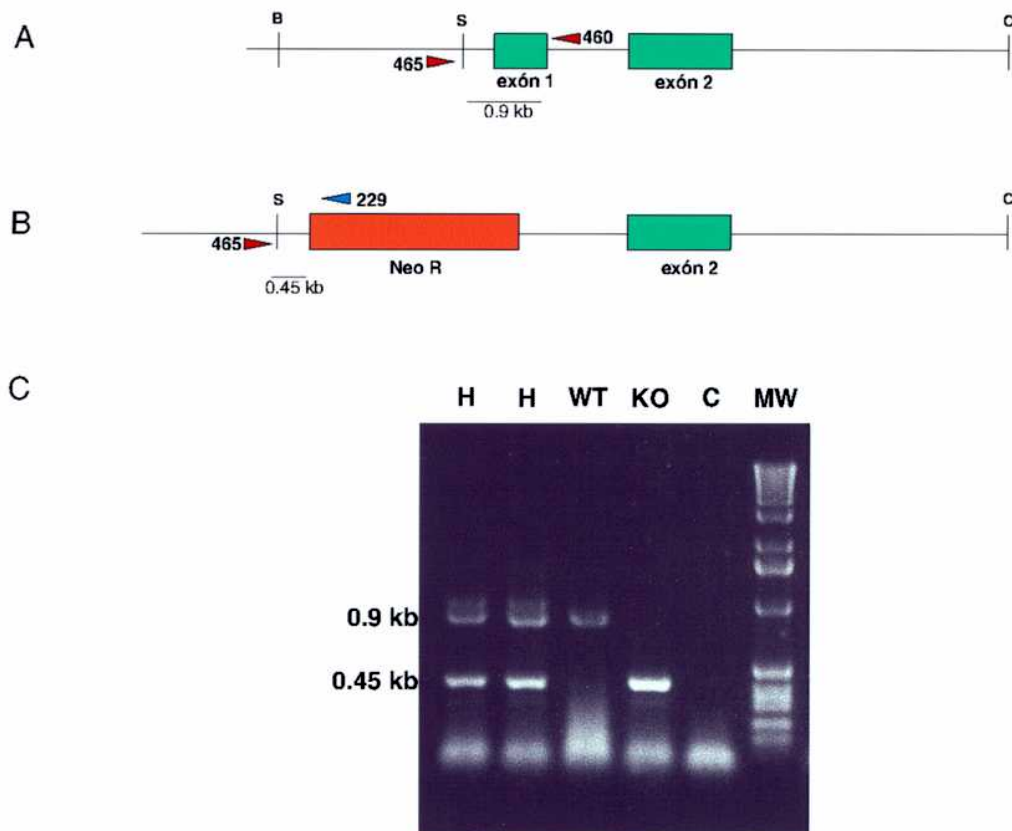


FIGURA 2: Genotipificación por PCR de ratones WT y KO.

A: Alelo endógeno con los primers 465 y 460 utilizados en la reacción de amplificación del alelo endógeno (banda de 0.9 kb) y **B:** Alelo recombinado con los primers 465 y 229 utilizados en la amplificación del alelo mutado por recombinación homóloga (banda de 0.45 kb). **C.** Resultado de la reacción de PCR visualizado en un gel de agarosa 1% con bromuro de etidio. La presencia de una banda única de 0.9 o de 0.45 kb indica homocigosis del alelo endógeno (WT) o del alelo mutado de SST (KO), respectivamente. La presencia de las dos bandas indica heterocigosis (H).

Las generaciones F2 provienen de un cruce de ratones F1 y su obtención constituye una herramienta temprana en el estudio de diferencias fenotípicas marcadas entre los animales mutantes y sus hermanos de camada normales. En rigor, el apareamiento de individuos de la F1 proporciona una descendencia con representantes de los tres probables genotipos: mutantes homocigotas, heterocigotas y normales. Las generaciones F2 están, sin embargo, constituídas por animales genéticamente muy heterogéneos producto de la mezcla del background genético (como resultado de la segregación cromosomal en los individuos F1). Para disminuir la variabilidad alélica en nuestra población de ratones, realizamos retrocruces entre los animales F1 +/- heterocigotas y ratones de la cepa C57BL/6J.

La ablación de genes en el estudio funcional de determinados locus ha sido cuestionada debido a la serie de cambios compensatorios que no son originados por la mutación en si misma, sino por la influencia en el background genético (Gerlai, 1996). Todos los experimentos presentados en esta tesis fueron realizados con ratones congénicos cruzados por 5 generaciones consecutivas con ratones de la cepa C57BL/6J (N5C57).

2. Evaluación de la presencia de somatostatina en tejidos periféricos de ratones KO

2.1 Evaluación de los contenidos de SST en cerebro, estómago e intestino

Con el objeto de evaluar el efecto de la mutación genética sobre la expresión de la SST en cualquiera de sus formas, entre ellas SST-14 y SST-28, se determinaron los niveles de proteína en tejidos de ratones WT, H y KO. Para este experimento se eligieron tejidos normalmente productores de SST como cerebro, estómago e intestino.

En los animales WT, los niveles normales de SST determinados por radioinmunoensayo se corresponden con la presencia de las dos copias funcionales de *sst*. En cambio, en los H los

niveles de SST están reducidos al 50% en los diferentes tejidos analizados acorde con la presencia del único alelo funcional del gen. Los ratones KO no presentan niveles detectables de SST (<4 pg/kg. de peso de tejido según el método de cuantificación utilizado) como se espera de las mutaciones nulas presentes en ambos alelos de la SST (Figura 3).

2.2 Expresión de SST y, hormonas y péptidos en el páncreas

La presencia de SST fue investigada más profundamente en el páncreas donde controla la secreción de otras hormonas como la insulina y el glucagon, importantes en el mantenimiento de los niveles plasmáticos de glucosa. La localización de SST y otros péptidos normalmente presentes en el páncreas endócrino se analizó mediante inmunohistoquímica en cortes seriados de tejido incluídos en parafina y utilizando anticuerpos específicos . De acuerdo a lo esperado, las células productoras de SST de los islotes de Langerhans de ratones WT mostraron la presencia del péptido en células δ . En cambio, ninguna señal fue detectada en secciones equivalentes provenientes de animales KO aportando una evidencia adicional de la ausencia de SST en el tracto gastrointestinal.

Mediante técnicas inmunohistoquímicas también se investigó la presencia de otras hormonas y péptidos gastrointestinales (insulina, glucagon y neuropéptido Y) cuya liberación está controlada por la SST pancreática. La utilización de cada uno de los anticuerpos anti-insulina, anti-glucagon y anti-neuropéptido Y en secciones de páncreas mostró un patrón de tinción idéntico para los genotipos WT y KO. También resultaron idénticas la distribución y el número de los distintos tipos celulares presentes en los islotes de Langerhans (Figura 4).

Estas observaciones parecen contradecir, a priori, las evidencias experimentales que indican la importancia de la SST en el control de la liberación de péptidos y hormonas pancreáticos, sugiriendo la importancia profundizar mas detalladamente la participación de la SST en la dinámica de los procesos de secreción en el páncreas.

CONTENIDOS DE SOMATOSTATINA EN ESTÓMAGO, INTESTINO Y CEREBRO DE RATONES WT Y KO.

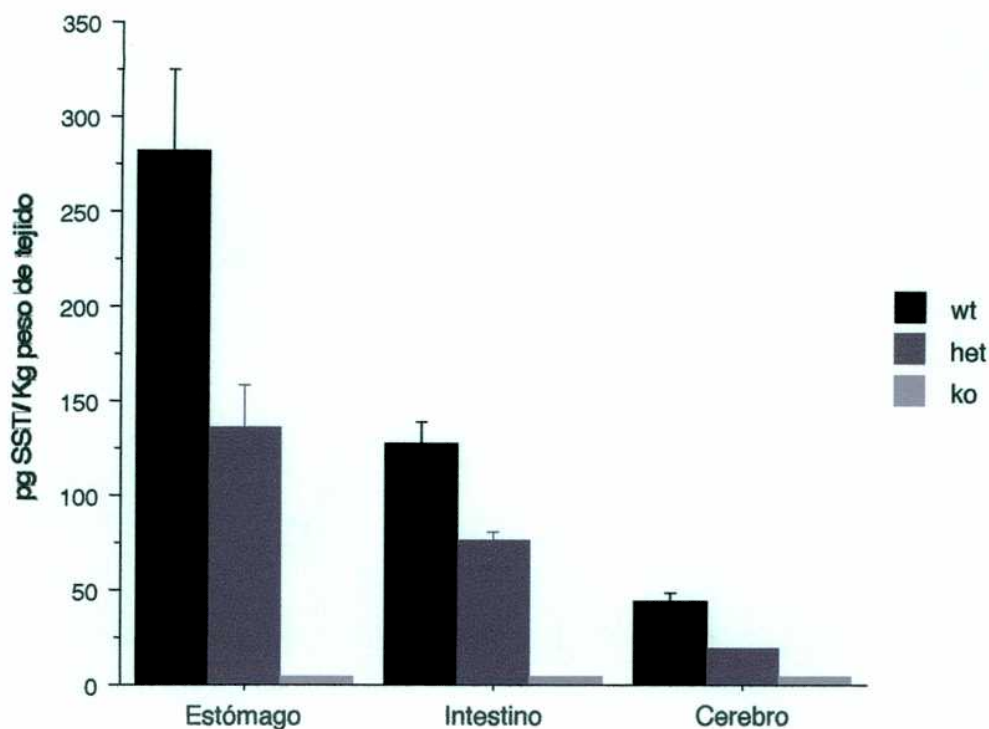


FIGURA 3. Contenidos de somatostatina en cerebro, intestino y estómago en ratones WT, H y KO de la cepa híbrida F2 (129,C57).

Las barras representan el promedio \pm error estándar de 6 determinaciones por genotipo.

Las concentraciones de SST fueron cuantificadas por RIA en animales de los tres genotipos WT, H y KO. En los animales WT, los contenidos de SST, se corresponden con la presencia de las dos copias funcionales del gen de SST. Los H, que tienen solo una copia funcional del gen, presentan una disminución del 50% en los niveles de SST mientras que los KO que no tienen ninguna copia del gen funcional no presentan niveles detectables de SST (<4 pg proteína /kg de peso de tejido).

EXPRESIÓN DE SST, INSULINA, GLUCAGON Y NPY EN LOS ISLOTES DE LANGERHANS DE RATONES WT Y KO

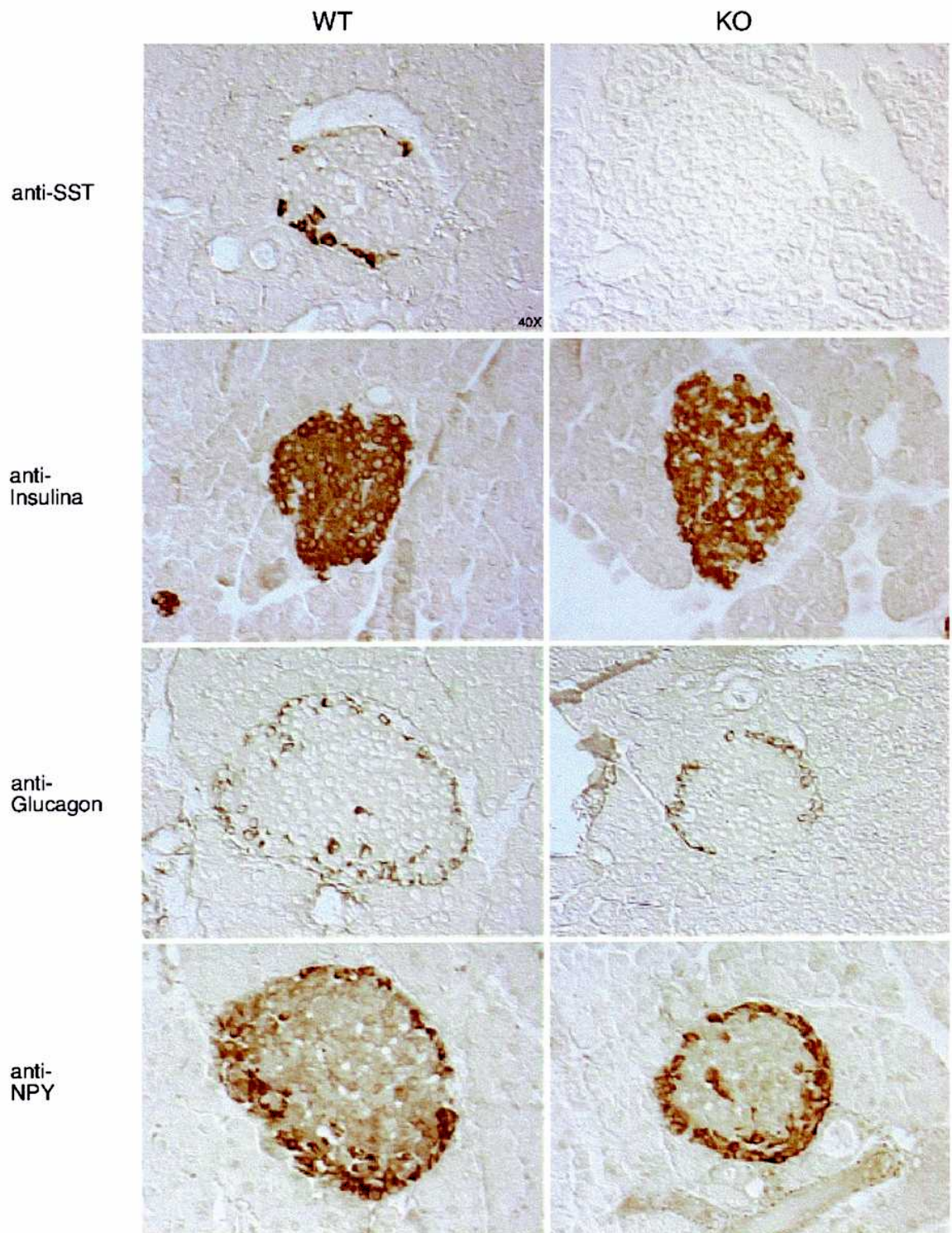


FIGURA 4. Inmunohistoquímica de páncreas de ratones WT y KO utilizando anticuerpos específicos anti-SST, anti-insulina, anti-glucagon y anti-NPY (neuropéptido Y). 40X

La inmunohistoquímica se realizó en cortes seriados de páncreas incluido en parafina con un protocolo estándar de tinción con anticuerpos según se describe en la sección de Materiales y Métodos.

Los patrones de tinción utilizando los distintos anticuerpos no mostraron diferencias cuando fueron comparados entre los dos genotipos WT y KO, sugiriendo que la ausencia de SST no promueve alteraciones morfológicas ni en la distribución ni en el número de células del páncreas endócrino.

2.3 Efecto de la ausencia de SST en la liberación de insulina

Para evaluar el posible efecto de la SST en la liberación de insulina considerando el papel fundamental que desempeña en la homeostasis de la glucosa, se determinaron las concentraciones plasmáticas de glucosa e insulina en animales adultos ayunados y en condiciones de alimentación *ad libitum*. Los experimentos se realizaron en dos días consecutivos y se utilizaron 5 animales por sexo y genotipo. El primer día, se tomaron las muestras por punción cardíaca de los ratones ayunados durante 16 horas. Después de la anestesia los ratones fueron devueltos a sus jaulas y alimentados *ad libitum* hasta la mañana siguiente cuando fueron decapitados para coleccionar la sangre. En cada toma de muestra se registró la concentración de glucosa mediante un Glucotest y se reservó el plasma para la cuantificación de insulina por RIA. También se recolectaron datos sobre la longitud de los ratones, el peso corporal y peso del hígado con el objeto de evaluar posibles efectos tróficos. Los niveles plasmáticos de glucosa e insulina en sangre (Figura 5 A y B) muestran que existe un efecto significativo en el estado alimentario que eleva las concentraciones de glucosa de los animales alimentados *ad libitum* en comparación con los ayunados durante 16 horas. Si embargo, las concentraciones de glucosa y de insulina en plasma, no mostraron diferencias significativas cuando se compararon los dos genotipos WT y KO, sugiriendo que la homeostasis basal de glucosa no se encuentra afectada por la ausencia de SST.

NIVELES DE GLUCOSA E INSULINA PLASMÁTICAS EN CONDICIONES DE AYUNO Y DE ALIMENTACION *AD LIBITUM* EN RATONES WT Y KO

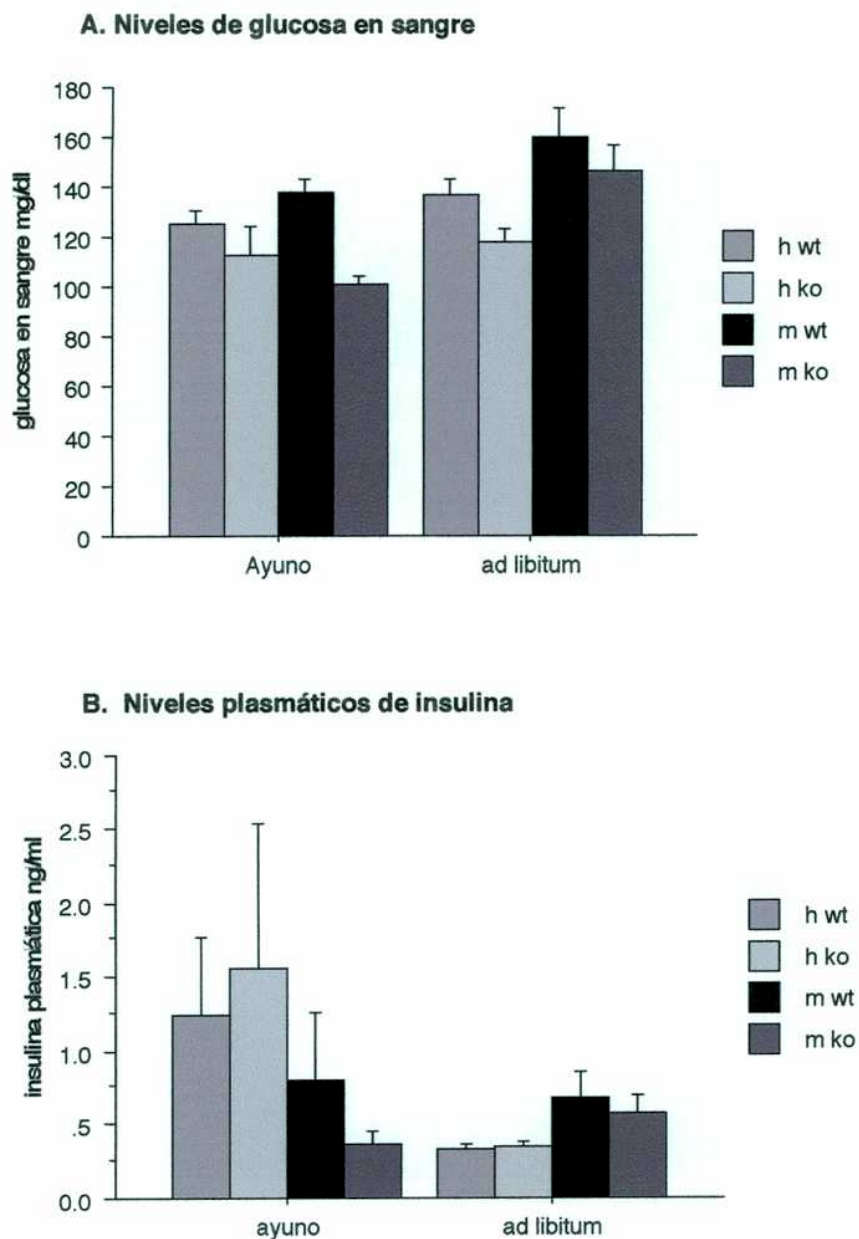


FIGURA 5. A. Niveles de glucosa en sangre y B. Niveles de insulina plasmática en ratones WT y KO en condiciones de ayuno y de alimentación *ad libitum*.

FIGURA 5. A. Niveles de glucosa en sangre y B. Niveles de insulina plasmática en ratones WT y KO en condiciones de ayuno y de alimentación *ad libitum*.

Las barras representan el promedio \pm el error estándar de 5 determinaciones por sexo y genotipo.

Hembras WT=h wt; hembras KO=h ko; machos WT= m wt y machos KO=m ko.

Para realizar este experimento se utilizaron 5 ratones adultos (3 meses de edad) por sexo y genotipo en condiciones de ayuno durante las 16 horas previas al experimento. Las muestras del día 1 (condición de ayuno) se tomaron por punción cardíaca. Después de la anestesia los ratones fueron devueltos a sus jaulas donde se alimentaron *ad libitum* hasta la mañana siguiente. En la mañana del día 2 fueron decapitados para colectar las muestras de sangre (condición *ad libitum*) . En cada muestra se registró la concentración de glucosa en sangre mediante un Glucotest y se reservó el plasma para la cuantificación de insulina por RIA. Los niveles plasmáticos de glucosa en sangre mostraron la presencia de un efecto significativo en el estado alimentario ayuno vs. *ad libitum* en todos los grupos analizados,(ANOVA, $p < 0.01$, análisis de Fisher) pero no se observaron diferencias significativas ni en los niveles de insulina plasmática ni en los niveles de glucosa en sangre cuando se compararon los dos genotipos WT y KO, sugiriendo que la homeostasis basal de glucosa no está afectada por la ausencia de SST.

3. Evaluación de la presencia de somatostatina en el sistema nervioso central

3.1 Expresión de SST y GHRH en el hipotálamo

La presencia de SST hipotalámica se analizó por IHQ en cortes coronales de cerebro de ratón. Los cerebros perfundidos con paraformaldehído 4% se cortaron cada 50 µm en un vibrátomo priorizando áreas donde normalmente se expresa la SST como por ejemplo el hipotálamo, el hipocampo y la corteza cerebral.

La tinción con anticuerpos específicos anti-SST en las secciones de cerebro confirmó la ausencia de la proteína en los ratones KO en un marcado contraste con su presencia en los núcleos para- y periventricular, núcleo arcuato y núcleo ventro medial del hipotálamo de los animales WT (Figura 6). La utilización del anticuerpo preadsorbido con SST sintética no mostró inmunorreactividad positiva en el hipotálamo de los animales WT ni en otras áreas del cerebro como la corteza (Cx), el hipocampo (Hip) y la amígdala (Am).

Estas pruebas permitieron determinar la especificidad del anticuerpo utilizado , descartando a la vez, la posible presencia de reacciones cruzadas con péptidos estructuralmente relacionados con la SST como la cortistatina (cuya expresión no está alterada en estos animales).

Respecto de los posibles efectos secundarios derivados de una alteración en la síntesis de SST en el SNC en los animales KO, se investigó la expresión de la hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH). Como se describe en la Introducción de esta tesis, la SST y GHRH son los factores hipotalámicos que controlan la secreción de la hormona de crecimiento en la hipófisis. La presencia de los receptores SSTR1 y SSTR2 en el núcleo arcuato y los contactos sinápticos entre las neuronas del arcuato (productoras de GHRH) y del núcleo periventricular (productoras de SST) son evidencias que sugieren que el control de la secreción hipofisaria de GH estaría previamente concertado por estos dos neuropéptidos hipotalámicos (Zheng et al., 1997; Zhang et al., 1999; Bertherat et al., 1992; Tannenbaum et al., 1998). En tal sentido, una alteración en el número de neuronas de GHRH o en la síntesis del péptido podría compensar la falta de la SST hipotalámica .

Para analizar esta posibilidad se tiñeron cortes coronales de cerebro de ratones normales y mutantes con un anticuerpo anti-GHRH. Las observaciones al microscopio óptico de las secciones teñidas no mostraron alteraciones obvias entre los genotipos WT y KO ni en el número de células positivas de GHRH en el núcleo arcuato (NArc) ni en las fibras del núcleo dorsomedial (NDM) del hipotálamo (Figura 6), descartando, un efecto compensatorio evidente de GHRH en los ratones KO.

EXPRESIÓN DE SST Y GHRH EN EL HIPOTÁLAMO DE RATONES WT Y KO

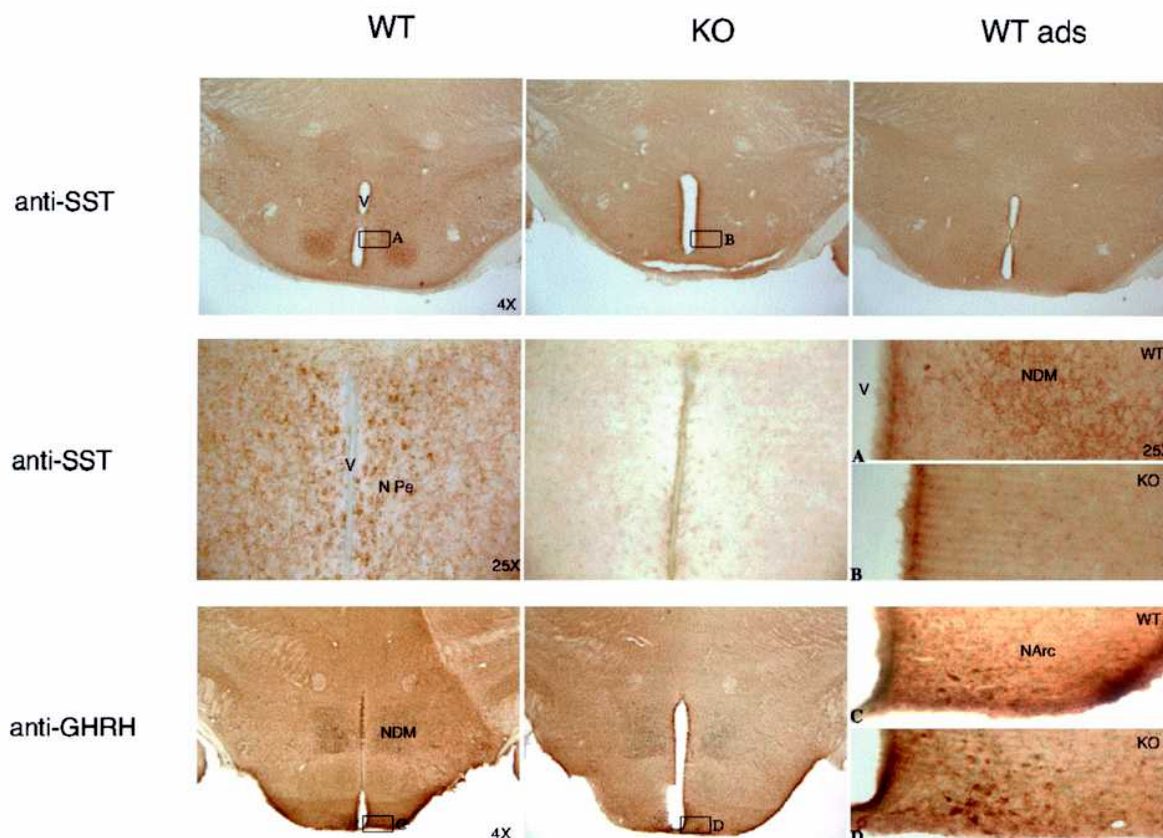


FIGURA 6: Inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebro de ratones WT y KO .

Los cerebros de ratones WT y KO fueron fijados mediante perfusión con PFA 4% y cortados en vibrátomo. Las secciones de 50 μ m fueron incubadas con anticuerpos específicos anti-SST, anti-GHRH y anti-SST adsorbidos (anti-SST ads) con SST sintética, y reveladas con el uso de un anticuerpo secundario biontinilado y un sistema de amplificación avidina-biotina acoplado a peroxidasa, según el protocolo descrito en la sección de Materiales y Métodos. Para la tinción con GHRH los ratones fueron inyectados i.c.v con Colchicina 48 hs antes de la perfusión.

La adsorción del anticuerpo anti-SST se realizó en presencia del péptido sintético durante 24 hs a 4 C.

La reacción con un anticuerpo específico anti-SST reveló la presencia de SST en las fibras del núcleo ventro medial (NVM, 4X) y fibras y cuerpos celulares en el núcleo periventricular (NPe, 25X) del hipotálamo en los ratones WT en contraste con los ratones KO que mostraron la ausencia de SST.

Los ratones WT incubados con el anticuerpo anti-SST previamente adsorbido con SST sintética mostraron, también, la ausencia de SST, confirmando la especificidad del anticuerpo utilizado.

La utilización de un anticuerpo anti-GHRH reveló la expresión característica del péptido en las fibras del núcleo dorsoventral (NDV) y las células del núcleo arcuato (NArc) en los ratones WT y KO, sugiriendo la ausencia de diferencias evidentes en la expresión de GHRH entre los dos genotipos. En A,B,C y D se muestran secciones ampliadas de las áreas delimitadas por el recuadro. A y B núcleo ventro medial (NVM) de las fibras productoras de SST en ratones WT y KO, respectivamente. En C y D células teñidas con GHRH en el núcleo arcuato de ratones WT y KO, respectivamente.

3.2 Expresión de SST y marcadores estructurales y neuroanatómicos en amígdala e hipocampo

Con el fin de determinar si la ausencia de la SST es responsable de alteraciones morfológicas en distintas áreas del cerebro se realizó un análisis inmunohistoquímico con una batería de anticuerpos ampliamente utilizados en el análisis ontogénico de varios sistemas funcionales del SNC (Baimbridge et al., 1992).

Las proteínas calbindina, parvalbúmina y calretinina son altamente solubles y su presencia permite la detección aún en procesos muy delgados de las neuronas facilitando los estudios anatómicos y de distribución neuronal. En general, la expresión de estas proteínas está segregada en distintas subpoblaciones celulares y por esta razón, el uso combinado de anticuerpos contra las proteínas calbindina, parvalbúmina y calretinina permite observar el desarrollo de distintas estructuras cerebrales y evidenciar la presencia de zonas anormales. De esta manera, la ausencia en la expresión de alguna de estas proteínas en una estructura donde se expresa normalmente así como su presencia en una estructura donde está normalmente ausente podría ser interpretada como una evidencia de anormalidad.

Como se observa en la Figura 7 el patrón de tinción en cortes de hipocampo y corteza cerebral (7 A) y amígdala (7 B), resultó idéntico entre los dos genotipos WT y KO. La ausencia de alteraciones en la anatomía cerebral y los circuitos neuronales colinérgicos también fueron confirmados mediante la tinción de Nissl y un anticuerpo dirigido contra la enzima Acetilcolinesterasa (AChE), respectivamente.

Estos resultados no mostraron diferencias entre los genotipos WT y KO.

EXPRESIÓN DE SST Y DISTINTOS MARCADORES ESTRUCTURALES EN CORTEZA E HIPOCAMPO DE RATONES WT Y KO

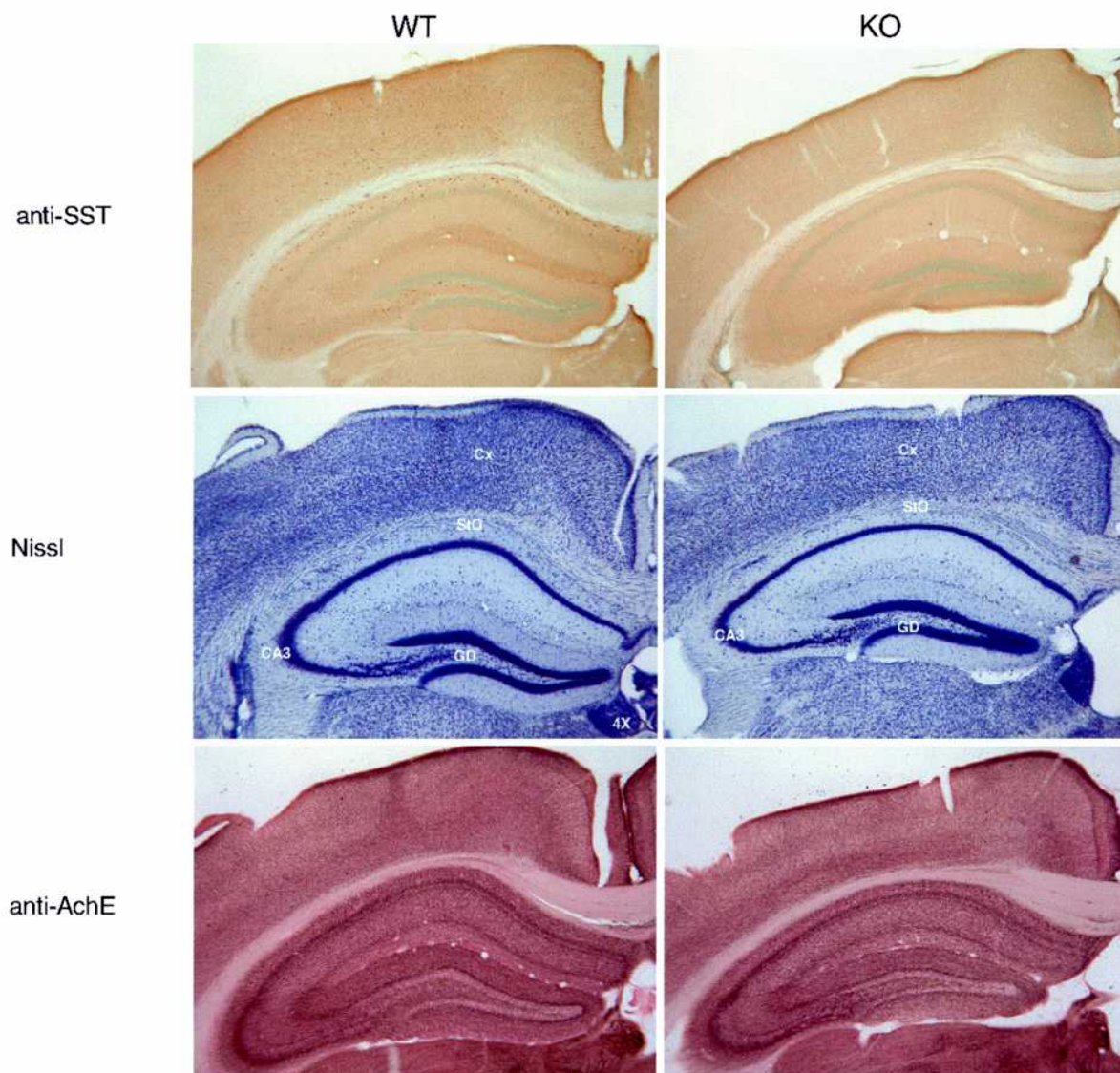


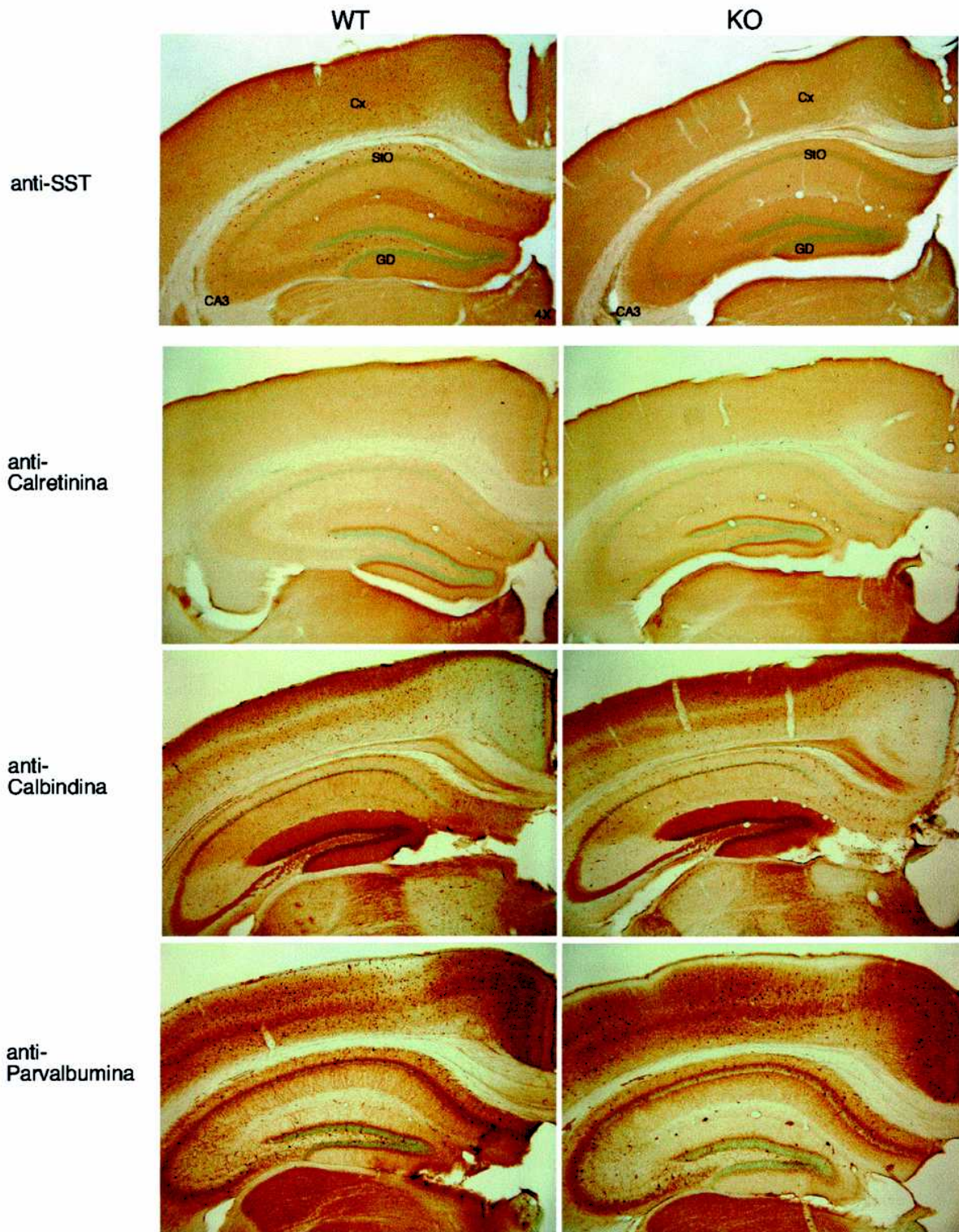
Figura 7. Expresión de SST y distintos marcadores estructurales en la corteza y el hipocampo de ratones WT y KO.

La presencia de alteraciones morfológicas en la corteza y el hipocampo de los ratones WT y KO fue analizada por inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebro utilizando anticuerpos específicos contra una batería de proteínas que se expresan diferencialmente en distintas estructuras cerebrales. Los cerebros se fijaron con PFA 4% y se cortaron en secciones de 50 μ m con el uso de un vibrátomo. La tinción con los anticuerpos anti calretinina, anti-parvalbúmina, anti-calbindina y anti-SST se realizó mediante un protocolo estándar de inmunohistoquímica según se describe en la sección de Materiales y Métodos. La reacción fue revelada mediante la utilización de anticuerpos secundarios biotinilados y un sistema de amplificación de avidina-biotina acoplado a peroxidasa.

La anatomía de la corteza y el hipocampo fue evaluada con la tinción de Nissl y los circuitos colinérgicos mediante el uso de un anticuerpo específico dirigido contra la acetilcolinesterasa (anti-AchE).

Las secciones de animales WT y KO teñidas con los diferentes anticuerpos utilizados como marcadores estructurales no mostraron alteraciones morfológicas obvias entre los genotipos WT y KO.

La tinción con anti-SST, muestra la presencia de la SST en las células piramidales del *Stratum Oriens* y las células del giro dentado (GD) del hipocampo y en las capas de la corteza cerebral (Cx) en los ratones WT y la ausencia de la proteína en los ratones KO.



EXPRESIÓN DE SST Y DISTINTOS MARCADORES ESTRUCTURALES EN AMIGDALA DE RATONES WT Y KO

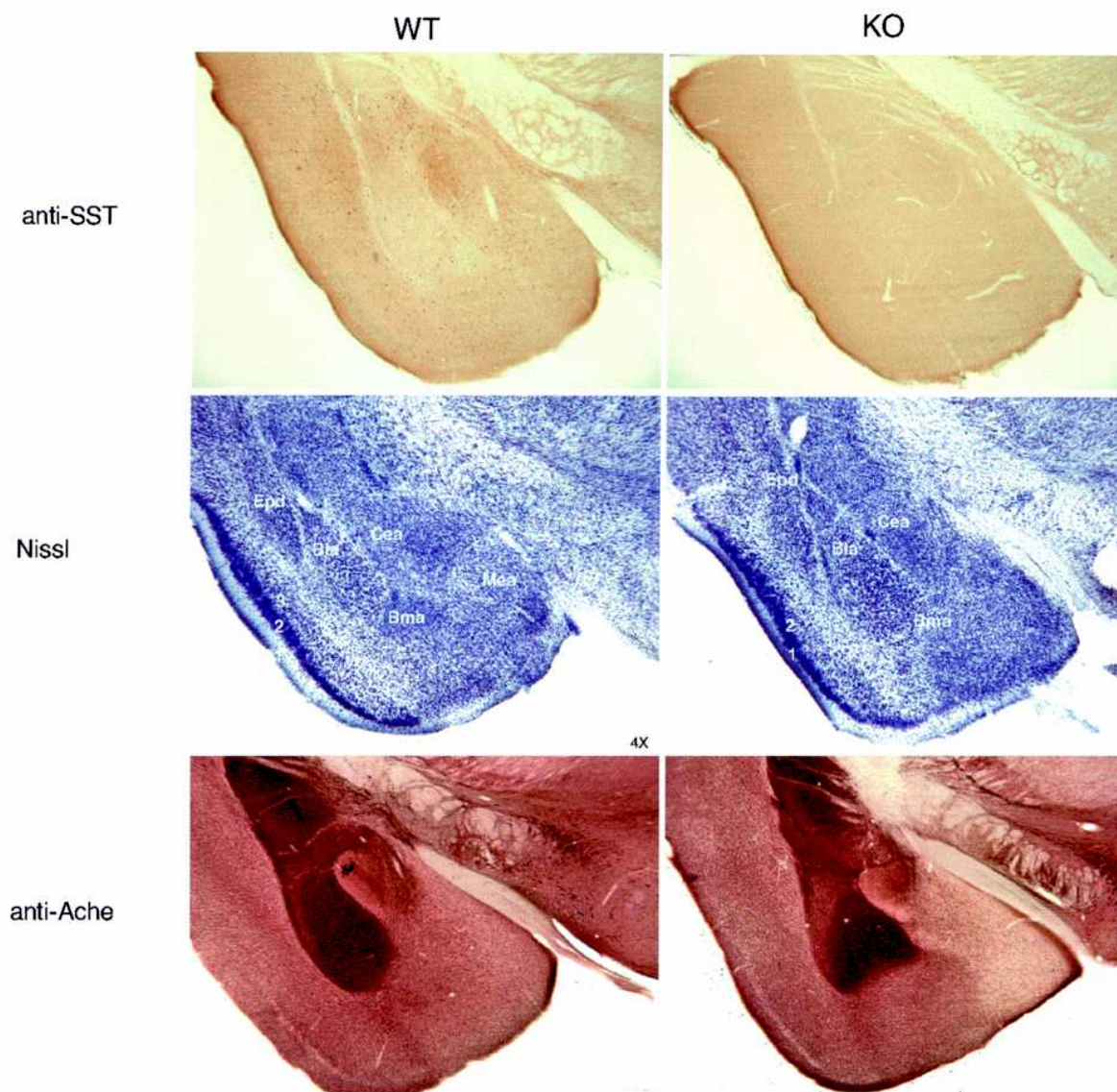
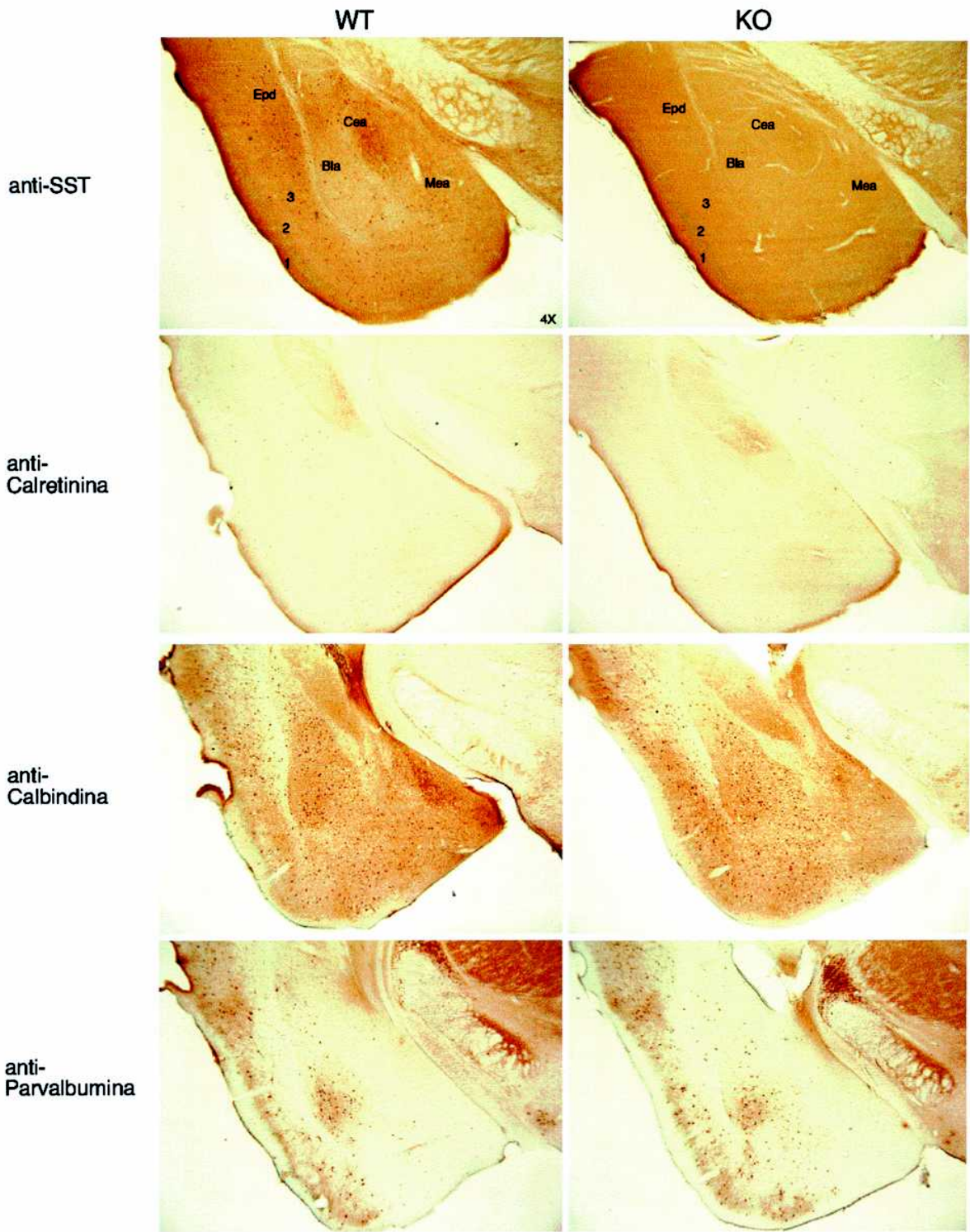


Figura 7. Expresión de SST y distintos marcadores estructurales en la amígdala de ratones WT y KO.

La presencia de alteraciones morfológicas en la amígdala de los ratones WT y KO fue analizada por inmunohistoquímica en cortes coronales de cerebro utilizando anticuerpos específicos contra una batería de proteínas que se expresan diferencialmente en distintas estructuras cerebrales. Los cerebros se fijaron con PFA 4% y se cortaron en secciones de 50 μ m con el uso de un vibrátomo. La tinción con los anticuerpos anti calretinina, anti-parvalbúmina, anti-calbindina y anti-SST se realizó mediante un protocolo estándar de inmunohistoquímica según se describe en la sección de Materiales y Métodos. La reacción fue revelada mediante la utilización de anticuerpos secundarios biotinilados y un sistema de amplificación de avidina-biotina acoplado a peroxidasa.

La anatomía de la amígdala fue evaluada con la tinción de Nissl y los circuitos colinérgicos mediante el uso de un anticuerpo específico dirigido contra la acetilcolinesterasa (anti-AChE).

Las secciones de animales WT y KO teñidas con los diferentes anticuerpos no mostraron alteraciones morfológicas ni neuroanatómicas obvias entre los genotipos WT y KO. La tinción con anti-SST muestra la presencia de SST en los núcleos basolateral (Bla), central (Cea) y medial (Mea) de la amígdala y en el núcleo endopiriforme (Epd) de los ratones WT y la ausencia de la proteína en los ratones KO. En 1, 2 y 3 se muestran las capas de la corteza.



En resumen, los resultados obtenidos mediante RIA y los estudios inmunocitoquímicos presentados hasta aquí nos permiten concluir que:

La SST se encuentra ausente en el sistema nervioso central y en los tejidos periféricos analizados como estómago, intestino delgado y páncreas de los ratones KO. En comparación, los ratones WT muestran la marcada presencia de la hormona en las células piramidales del Stratum Oriens y el giro dentado del hipocampo, las láminas de la corteza cerebral y la amígdala, el núcleo periventricular y el núcleo ventro medial del hipotálamo en el sistema nervioso central y en los islotes de Langerhans del páncreas. La falta de alteraciones evidentes en el patrón de expresión de los marcadores estructurales y neuroanatómicos, así como los de circuitos colinérgicos de los ratones KO sugiere que la ausencia de SST no incide en el normal desarrollo morfológico de estructuras del sistema nervioso central y del páncreas. Sin embargo, este análisis está limitado sólo a una evaluación morfológica y de él no puede desprenderse información acerca de la integridad en el funcionamiento de los sistemas en estudio.

Por otra parte, el análisis inmunocitoquímico utilizando anticuerpos anti-GHRH no muestra diferencias evidentes entre los genotipos WT y KO cuando se evalúa la presencia de GHRH en las fibras del núcleo dorso medial y el número de células productoras de GHRH en el núcleo arcuato del hipotálamo. Estas evidencias indicarían la ausencia de un efecto compensatorio evidente por parte de las neuronas productoras de GHRH en los ratones que carecen de SST. En su lugar, podrían estar afectados los niveles de síntesis y/o liberación de GHRH como consecuencia de la presencia de receptores de SST en estas neuronas.

Por último, la homeostasis basal de la glucosa es mantenida aún en ausencia de SST como se deduce de los niveles normales de glucosa e insulina plasmáticas presentes en los ratones KO. Estos resultados parecerían contradecir las numerosas evidencias donde se define a la SST como el regulador negativo de la secreción de hormonas pancreáticas como la insulina y el glucagón. En este sentido, estudios adicionales como el test de tolerancia a la glucosa y de

resistencia a la insulina en ratones que carecen de SST podrían sumar información acerca de la función de la SST en la fisiología pancreática.

4. Evaluación del efecto de la ausencia de SST en el eje hipotalámico-hipofisario-somatotrópico

El crecimiento corporal es un proceso orquestado por una serie de eventos que culminan en el desarrollo de un individuo maduro. El peso, la longitud del cuerpo, la longitud de los huesos y hasta los procesos de diferenciación, entre ellos la diferenciación sexual, son parámetros que se atribuyen al crecimiento.

Muchos de estos procesos que son controlados por la hormona de crecimiento, no dependen de un aumento o disminución de sus niveles plasmáticos medios sino más bien de la frecuencia con que es liberada desde la hipófisis. Tanto el crecimiento somático como la expresión de determinadas proteínas en el hígado parecen estar controladas por el patrón secretorio de GH (Jansson et al., 1985; Norstedt et al., 1985).

La experiencia gonadal durante la etapa embrionaria es fundamental en el establecimiento de los patrones de secreción de GH, sin embargo el mecanismo por el cual los esteroides gonadales ejercen sus efectos sobre la pulsatilidad de la liberación de GH no ha sido resuelto hasta el momento (Chowen et al., 1996). El nivel transcripcional de la SST en las neuronas de los núcleos periventricular y arcuato del hipotálamo está controlado por esteroides sexuales, como los andrógenos (Argente et al., 1993) sugiriendo la potencial participación de la SST en el establecimiento de los patrones de secreción de GH (Argente et al., 1993).

En el contexto de estas consideraciones la utilización de un ratón mutante que no produce SST presenta una oportunidad única para el estudio de la función de esta hormona en la fisiología del eje hipotalámico-hipofisario-somatotrópico

4.1 Evaluación del peso y la longitud corporal como parámetros del crecimiento de ratones WT y KO

La observación fenotípica de los primeros descendientes F2 resultó en la sorprendente ausencia de gigantismo en los ratones deficientes de SST. Los ratones WT, H y KO de estas camadas fueron indistinguibles entre sí luego de pesarlos al destete, manteniéndose el dimorfismo sexual en los 3 genotipos.

Estas observaciones fueron confirmadas más tarde en los N5C57. Las primeras evaluaciones del peso y longitud corporal fueron realizadas en animales adultos y confirmaron la ausencia de aumento en el tamaño de los ratones que carecen de SST respecto de sus hermanos WT Figura 8 (A y B). El análisis se completó con el estudio del peso de un tejido sexualmente dimórfico como el hígado. Estos resultados, también, mostraron una diferencia significativa en el peso del hígado entre los sexos a pesar de no observarse diferencias en el peso de este órgano entre los genotipos WT y KO (Figura 8 C).

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN FUNCIÓN DEL PESO CORPORAL Y EL PESO DEL HÍGADO DE RATONES WT Y KO

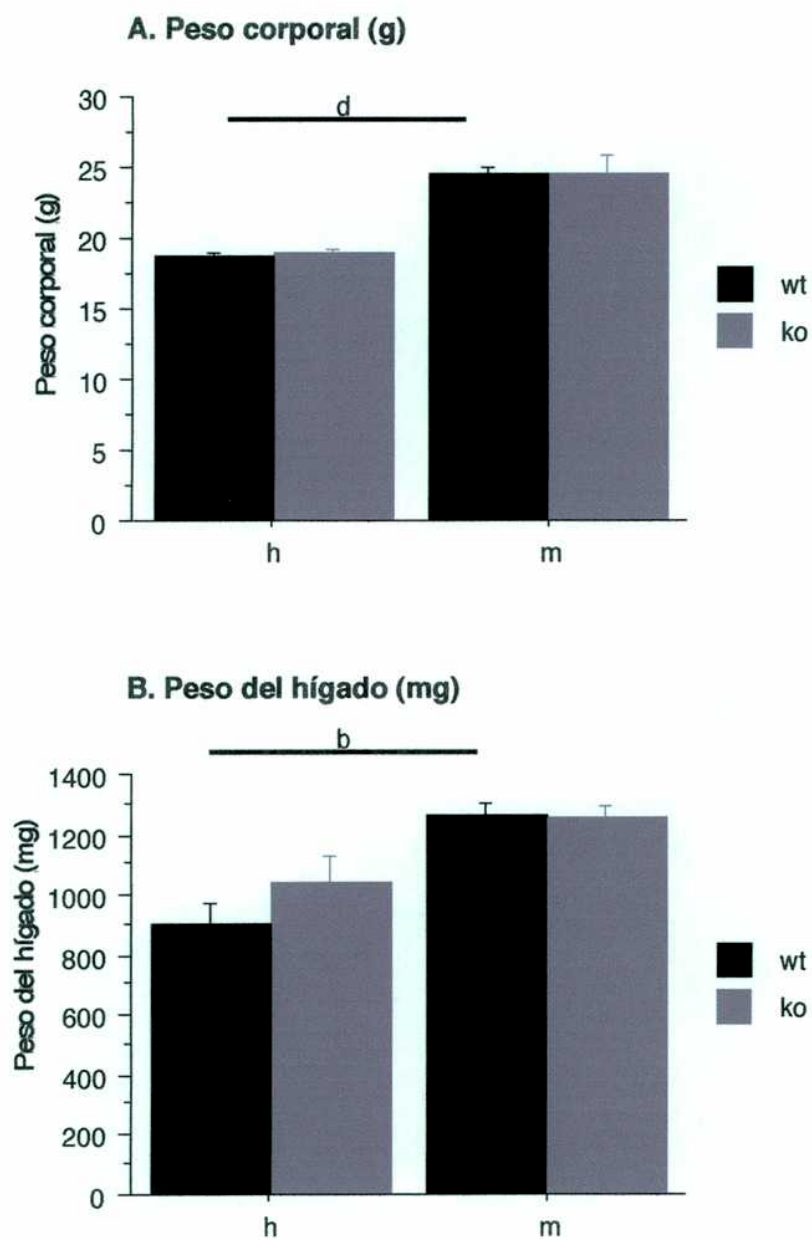


FIGURA 8: A. Peso corporal (g) y B. Peso del hígado (mg) en ratones adultos WT y KO. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 5 animales por sexo y genotipo

EVALUACIÓN DEL CRECIMIENTO EN FUNCIÓN LA LONGITUD CORPORAL DE RATONES WT Y KO

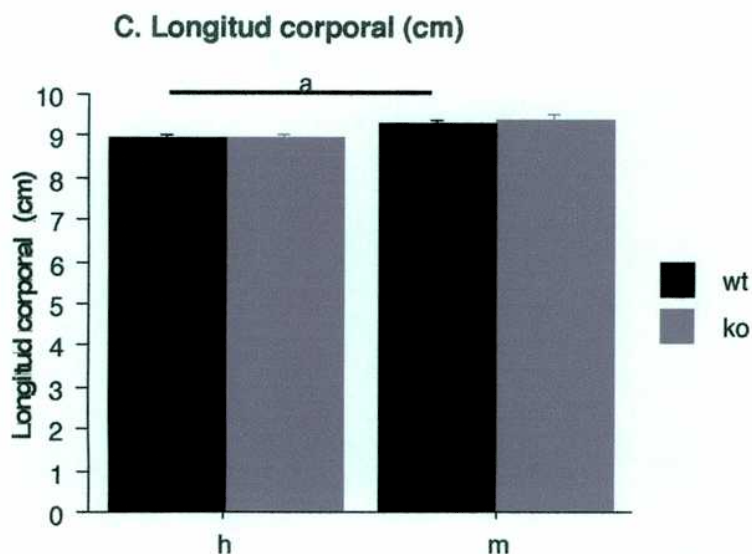


FIGURA 8. Evaluación del crecimiento en función del peso y la longitud corporal de ratones WT y KO.

En A. Peso corporal y B. Peso del hígado y C. Longitud del cuerpo en animales adultos WT y KO. Las barras representan el promedio \pm error estándar de 5 animales por sexo y genotipo.

Hembras WT=h wt; hembras KO=h ko y machos WT=m wt; machos KO=m ko.

El análisis de cada uno de los parámetros evaluados muestra un efecto significativo debido a la presencia del “dimorfismo sexual” (ANOVA, $a=p<0.05$, $b=p<0.01$ y $d=p<0.0001$, análisis de Fisher).

No se encontraron diferencias significativas cuando se compararon los ratones WT y KO.

La ausencia de gigantismo en los ratones KO fue estudiada con mas detalle en la cepa congénica N5C57. Las nuevas camadas de ratones se pesaron semanalmente después del destete con el objeto de investigar la evolución del crecimiento en función de la ganancia de peso corporal durante las primeras semanas de vida hasta la adultez (Figura 9 A). En una etapa posterior el seguimiento del peso continuó quincenalmente con los mismos animales hasta el año de edad como muestra la Figura 9 B.

El análisis del efecto de la ausencia de SST en el crecimiento fue completado con la evolución en el crecimiento longitudinal. Los ratones se anestesiaron y se midió la longitud del cuerpo al momento del destete (3 semanas), en la madurez (9 semanas) y en animales adultos de 6 meses de edad (24 semanas) Figura 9 C. Las medidas fueron tomadas desde el ano hasta el hocico con el fin de evitar las diferencias provenientes en la longitud de la cola utilizada para la genotipificación de los ratones.

Los resultados muestran un efecto significativo en todos los parámetros analizados debido a la presencia del dimorfismo sexual (ANOVA, $a=p<0.05$ y $d=p<0.0001$, análisis de Fisher's PLSD), sin encontrarse diferencias entre los genotipos WT y KO. Sólo el análisis *post hoc* de la curva de los individuos adultos mostró diferencias significativas entre los machos WT y KO (ANOVA, $a=p<0.05$, Fisher's PLSD).

La curva de crecimiento durante las primeras semanas de vida (Fig 9 A) evidenció la presencia del dimorfismo sexual a partir de la 5ª semana donde la velocidad de crecimiento de los machos superó la de las hembras. Este hecho puede explicarse por la convergencia de una serie de eventos que concluyen en la aparición de la pubertad.

Durante el período previo a la pubertad (de los 5 a los 10 días del nacimiento) los machos poseen mayor número de células y mayor expresión de GHRH en el NARc que las hembras como resultado de la acción de la testosterona durante el desarrollo (Argente et al., 1993). A pesar que las neuronas de GHRH ya están definidas en número a los 5 días de vida, todavía son funcionalmente inmaduras como se desprende de la observación de su tamaño. La madurez

funcional de estas neuronas está relacionada por un lado, con su tamaño y por otro, con la capacidad de responder a determinados estímulos.

Los elevados niveles de GH plasmática presentes en los embriones y los recién nacidos pueden ser explicados en función de la ausencia de neuronas productoras de GHRH maduras cuya secreción está libre de cualquier acción inhibitoria (Jansson et al., 1985).

El número de neuronas y la expresión de SST en el NPe están también, afectados por la testosterona en los machos durante el desarrollo postnatal y sus niveles aparecen muy aumentados poco tiempo antes de la aparición de la pubertad (a los 20 días), mientras que los niveles de las hembras permanecen estables. La SST que se expresa en el NArc también sufre un incremento significativo antes de la pubertad. A pesar de estar presente ya en el 5 día de vida, el número de fibras y el contenido de SST en el NArc se incrementan abruptamente antes de la pubertad en coincidencia con la aparición de un pico de testosterona en el día 18 (Weisz et al., 1980).

En la aparición de la pubertad, las células de GHRH están maduras y los niveles de GHRH disminuyen conforme aumentan los de SST en el NArc sugiriendo, que la acción supresora de la SST sobre las neuronas de GHRH en el NArc es necesaria para establecer el patrón secretorio definitivo de GH en la hipófisis. La GHRH resultante liberada desde el NArc podría, entonces, modular un incremento en el número de somatotrofos y , así, la secreción de GH desde la hipófisis (Nurhidayat et al.,1999). Esta hipótesis ha sido avalada por una serie de evidencias como la presencia de SSTRs en las neuronas del arcuato productoras de GHRH (Tannenbaum et al.,1998; Zheng et al.,1997) y por la expresión sexualmente dimórfica de estos SSTRs en el NArc y en la hipófisis (Zhang et al.,1999).

En las hembras, en cambio, el control negativo de la secreción de GH no parece estar mediado por la acción supresora de la SST sobre las neuronas NArc. Por un lado, porque las neuronas productoras de SST del NPe y del NArc no poseen receptores a estrógenos y por lo tanto los niveles transcripcionales de SST permanecen estables. Por otro lado, porque la

presencia de receptores a estrógenos está limitada a algunas células productoras de GHRH en el arcuato (20%) y a los somatotrofos (80%) en la hipófisis sugiriendo que el control inhibitorio de la secreción de GH es ejercido por la SST directamente sobre la glándula pituitaria (Nurhidayat et al., 1999). Los estudios de regulación de los SSTR2 y SSTR5 por la presencia de estrógenos aportan una evidencia adicional a la existencia de un posible mecanismo de control directo sobre la hipófisis en la secreción de GH (Kimura et al., 1998).

En cuanto al análisis de la curva de peso de los ratones adultos, las diferencias de los pesos entre los dos sexos, son mantenidos aún después de la pubertad, confirmando que la presencia de esteroides sexuales en los individuos adultos, también, es esencial en el mantenimiento del dimorfismo sexual (Chowen et al., 1996).

EVOLUCIÓN DEL PESO CORPORAL EN RATONES WT Y KO

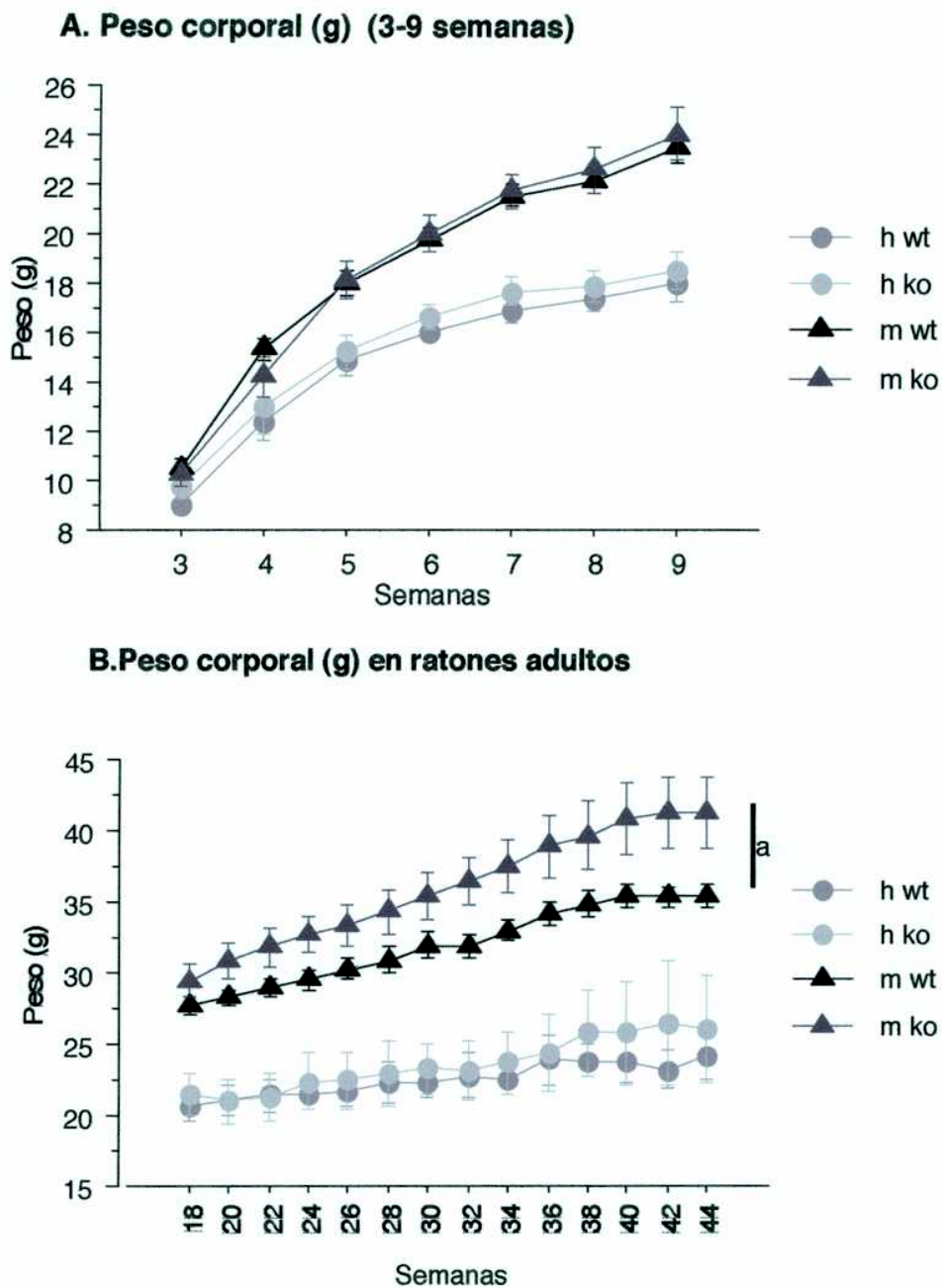


FIGURA 9: A. Evolución del peso durante las primeras semanas de vida y B. Evolución del peso en la etapa adulta como parámetros indicadores del crecimiento e ratones WT y KO.

EVOLUCIÓN DEL CRECIMIENTO LONGITUDINAL EN RATONES WT Y KO

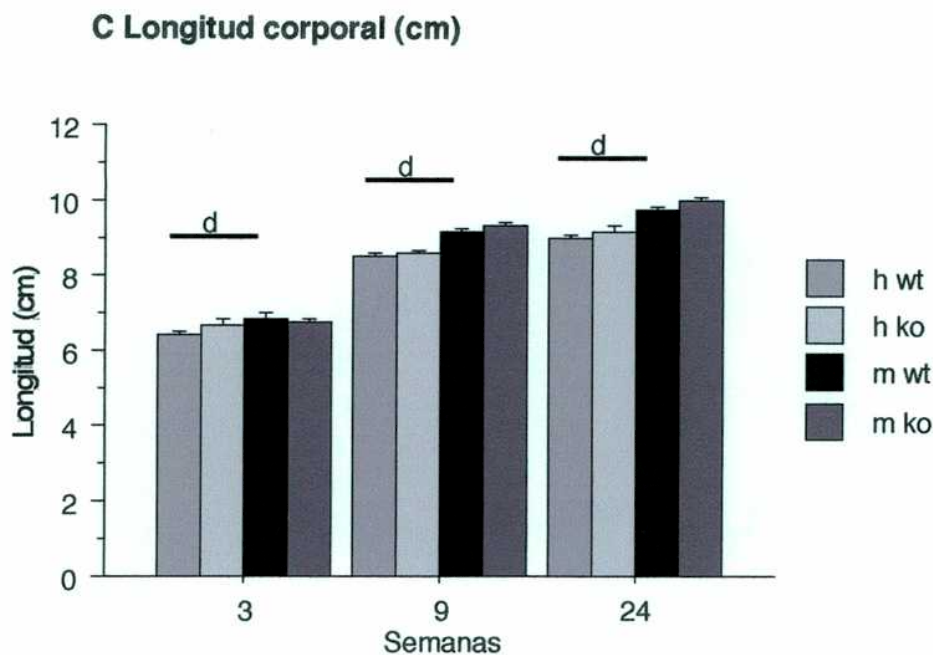


FIGURA 9: Evolución del peso y de la longitud corporal como parámetros indicadores del crecimiento e ratones WT y KO.

En A. Peso corporal hasta las 9 semanas de vida., B. Peso corporal de individuos adultos y C. Longitud corporal. Las barras indican el promedio \pm error estándar de 6 hembras (h) y 8 machos (m) de cada genotipo.

Hembras WT=h wt; hembras KO=h ko y machos WT=m wt; machos KO=m ko

En A. los ratones fueron pesados semanalmente desde el destete hasta la madurez (3 a 9 semanas) y en B. quincenalmente desde las 18 a las 44 semanas. C. La longitud corporal fue evaluada en el destete (3 semanas), en la madurez (9 semanas) y en el adulto (6 meses de edad). La longitud corporal se midió desde el hocico hasta el ano en ratones anestesiados.

El análisis de los 3 parámetros mostró un efecto significativo debido a la presencia del dimorfismo sexual, (ANOVA, h vs. m $d=p<0.0001$, en cada una de las comparaciones). En A. y C. un análisis posterior no reveló diferencias significativas entre los genotipos WT y KO.

En B el análisis *post hoc* reveló un incremento significativo en el peso de los animales KO respecto de los WT (ANOVA, a= $p<0.05$, análisis de Fisher).

Estas observaciones condujeron la idea que la ausencia de gigantismo en los ratones KO podría ser consecuencia de la presencia de efectos compensatorios de origen hipotalámico o hipofisario.

4.2 Evaluación de potenciales efectos compensatorios hipotalámicos e hipofisarios

La idea del origen hipotalámico en la ausencia de gigantismo supone la existencia de un efecto compensatorio sobre las neuronas de GHRH. De esta manera, una alteración en el número de neuronas o la síntesis de GHRH que compense la falta del péptido inhibitorio en los ratones mutantes podría ser, en parte, la causa de la ausencia de gigantismo. Los estudios inmunohistoquímicos utilizando anti-GHRH permitieron evaluar que tanto el número de neuronas teñidas como la cantidad de fibras presentes en el NDM del hipotálamo permanecieron invariables en ambos genotipos descartando un efecto compensatorio hipotalámico evidente por parte de GHRH.

En cuanto al origen hipofisario, la ausencia de gigantismo podría deberse a alguna alteración en el balance entre la síntesis y la secreción de GH proveniente de los somatotrofos.

Para investigar esta posibilidad se cuantificaron los niveles plasmáticos de IGF-1 y se analizaron los contenidos de GH hipofisarios.

La acción de GH en la promoción de crecimiento no es ejercida directamente sobre los tejidos periféricos sino a través de una familia de moléculas mediadoras: los IGFs. El factor IGF-1 tiene un papel fundamental como mediador en la promoción del crecimiento y el desarrollo (Liu et al., 1993; Baker et al., 1993).

Como se ha descrito en la Introducción de este trabajo, el carácter pulsátil de GH plantea una seria dificultad en la determinación directa de los niveles de GH plasmática en el ratón. Los niveles plasmáticos IGF-1 son un indicador estable de los valores medios de GH circulante y por esta razón han sido utilizados como marcadores de su concentración plasmática.

Para realizar este experimento se cuantificaron los niveles de IGF-1 por radioinmunoensayo de 5 ratones por sexo y genotipo.

Los resultados mostraron los niveles plasmáticos de IGF-1 significativamente aumentados en las hembras respecto de los machos WT (ANOVA, $\alpha = p < 0.05$ análisis de Fisher PLSD) sin observarse diferencias entre los dos genotipos. Estas diferencias entre machos y hembras WT están en total acuerdo con los niveles promedio de GH plasmática encontrados en el ratón, que a diferencia de los de la rata, son mas elevados en las hembras que en los machos. (McLeod et al., 1991) Figura 11.

Los niveles plasmáticos de IGF-1 observados en este experimento sugieren que la secreción de GH hipofisaria no ha sido alterada en forma evidente por la ausencia de SST.

Para investigar la posibilidad de una alteración en la síntesis de GH hipofisaria se realizó una inmunohistoquímica en cortes seriados de hipófisis utilizando anticuerpos anti-hGH (hormona de crecimiento humana) y se cuantificaron por RIA los contenidos hipofisarios totales de GH.

Las secciones de hipófisis de ratones WT y KO también fueron teñidas con otros anticuerpos como anti-ACTH, anti-rPro y anti-r β TSH para evaluar la presencia de alteraciones en la expresión de otras hormonas hipofisarias ante la ausencia de SST(Figura 10).

La observación al microscopio óptico no reveló diferencias en la expresión de las distintas hormonas hipofisarias entre los ratones WT y KO. Sin embargo, un examen mas detallado en las secciones teñidas con los anticuerpos anti-hGH mostró que los somatotrofos provenientes de animales WT aparecían mas intensamente teñidos que los provenientes de los ratones KO.

Para confirmar esta impresión se cuantificaron por RIA los contenidos hipofisarios de ratones WT y KO donde se utilizaron 6 hipófisis de tamaño similar por sexo y genotipo.

Los resultados obtenidos mediante el RIA confirmaron, en los machos y en las hembras KO, una disminución del 50% en el contenido total de GH por glándula comparados con el de

sus pares WT del mismo sexo (ANOVA, $p \leq 0.01$ análisis de Fisher PLSD, para cada una de las comparaciones). De la misma forma, las hembras WT mostraron un aumento significativo en el contenido de GH hipofisario de sus glándulas cuando fueron comparadas con los machos WT (ANOVA, $p \leq 0.01$ análisis de Fisher PLSD). Figura 11

Estas evidencias sugieren que la ausencia de SST en los ratones mutantes resulta en una disminución neta de la producción de GH, probablemente asociada con el incremento en la secreción de GH en una escasa población de somatotrofos que resultaría insuficiente para reflejar un cambio en los niveles de IGF-1 plasmáticos. Por otra parte, las diferencias en los contenidos hipofisarios de GH entre machos y hembras WT podrían ser el origen de los elevados niveles de IGF-1 observados en las hembras WT.

EXPRESIÓN DE GH, ACTH, PRO Y TSH EN LA HIPOFISIS DE RATONES WT Y KO

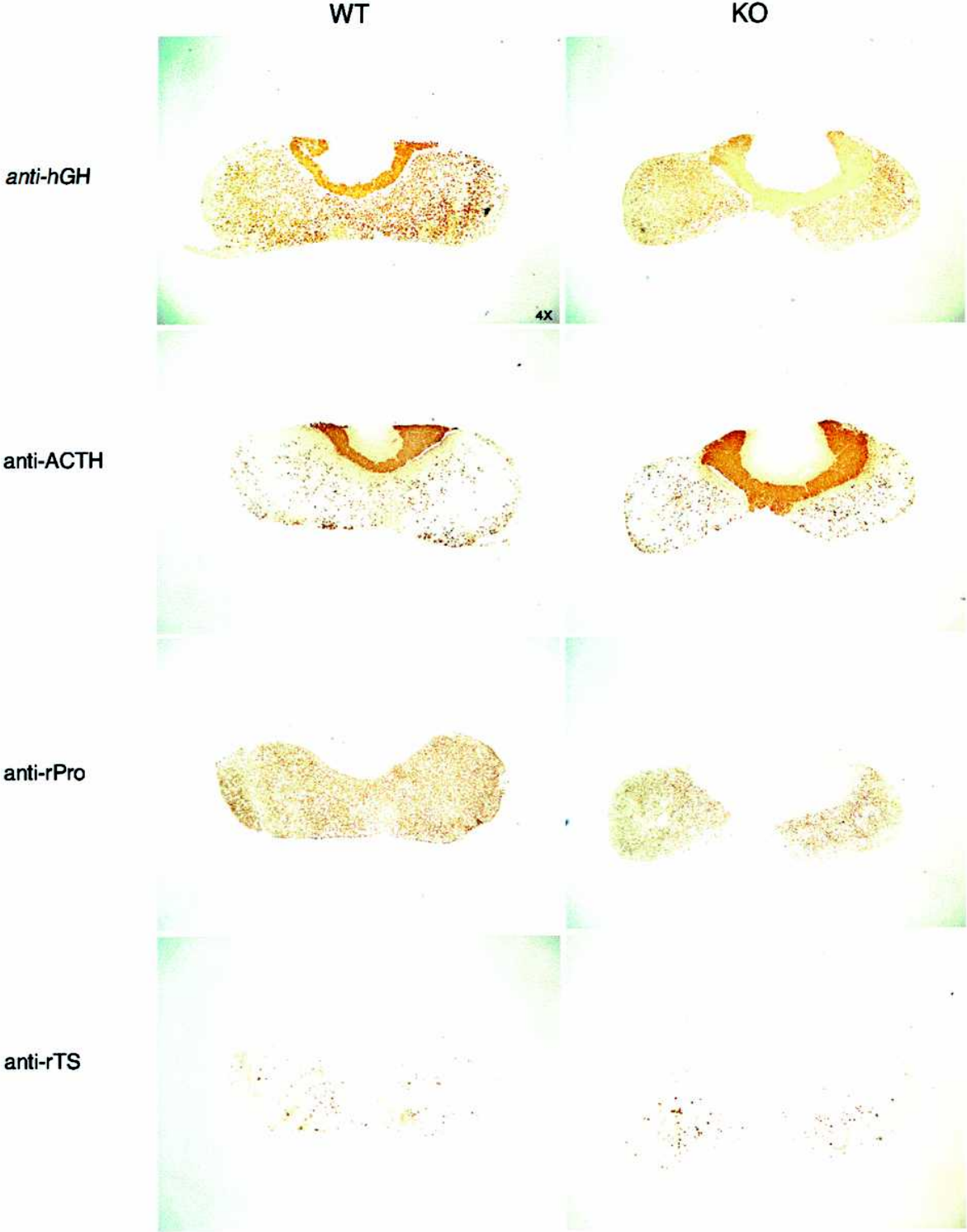


Figura 10. Expresión de distintas hormonas hipofisarias GH, TSH, ACTH y PRO en hipófisis de ratones WT y KO.

La presencia de las distintas hormonas hipofisarias fue evaluada por inmunohistoquímica en cortes seriados de hipófisis. Las hipófisis fueron fijadas en PFA 4% y postfijadas en presencia de sacarosa 10%, incluidas en OCT y cortadas en crióstato en secciones de 18 μm . La reacción con los anticuerpos fue realizada según un protocolo estándar de inmunohistoquímica como se describe en la *sección de Materiales y Métodos* y el revelado mediante la utilización de anticuerpos secundarios biotinilados y una reacción de amplificación con un sistema de avidina-biotina acoplada a peroxidasa..

Las tinciones mostraron la ausencia de diferencias obvias en el patrón de expresión de los péptidos hipofisarios analizados con excepción de GH. La expresión de GH mostró los somatotrofos de los ratones WT mas intensamente teñidos que los provenientes de los ratones KO, sugiriendo un mayor contenido de GH en esta población celular en los animales normales.

ANÁLISIS DE POTENCIALES EFECTOS COMPENSATORIOS HIPOFISARIOS (BALANCE ENTRE LA SÍNTESIS Y SECRECIÓN DE GH) EN RATONES WT Y KO.

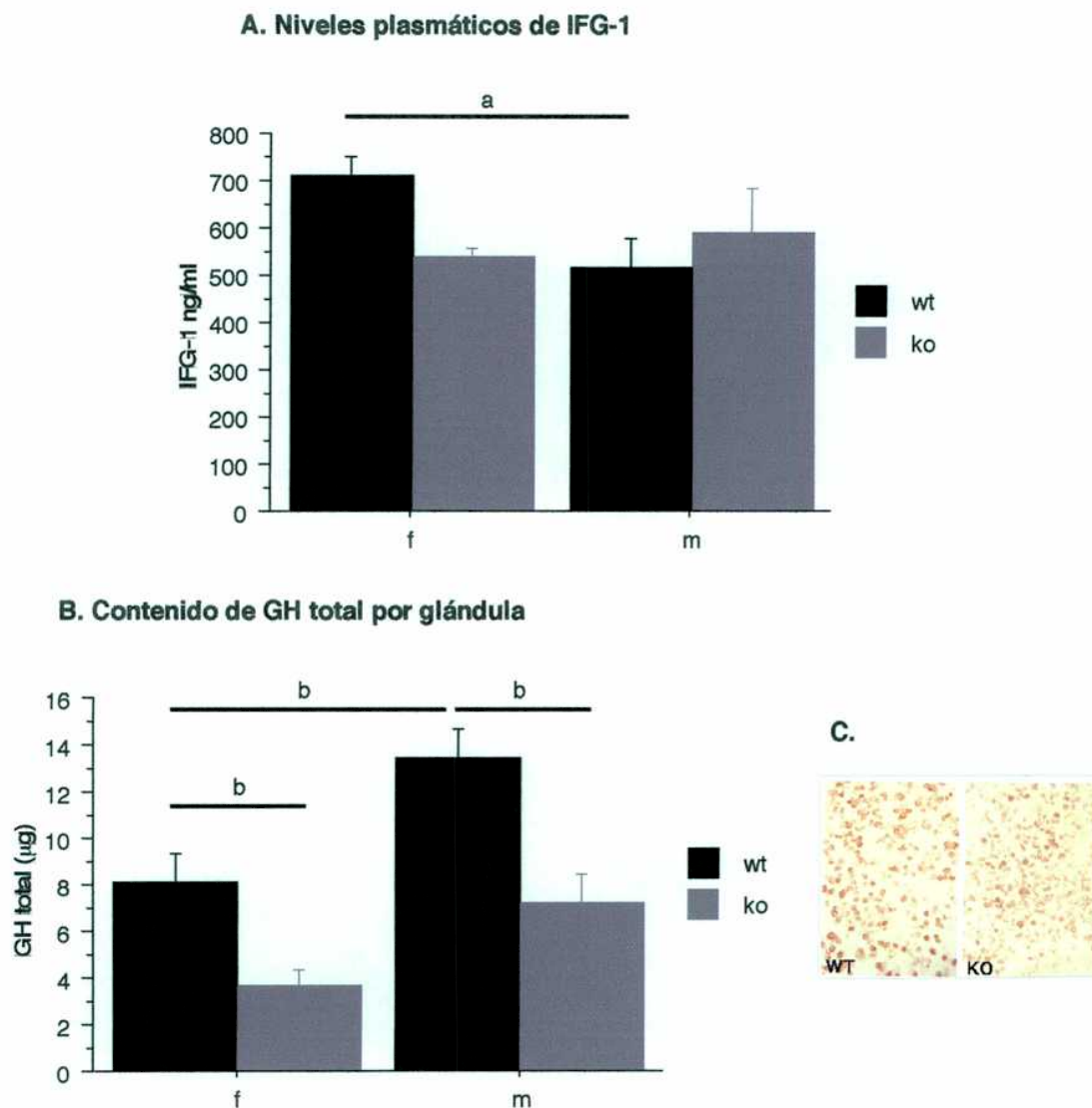


Figura 11. Análisis de potenciales alteraciones en el balance entre la síntesis y la secreción de GH hipofisaria en ratones WT y KO.

En A. Niveles plasmáticos de IGF-1 .B. Contenidos de GH hipofisaria total por glándula. C. Expresión de GH en los somatotrofos hipofisarios de ratones WT y KO.

Figura 11. Análisis de potenciales alteraciones en el balance entre la síntesis y la secreción de GH hipofisaria en ratones WT y KO.

A. Niveles plasmáticos de IGF-1 .B. Contenidos de GH hipofisaria total por glándula. C. Expresión de GH en los somatotrofos hipofisarios de ratones WT y KO.

Las barras representan los valores promedio \pm error estándar de 5 y 6 determinaciones por sexo y genotipo, de IGF-1 y GH hipofisaria, respectivamente. En ambos casos las cuantificaciones fueron realizadas por RIA, según se describe en la sección de Materiales y Métodos.

En A. Los niveles plasmáticos de IGF-1 fueron utilizados como indicadores de los valores medios de la GH circulante para estudiar la posible alteración de la secreción de GH desde los somatotrofos en los ratones KO. Los resultados muestran una diferencia significativa en los niveles de las hembras WT respecto de los machos del mismo genotipo (ANOVA, $a=p<0.05$, análisis de Fisher) sin encontrarse diferencias en el resto de los grupos analizados, ni entre los genotipos WT y KO. Estos resultados concuerdan con los niveles medios de concentración plasmática de GH encontrados en el ratón, superiores en las hembras que en los machos.

B: Contenidos hipofisarios totales de GH. Los contenidos hipofisarios de GH en la hipófisis fueron cuantificados por RIA y han sido utilizados para investigar probables alteraciones en la biosíntesis de GH como producto de la ausencia de SST. Como se ve en la figura los contenidos hipofisarios totales por glándula de los animales KO mostraron una reducción del 50% respecto de los niveles que presentan los ratones WT (ANOVA, wt vs. ko, $b=p<0.01$, análisis de Fisher) sugiriendo la ausencia de acción inhibitoria en la secreción de GH hipofisaria en los ratones que carecen de SST. Los contenidos de GH total también fueron significativamente mayores en los machos WT que en las hembras WT (ANOVA, h vs. m, $b=p<0.01$, análisis de Fisher), hecho que podría interpretarse como una mayor liberación de GH de las hembras y en consecuencia una mayor concentración plasmática media de GH y que estaría de acuerdo con los niveles de IGF-1 presentados en A.

C. Detalle de la expresión de GH en los somatotrofos de ratones WT y KO (40X). Como se describe en la sección de Materiales y Métodos, la presencia de GH fue evaluada mediante inmunohistoquímica en cortes seriados de hipófisis. Las hipófisis fueron fijadas en PFA 4%, incluidas en OCT y cortadas en crióstato en secciones de 18 μ m. La reacción con el anticuerpo fue realizada según un protocolo estándar de inmunohistoquímica y el revelado mediante la utilización de anticuerpos secundarios biotinilados y un sistema de amplificación de avidina-biotina acoplado a peroxidasa.. La expresión de GH mostró los somatotrofos de los ratones WT mas intensamente teñidos que los provenientes de los ratones KO, sugiriendo un mayor contenido de GH hipofisario y confirmando los resultados obtenidos en B.

5. Efectos de la ausencia de SST en el hígado

5.1 Pulsatilidad y expresión de proteínas sexualmente dimórficas en el hígado

Como se ha descrito en la introducción la acción de GH no está limitada a la promoción del crecimiento y el desarrollo, sino que también tiene una serie de efectos en el hígado, su blanco principal.

Los efectos de GH en el hígado fueron investigados en el metabolismo de ciertos esteroides de rata como las enzimas Citocromo p450.

En estos estudios se demostró el papel de los andrógenos en la modificación de la actividad de algunas de las enzimas que participan del metabolismo de los esteroides (Yates et al., 1958). Los estudios hechos con ratas hipofisectomizadas revelaron, además, que la presencia de la hipófisis es esencial para el mantenimiento de la actividad de estas enzimas (Gustafsson et al., 1983) postulando a GH como el factor mediador responsable de la acción entre los andrógenos en el hígado.

De la misma forma que en el crecimiento corporal, la pulsatilidad de GH también tiene profundos efectos en el hígado. El hígado es un tejido sexualmente dimórfico y estas diferencias pueden ser observadas en la actividad de ciertas enzimas metabolizadoras de esteroides, la abundancia de los receptores a ciertas hormonas como el receptor de prolactina (ProR) y la producción de ciertas hormonas del plasma como las proteínas mayoritarias de la orina (MUPs). Como ya se ha descrito, los ProR son expresados abundantemente en las hembras (Norstedt et al., 1987) y las MUPs en los machos (Hussman et al., 1985; Shahan et al., 1987), mientras que en la superfamilia de las enzimas que participan del metabolismo de las hormonas esteroideas, las distintas formas de una misma enzima pueden ser de expresión dominante en las hembras o en los machos dependiendo de la cepa en estudio (Pasleau et al., 1984).

La regulación de las MUPs y los ProR (Norstedt et al., 1987) han sido investigadas en varios modelos de ratón aprovechando la existencia de cepas deficientes (*little*) y de expresión constitutiva de GH. En estos estudios se comprobó que la frecuencia de administración de GH

resulta esencial en el patrón de expresión de estas proteínas. Los modelos de exposición crónica que expresan constitutivamente GH como consecuencia de la presencia de un transgén de GH bajo el control de un promotor constitutivo muestran un patrón feminizado del hígado (elevados niveles de ProR y escasos niveles de MUPs). Un resultado similar se observa en las cepas *little* donde la presencia constante de la hormona es simulada mediante la administración exógena de GH. En cambio, la administración exógena de GH en la cepa *little* a intervalos mayores de tiempo, muestra un hígado masculinizado con elevados niveles de MUPs y escasos niveles de ProR (Norstedt et al., 1984).

La correlación entre los niveles de expresión de estas proteínas y el modo de administración de GH es una herramienta importantísima en el estudio de la pulsatilidad de GH debido a la anteriormente planteada dificultad en la medición directa de los niveles plasmáticos de GH en el ratón. Por esta razón han sido consideradas como marcadores indirectos de la pulsatilidad de GH en este modelo de estudio.

Como ya se ha mencionado en la Introducción, algunos de los parámetros que controlan la pulsatilidad en rata difieren de los encontrados en el ratón. En el ratón, los niveles promedio de GH plasmática en las hembras son mayores que en los machos a pesar que el área debajo de la curva y la amplitud de los picos permanece invariable. En la rata en cambio, la amplitud de los pulsos en las hembras es menor y las concentraciones plasmáticas medias son similares en ambos sexos.

La secreción de GH en los machos de ambas especies de roedores está caracterizada por la presencia de un factor en común: prolongados niveles basales donde la presencia de GH se hace indetectable. Asumiendo el tradicional papel la SST como responsable en la inhibición de la secreción de GH, se investigó la relación entre la ausencia de la SST y la expresión de las proteínas dimórficas en el hígado.

En este experimento se cuantificó la expresión de genes que codifican para proteínas sexualmente dimórficas en el hígado por el análisis de Northern blot. Se prepararon muestras de

ARN de hígado de 6 animales por sexo y genotipo y se corrieron en un gel desnaturalizante en presencia de formaldehído. Los geles fueron transferidos por capilaridad a una membrana de nylon. Para la detección de los transcritos de las MUPs se utilizaron dos oligonucleótidos antisentido; uno, que detecta la expresión de dos de los genes de esta familia (MUP I y II) y el otro que detecta la expresión de MUP III. Para la detección de los genes de ProR y CYP15 α /2A4 se utilizaron sondas provenientes de clones de ADN complementario de 0.5 kb NcoI/BamHI y de 0.55 Kb EcoRI/BamHI respectivamente. Las sondas y los oligonucleótidos utilizados fueron marcados radioactivamente tal como se describe en la sección de Materiales y Métodos. La expresión de los ARNm de estas proteínas fue normalizada con la expresión del ARN ribosomal de 18s como control de masa de ARN sembrado en cada una de las calles.

Como se muestra en la Figura 12, el patrón de expresión de los genes de las MUPs (I y II; y III) mostró una diferencia muy significativa cuando se compararon los niveles de los machos WT respecto de las hembras del mismo genotipo (ANOVA, $d=p<0.0001$, test de comparación múltiple de Tukey). En ambos casos, la expresión de estos genes en los machos fue entre 4 y 5 veces mayor que los niveles encontrados en las hembras. En cambio, en los machos KO, el patrón de expresión de las proteínas MUPs mostró una drástica disminución respecto de los de los machos WT (ANOVA, $d=p<0.0001$, test de comparación múltiple de Tukey) y niveles similares a los encontrados en las hembras (Figura 12 A y B).

Las hembras KO, así como se observó en las MUPs I y II, mostraron también en las MUP III, una disminución en los niveles de expresión respecto de las hembras WT (15.7 \pm 0.94 vs. 10.45 \pm 0.98 y 7.35 \pm 2.5 vs. 3.58 \pm 0.75, promedio \pm error estándar WT vs. KO para las MUP I y II; y MUP III respectivamente).

El análisis de la expresión de genes sexualmente dimórficas en el hígado cuyo patrón es normalmente mas abundante en las hembras como los de receptores de prolactina y de la CYP 15 α /2A4 mostró también el hígado feminizado en los ratones que carecen de SST (Figura 12 C y D). De acuerdo con lo esperado, los niveles de expresión de los genes de ProR fueron

significativamente mas elevados en las hembras WT que en los machos normales WT (T-test, $a=p<0.05$). Los ratones KO, presentaron los niveles de expresión de ProR similares a los de las hembras pero significativamente aumentados respecto de los encontrados en los ratones machos normales (ANOVA, $b=p<0.01$, test de comparación múltiple de Tukey).

Los mismos resultados pueden deducirse del análisis de la expresión del gen de la CYP 15 α /2A4. La sonda de ADNc utilizada para el reconocimiento del transcripto de la proteína CYP 15 α /2A4 en el análisis de Northern también detecta la presencia de otro miembro de esa misma familia, la proteína CYP 15 α /2A5, cuyos niveles de expresión en el hígado son indistinguibles entre los sexos. Esta proteína posee el mismo peso molecular que la CYP 15 α /2A4 y su expresión no esta afectada por los niveles de GH circulantes. En consecuencia, la señal obtenida es una combinación del reconocimiento de ambos transcriptos y por lo tanto no presenta un incremento significativo cuando son comparados hembras y machos WT (8.57 ± 3.33 vs 3.42 ± 1.06 hembras vs. machos respectivamente).

Sin embargo, tanto los machos como las hembras KO, mostraron aumentos significativos en los niveles de expresión de los genes de las CYP respecto de sus pares WT probablemente debido al incremento del transcripto sexualmente dimórfico 2A4 (ANOVA, $a=p<0.05$ y $b=p<0.01$, test de comparación múltiple de Tukey, hembras y machos respectivamente).

EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS SEXUALMENTE DIMÓRFICAS EN EL HÍGADO DE RATONES WT Y KO

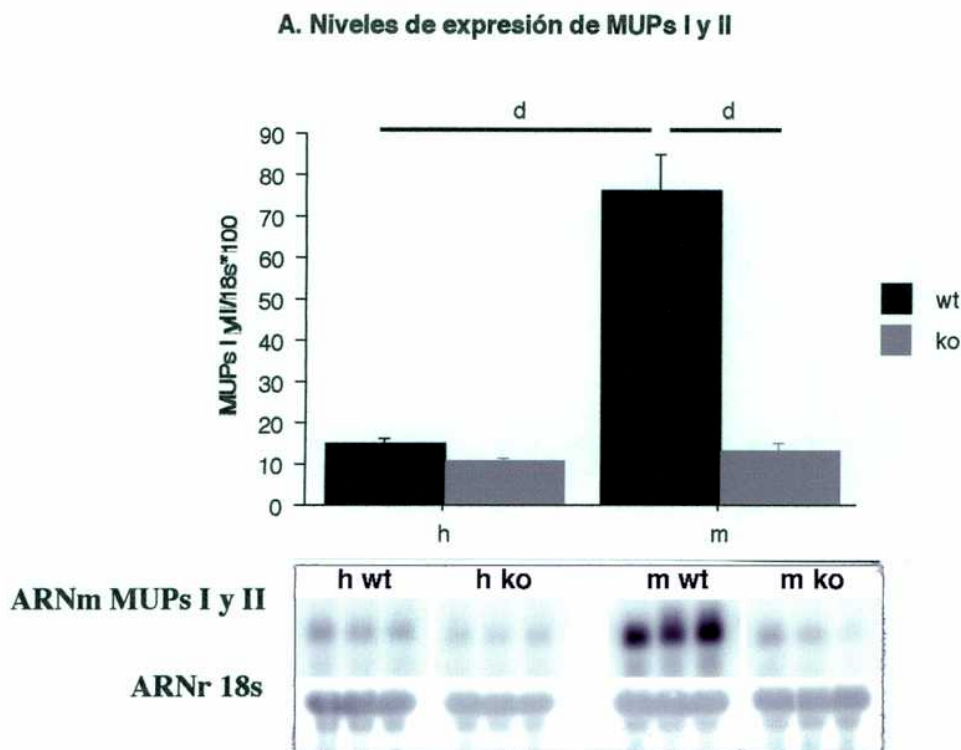
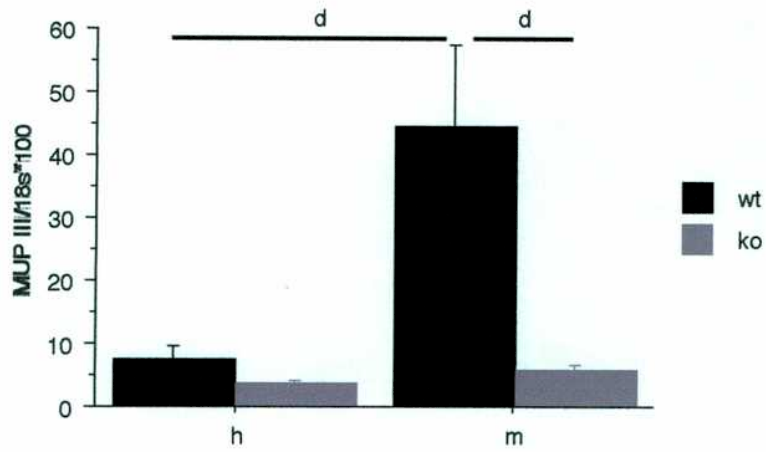


FIGURA 12: Expresión de genes que codifican proteínas sexualmente dimórficas en el hígado de ratones WT y KO.

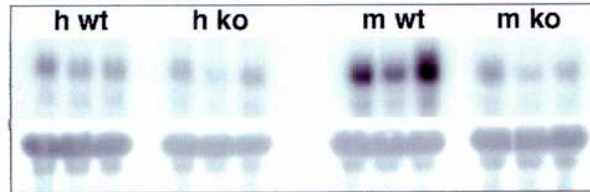
La expresión genes que codifican proteínas sexualmente dimórficas en el hígado fue analizada por Northern blot. Las muestras de ARN de hígado (30 μ g/calle) de hembras y machos WT y KO se corrieron en un gel desnaturizante en presencia de formaldehído y se transfirieron a membranas de nylon. La detección de los transcritos de: las proteínas mayoritarias de la orina (MUPs I y II ,y III); los receptores de prolactina (ProR), la citocromo p450 oxidasa CYP15 α /2A4 y la albúmina se realizó mediante la hibridación con sondas marcadas con P³². La cuantificación densitométrica de las bandas fue normalizada con los valores provenientes de la hibridación con el ARN de 18s. Las barras de las figura representan el promedio \pm error estándar de la relación transcripto analizado/ARN18s*100 en unidades relativas de 6 muestras por sexo y genotipo para cada uno de los genes analizadas. Debajo de cada gráfico se muestra un panel de la membrana expuesta en film, con las intensidades relativas de la expresión del ARNm de la proteína analizada entre los distintos grupos y las correspondientes al ARN de 18s utilizado como control. En el gel se sembraron 3 muestras por sexo y genotipo en el orden en que se muestra la figura h wt (hembras WT), h ko (hembras KO), m wt (machos WT) y m ko (machos KO).

B. Niveles de expresión de MUP III

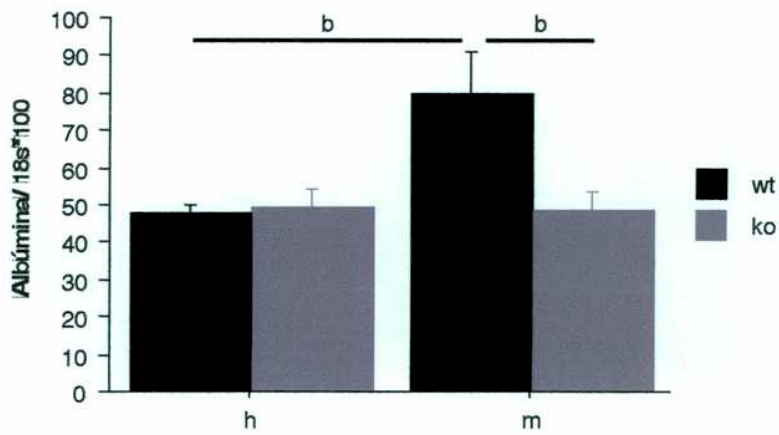


ARNm MUPs III

ARNr 18s

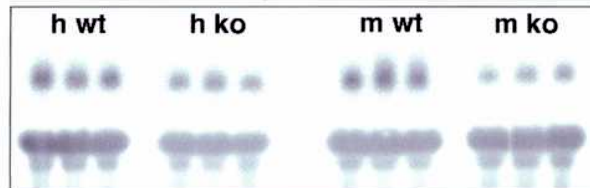


C. Niveles de expresión de albúmina

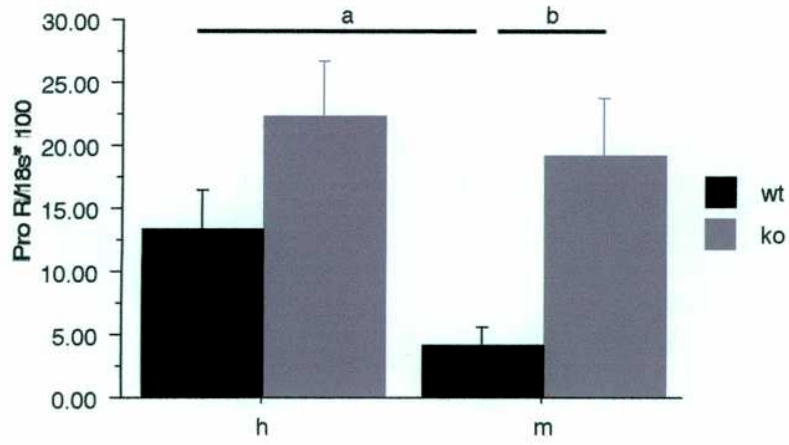


ARNm albúmina

ARNr 18s

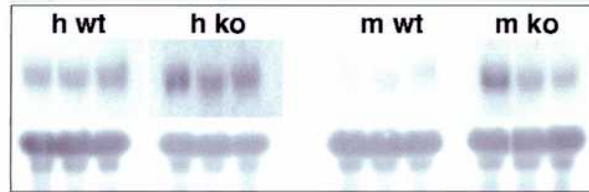


D. Niveles de expresión de Pro R

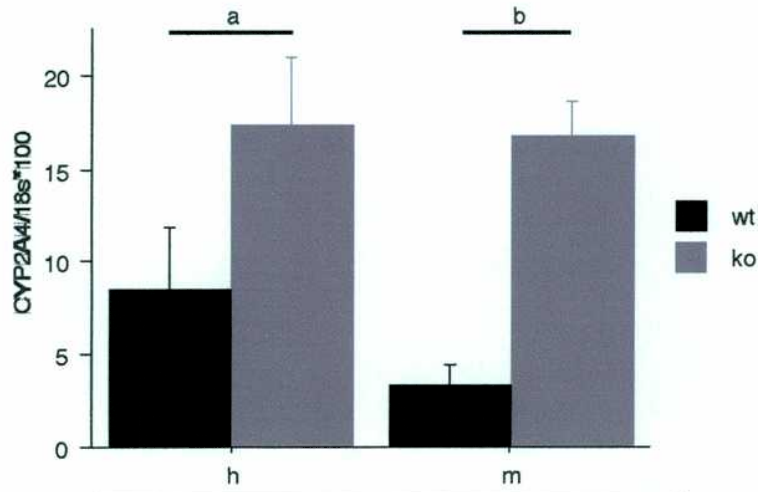


ARNm ProR

ARNr 18s



E. Niveles de expresión de CYP 15 $\alpha/2A4$



ARNm CYP15 $\alpha/2A4$

ARNr 18s

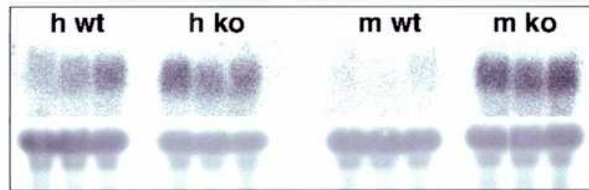


FIGURA 12: Expresión de proteínas sexualmente dimórficas en el hígado de ratones WT y KO.

Para el estudio de la expresión de los genes que codifican proteínas sexualmente dimórficas en el hígado se eligieron representantes cuya expresión es mayoritaria en las hembras como los receptores de prolactina (ProR) y una citocromo p450 oxidasa que participa del metabolismo de los esteroides sexuales (CYP15 α /2A4), representantes de expresión mayoritaria en los machos como las proteínas mayoritarias de la orina (MUPs) y la albúmina, una proteína aparente mente no relacionada con el dimorfismo sexual.

La expresión de los genes de proteínas sexualmente dimórficas de hígado A. MUPs I y II , y B. MUPs III, D. ProR, y E. CYP15 α /2A4 fue analizada por Northern blot. Las muestras de ARN de hígado (30 μ g/calle) de hembras y machos WT y KO fueron corridas en un gel desnaturante en presencia de formaldehído y mas tarde transferidos a membranas de nylon. En el gel se sembraron 3 muestras por sexo y genotipo en el orden en que se muestra la figura h wt (hembras WT), h ko (hembras KO), m wt (machos WT) y m ko (machos KO). Para la identificación de los transcriptos de las proteínas MUPs I y II, y III se utilizaron 2 oligonucleótidos. Uno que es capaz de reconocer a los genes de MUPs I y II y el otro al gen de MUP III. En la detección de los ARNm de los ProR y la CYP15 α /2A4 se utilizaron sondas de ADN provenientes de clones de ADN complementario marcadas radioactivamente con P³². También se analizó la expresión del gen de la albúmina , una proteína supuestamente no relacionada con el dimorfismo sexual, mediante la utilización de una sonda oligonucleotídica. Las mismas membranas fueron hibridadas con cada una de las sondas marcadas radioactivamente con P³² Los detalles acerca del marcado de las sondas y los protocolos de hibridación se encuentran descriptos en detalle en la sección de Materiales y Métodos de esta tesis. Después de cada hibridación las membranas fueron hervidas en presencia de SDS 0.5% para eliminar la presencia de la sonda anterior y expuestas 12 h para verificar la ausencia de la marca. Finalmente , la membranas se hibridaron con una sonda oligonucleotídica complementaria al ARN de 18s también marcada con P³² para controlar la masa de ARN sembrada en cada calle. Las membranas hibridadas con cada una de las sondas fueron expuestas en presencia de una pantalla amplificadora y escaneadas para la cuantificación densitométrica de las bandas.

Las barras en la figura representan la relación en unidades relativas (proteína/ARN18s)*100 \pm error estándar de 6 muestras de ARN por sexo y genotipo para cada una de las sondas utilizadas. Debajo de cada gráfico se muestra un panel con las intensidades relativas de las bandas de las proteínas y el control de ARN 18s escaneadas del film.

Los resultados mostraron en los machos que carecen de SST, la feminización en la expresión de todos los genes de las proteínas del hígado analizadas. Las hembras KO mostraron también una superfeminización de la expresión de estas proteínas aunque sus diferencias no son significativamente diferentes (ANOVA, $a=p<0.05$, $b=p<0.01$ y $d=p<0.0001$, test de comparación múltiple de Tukey)

El análisis de la expresión de los genes dimórficos en el hígado fue completado con el estudio de los niveles de expresión de la albúmina, una proteína aparentemente no regulada por los pulsos de GH.

Los resultados mostraron que el transcripto de albúmina se expresa mas abundantemente en los machos que en las hembras WT (ANOVA, $b=p<0.01$, test de comparación múltiple de Tukey). Del mismo modo que la expresión de los genes de las MUPs, la expresión del gen de albúmina en el hígado mostró niveles comparables con los de las hembras y significativamente diferentes de los de los machos WT (ANOVA, $c=p<0.001$, test de comparación múltiple de Tukey).

Las evidencias presentadas sobre la expresión de los genes de las proteínas dimórficas del hígado revelan la pérdida del dimorfismo sexual en los ratones que carecen de SST. La ausencia de SST en los machos KO feminizan el patrón de expresión estos genes del hígado confirmando la participación directa de la SST en la pulsatilidad de GH. En las hembras KO, también existe una alteración del patrón de expresión, que aparecen superfeminizadas.

Estos resultados podrían ser explicados por la presencia de un patrón secretorio de GH alterado. El patrón de secreción de GH es el producto de la acción combinada de al menos dos péptidos hipotalámicos: SST y GHRH. La participación de GHRH en la generación de los pulsos de GH en rata ha quedado demostrada a través de las lesiones en las células del NARC productoras de GHRH y de la inmunización pasiva con un anticuerpo anti-GHRH (Painson et al., 1991; Jansson et al., 1985). Estos tratamientos, suprimieron la amplitud de los pulsos y mostraron una marcada reducción en el crecimiento de machos y hembras (Wehrenberg et al., 1984).

El papel de la SST en la rata, ha sido estudiado también mediante lesiones en las fibras que se proyectan desde el N Pe a la eminencia media y el uso de anticuerpos específicos anti-SST (Painson et al., 1991; Jansson et al., 1985). Tanto las lesiones que disminuyen la presencia de la SST en la eminencia media como la inmunización pasiva muestran la elevación en los

niveles basales de los machos y las hembras y el aumento en la frecuencia de los pulsos de GH, sin afectar ni su amplitud ni las concentraciones medias plasmáticas.

Por otra parte, el agregado exógeno de GHRH, resulta, en los machos en un aumento significativamente mayor en la respuesta de GH cuando la inducción se hace en el momento de los picos de secreción, es decir cada 3 o 4 hs. En cambio, ninguna diferencia en la respuesta de los niveles de GH se observa cuando el agregado se produce en el intervalo entre los picos de secreción. Por su parte, las hembras no muestran diferencias en los niveles de GH cuando se utilizan las mismas frecuencias en el agregado de GHRH.

Estos experimentos indican que GH sólo puede ser estimulada, en los machos, por la acción de GHRH con una determinada frecuencia. Mientras, que los prolongados intervalos de presencia indetectable de GH estarían conducidos por la acción inhibitoria de la SST que no puede ser revertida ni aún en presencia del agregado exógeno de GHRH.

Entonces, el patrón secretorio de GH puede verse como el resultado final de la acción combinada de dos neuropéptidos, la SST y GHRH cuya participación puede ser identificada en alguno de los componentes que constituyen los pulsos de secreción. GHRH como la responsable de generar los pulsos en la secreción de GH y la SST como la responsable de la presencia de prolongados intervalos de niveles de GH indetectable.

6. Discusión de los efectos de la ausencia de SST en el eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico

Las primeras observaciones en el peso y la longitud de los animales que carecen de SST indicaron la ausencia de gigantismo respecto de los animales WT. Los machos WT mostraron el aumento esperado en el peso y la longitud respecto de las hembras WT propio de la presencia del dimorfismo sexual, pero ninguna diferencia entre los genotipos. El análisis de la evolución en las curvas de crecimiento de los ratones KO y WT, también mostró el dimorfismo sexual en el eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico a partir de la 5ª semana de vida que se mantuvo en los

animales adultos, si mostrar diferencias entre genotipos. Sólo los machos adultos KO presentaron diferencias significativas en el peso respecto de los WT. La ausencia de diferencias en la longitud de estos animales condujo la sospecha de un real aumento en el tamaño del ratón o una consecuencia de algún desorden secundario producto de la mutación.

La presencia de efectos compensatorios por parte del otro factor hipotalámico involucrado en la secreción de GH, GHRH, fue analizada por inmunocitoquímica sin mostrar diferencias evidentes entre los dos genotipos. Asumiendo que la SST puede modular la secreción de GHRH en el núcleo arcuato, los efectos de la ausencia de SST sobre la liberación de hormona de crecimiento en la hipófisis podrían evidenciarse en dos niveles. El primero, un efecto indirecto proveniente de la falta de inhibición sobre la secreción GHRH que estimula de forma constante a los somatotrofos a liberar GH y el segundo, un efecto directo de la ausencia de SST para inhibir la estimulación constante producida por GHRH.

En este sentido, los ratones que carecen de SST mostraron una reducción del 50% en los contenidos hipofisarios de GH, sugiriendo que la ausencia de SST hipotalámica, hipofisaria o una combinación de ambas, deriva en una mayor liberación de hormona de crecimiento en los somatotrofos. La misma impresión fue observada en las hipófisis que fueron teñidas con anti-hGH donde los somatotrofos de los animales KO mostraron un menor contenido hipofisario de GH.

Estos resultados parecen contradecir los observados en los niveles de IGF-1 que no reflejan un aumento significativo en la concentración de GH plasmática. Es posible, sin embargo, que la estimulación de la secreción hipofisaria de GH, sea aún insuficiente para elevar las concentraciones medias de GH en el plasma. De cualquier manera, la ausencia de SST no se traduce en un aumento en la concentración plasmática de GH ni en un aumento del tamaño de los animales poniendo a prueba el concepto hasta el momento utilizado de la SST como “inhibidora de la secreción hipofisaria de GH”. La ausencia de gigantismo en los ratones KO podría,

entonces, indicar que la SST cumple una función diferente y algo mas compleja que la atribuída hasta el momento en la fisiología de eje hipotalámico-hipofisario-somatotrópico.

Por último, la alteración en la expresión de genes de proteínas sexualmente dimórficas en el hígado en los machos que carecen de SST indica una participación directa de la SST en el patrón secretorio de GH. Estos resultados aportan una evidencia adicional a los provenientes de estudios con lesiones en el núcleo periventricular del hipotálamo y de inmunización pasiva utilizando antisuero anti-SST donde también se observó un patrón feminizado en la expresión de las proteínas del hígado. Los estudios utilizando antisuero anti-SST también mostraron que el bloqueo de la SST aumentaba la frecuencia de los pulsos disminuyendo los prolongados intervalos de niveles indetectables de GH y aumentando los niveles basales en los machos.

La determinación directa de los niveles de GH plasmática en los ratones que carecen de SST, podría aportar información adicional sobre la magnitud y amplitud de los pulsos de liberación de GH en los ratones KO.

Todas estas evidencias en conjunto, indican la participación directa de la SST en el patrón de secreción de GH. La relevancia de la función de la SST en el patrón de GH no es sólo consecuencia de la intervención en el mecanismo en si y de la serie de eventos que a partir de él se originan, como la diferenciación sexual, sino que esta acompañada de una nueva concepción del “crecimiento” en la fisiología del eje hipotalámico-hipofisario-somatotrópico.

7. Evaluación de la ausencia de SST en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal

Los efectos CRH se inician en los corticotrofos hipofisarios donde esta hormona estimula la secreción de ACTH. La ACTH liberada ejerce su acción en la corteza adrenal estimulando la síntesis y liberación del CORT. Además de su acción sobre los tejidos periféricos, el CORT es el responsable del feedback a nivel hipotalámico e hipofisario, y posiblemente través de áreas suprahipotalámicas como el hipocampo (Hip) (Ferrara et al., 1991). Como consecuencia de la acción del CORT en estas estructuras cerebrales los niveles plasmáticos de ACTH y CORT son restablecidos a los niveles normales.

Los tratamientos con glucocorticoides, como la dexametasona, también restablecen los niveles de ACTH y CORT a sus valores normales luego de la estimulación de CRH, pero no pueden ser revertidos en los casos de exposición crónica a ACTH y CORT. La mayoría de los estados patológicos como el mal de Alzheimer, el envejecimiento y la depresión, que se caracterizan por una disminución de la función SSTérgica, presentan un alto porcentaje de escape a los tratamientos con dexametasona y no pueden suprimir los elevados niveles de ACTH y CORT circulante (Ferrara et al., 1991).

La posible participación de la SST en la fisiología del HPA, ha quedado demostrada por experimentos en los que se utiliza un agente depletor específico de la SST, la Cysteimina. Los resultados de estos experimentos muestran que los pretratamientos con este agente, atenúan los efectos de supresión de los niveles de CORT en los tratamientos con dexametasona (Radke et al., 1988).

Para investigar el/los efecto/s de la ausencia de la SST en la fisiología de las funciones basales del sistema HPA se midieron los niveles de CORT y ACTH plasmáticos en condiciones libres de estrés.

7.1 Determinaciones de CORT y ACTH en condiciones basales

Los experimentos se realizaron en dos días consecutivos utilizando 4 ratones por sexo y genotipo para cada uno de los tiempos (AM y PM) y día evaluados. Las variaciones en los ritmos diurnos de secreción de ACTH y CORT son características de las funciones basales del HPA y están controladas por los intervalos de luz/oscuridad. Por lo tanto, las determinaciones de la mañana se hicieron entre las 7 y las 9 AM (después del apagado de las luces en el bioterio) mientras que las de la tarde comenzaron a las 5 y terminaron a las 7 PM (inmediatamente antes del apagado de las luces).

Con el fin de evitar un estrés adicional, los ratones fueron enjaulados en forma individual 48 hs de iniciar el experimento y decapitados en un cuarto separado de la presencia del resto de los animales. La sangre de los ratones fue colectada del tronco en presencia de 10 µl EDTA 75

mg/ml, centrifugada inmediatamente y reservado el plasma a -70 C para las determinaciones por RIA de ACTH y CORT. También se disecaron y pesaron ambas glándulas adrenales para la evaluación de posibles alteraciones morfológicas producto de la ausencia de la SST.

Como muestra la Figura 13 el peso de las glándulas adrenales de las hembras WT mostró un incremento significativo respecto de los machos WT (ANOVA, $d=p<0.0001$ análisis de Fisher PLSD), pero ninguna diferencia con las hembras KO ($p=0.376$), de forma similar al efecto observado en la expresión de los genes de las proteínas dimórficas del hígado. El peso de las glándulas adrenales de los machos KO fue similar al de las hembras WT y KO, y significativamente diferente del peso de las glándulas de los machos WT (ANOVA, $d=p<0.0001$, análisis de Fisher PLSD).

La importancia de los períodos de luz/oscuridad en la ritmicidad de las hormonas de las funciones basales del HPA (Krieger et al., 1973) ha quedado demostrada en este experimento por los niveles de CORT y ACTH plasmáticos obtenidos. Los resultados mostraron un aumento significativo en todos los grupos analizados en las determinaciones correspondientes al momento inmediatamente anterior al apagado de las luces (PM) (ANOVA, $d=p<0.0001$ y $a=p<0.05$ CORT Y ACTH, respectivamente, análisis de Fisher PLSD, $n=8$).

Los niveles basales de CORT y ACTH de las hembras WT resultaron mas elevados que los de los machos WT en ambos momentos del día (AM y PM) pero significativamente diferentes en las determinaciones tomadas por la tarde (ANOVA, $b=p<0.01$ y $a=p<0.05$, CORT y ACTH respectivamente, análisis de Fisher PLSD). El aumento encontrado en las hembras coincide con el momento de liberación de los estrógenos ováricos y por lo tanto con la estimulación de CRH mediada por los receptores a estrógenos (ER). De la misma forma que con el peso las glándulas adrenales y las proteínas del hígado, los niveles de CORT y ACTH no mostraron diferencias significativas entre las hembras WT y KO ($p=0.847$ y $p=0.202$).

Los machos KO presentaron niveles de CORT y ACTH significativamente aumentados respecto de los machos WT (ANOVA, $d=p<0.0001$ y $a=p<0.05$ CORT Y ACTH,

respectivamente, análisis de Fisher PLSD) y similares a los observados en las hembras de ambos genotipos. De estos resultados se desprende que, el aumento del peso de las glándulas adrenales observado tanto en las hembras como en los machos KO podría ser explicado en función de la acción trófica de los elevados niveles de ACTH circulante a lo largo del tiempo.

El análisis histológico de las glándulas adrenales confirmó que el aumento en el peso observado en las glándulas de las hembras y los machos KO es debido a una hipertrofia de la zona productora de glucocorticoides de la corteza adrenal o *zona fasciculata*. Estos resultados indican la pérdida del dimorfismo sexual producto de la ausencia de SST. De la misma forma que los efectos observados en la expresión de las proteínas del hígado, en el eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico los machos KO mostraron la feminización de las funciones basales del HPA, mientras que no se registraron diferencias entre las hembras WT y KO.

Los elevados niveles de ACTH encontrados en los machos KO sugieren que la feminización del HPA no es una consecuencia directa de la ausencia de la SST en las glándulas adrenales como podría sospecharse por la abundante expresión de SSTRs y el agrandamiento de las glándulas. En cambio, la feminización del HPA podría ser el producto de la ausencia de SST en el hipotálamo, hipocampo (Hip) u otras estructuras corticales. En este sentido, tanto la existencia de la SST en las células piramidales del hipocampo y de la corteza, como la de sus receptores (SSTRs) en la hipófisis y el área parahipocampal constituyen evidencias que apoyan el posible papel central de la SST en la fisiología del HPA (Ferrara et al., 1991; Radke et al., 1988; Zhang et al., 1999; Mczey et al., 1998).

El eje HPA es también sexualmente dimórfico y la influencia de los esteroides gonadales durante el período embrionario y adulto resultan esenciales para el establecimiento final de los componentes que regulan este sistema. El tamaño de las glándulas adrenales así como los niveles basales de ACTH y CORT están incrementados en las hembras respecto de los machos (Handa et al., 1994). Un efecto similar al observado en las funciones basales ocurre con las respuestas al

estrés donde las hembras tienen una respuesta exacerbada respecto de la encontrada en los machos (Spinedi et al., 1992; Handa et al., 1994).

EVALUACIÓN DE LAS FUNCIONES BASALES DE HPA EN RATONES WT Y KO EN CONDICIONES LIBRES DE ESTRÉS

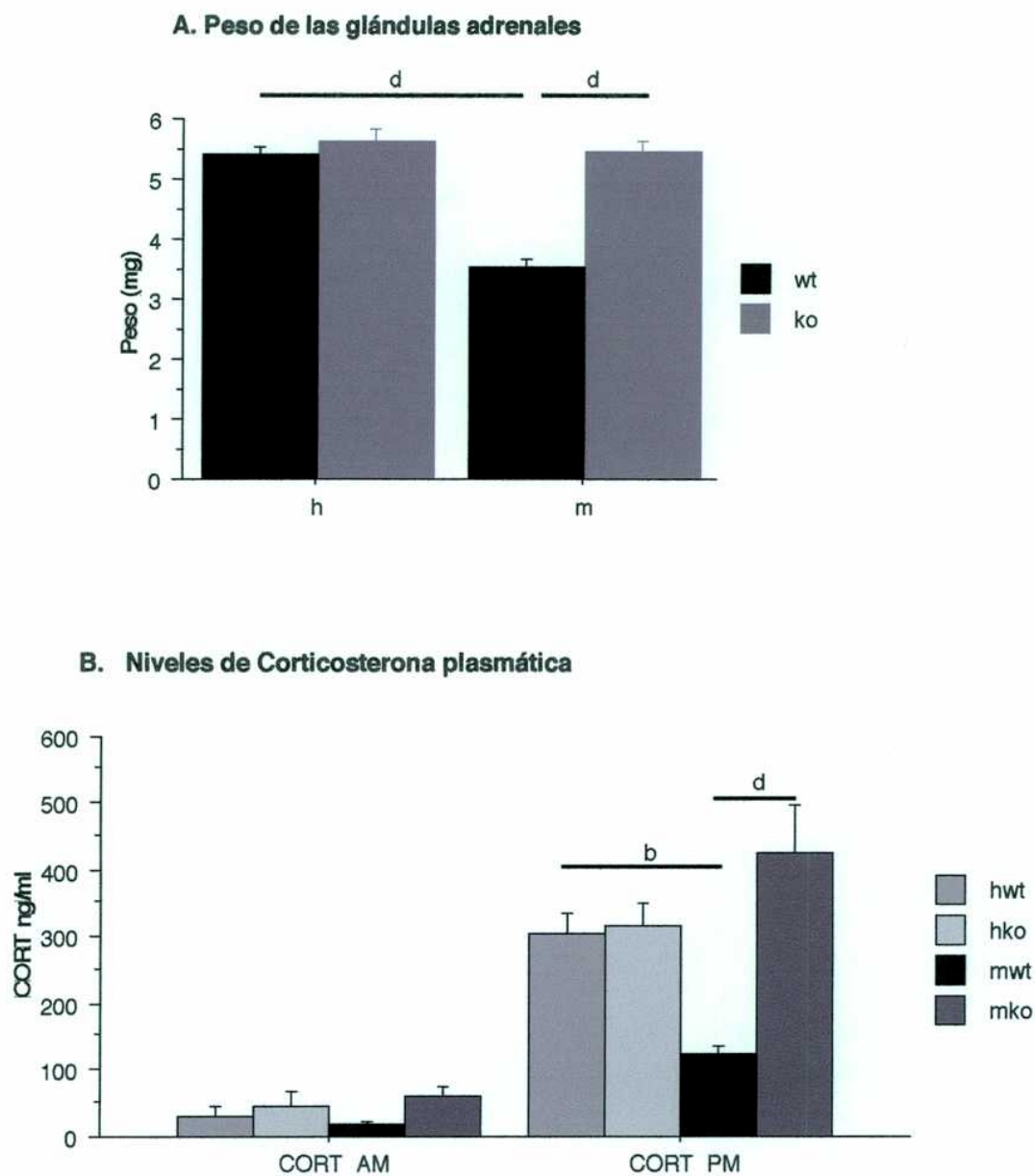


Figura 13: Evaluación de las funciones basales del HPA de ratones WT y KO en condiciones libres de estrés. A. Peso de las glándulas adrenales (mg) B. y C. Ritmos diurnos de secreción (AM y PM) de los niveles de CORT y ACTH plasmáticos, respectivamente.

C. Niveles de ACTH plasmática

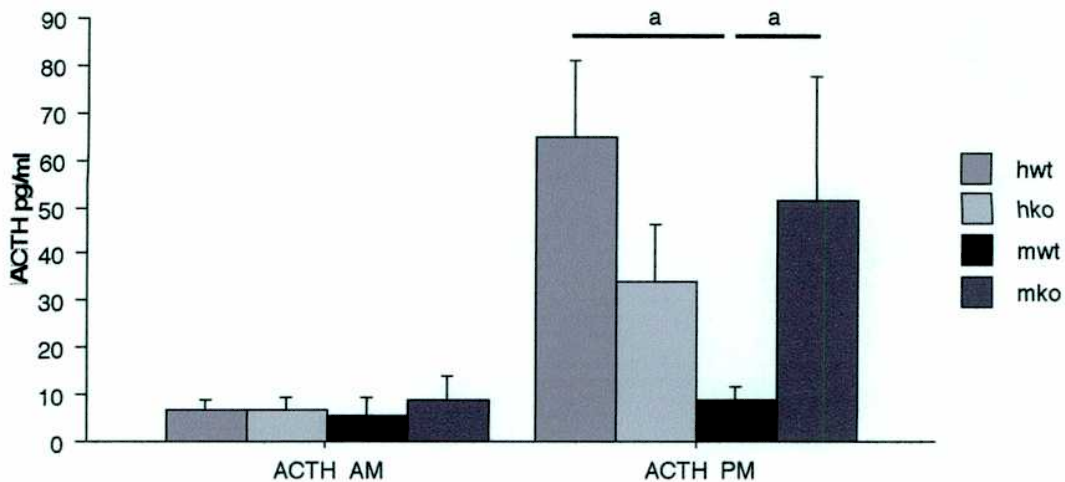


Figura 13: Evaluación de las funciones basales del HPA de ratones WT y KO en condiciones libres de estrés.

A. Peso de las glándulas adrenales (mg) **B.** y **C.** Ritmos diurnos de secreción (AM y PM) de los niveles de CORT y ACTH plasmáticos, respectivamente.

Las barras expresan el promedio \pm error estándar en **A.** 11 ratones por sexo y genotipo y en **B.** y **C.** 8 ratones por sexo, genotipo y tiempo (AM y PM).

Hembras WT=hwt, hembras KO=hko, machos WT=mwt y machos KO=mko.

Las determinaciones de los ritmos diurnos de secreción ACTH y CORT en condiciones basales se realizaron en dos días consecutivos y la toma de las muestras en dos momentos diferentes del día por la mañana (7 y 9 AM) y por la tarde (5 y 7 PM). Para mantener las condiciones libres de estrés, los ratones fueron ubicados en jaulas individuales 48 hs antes del experimento y decapitados en un cuarto separado del resto de los animales. Como se detalla en **Materiales y Métodos**, la sangre fue colectada en presencia de EDTA (75 mg/ml) y los niveles de ACTH y CORT fueron cuantificados por RIA utilizando un kit comercial. En **A.** los resultados muestran la presencia del dimorfismo sexual en el peso de las glándulas adrenales (ANOVA, hwt vs. mwt, $d=p<0.0001$, análisis de Fisher) que es perdido en los machos KO (ANOVA, mwt vs. mko, $p=d<0.0001$ análisis de Fisher). En **B.** y **C.** se observa la presencia de un efecto significativo en el ritmo diurno de secreción de las hormonas del estrés (ANOVA, AM vs. PM $p<0.0001$, para ambas determinaciones). De la misma forma que en el peso de las glándulas adrenales, los niveles de CORT y ACTH son significativamente diferentes entre las hembras y los machos WT (ANOVA, hwt vs. mwt, $b=p<0.01$ y $a=p<0.05$, CORT y ACTH respectivamente, análisis de Fisher) indicando la presencia del dimorfismo sexual que está ausente en los machos KO (ANOVA, mwt vs. mko, $d=p<0.0001$ y $a=p<0.05$, CORT y ACTH respectivamente, análisis de Fisher).

Numerosas evidencias demuestran que el HPA puede ser estimulado por el estrés fisiológico producido por la acción de una endotoxina bacteriana como el lipopolisacárido (LPS) (Rivier et al., 1989). Las células inmunes son activadas por la presencia de la toxina derivada de los microorganismos y en consecuencia, secretan citoquinas capaces de inducir las respuestas del organismo ante la presencia de una infección bacteriana. La fiebre, la liberación de hormonas típicas del estrés como el CORT y la ACTH y la redistribución de minerales, constituyen algunas de las respuestas del organismo ante las infecciones bacterianas (Michalek et al., 1980). Numerosas investigaciones indican que la acción de las citoquinas en la estimulación de las hormonas del estrés sería ejercida a nivel de la CRH hipotalámica, extrahipotalámica (hipocampal) o a nivel hipofisario (Spinedi et al., 1992).

En los experimentos que siguen se utilizaron dos paradigmas diferentes de estrés para evaluar la posible acción directa de la SST sobre los corticotrofos hipofisarios o la presencia de un mecanismo indirecto de acción mediado por otras estructuras cerebrales como el hipocampo o el hipotálamo en la liberación del CORT y ACTH.

7.2 Determinaciones de CORT y ACTH en condiciones de estrés: estrés inducido por endotoxina bacteriana (LPS) y por inmovilización.

El estrés inmunológico fue promovido por la inyección i.p de una endotoxina bacteriana (LPS) y el estrés físico por la inmovilización del ratón en un tubo plástico.

En el experimento de inyección con la toxina bacteriana (LPS) se utilizaron 10 ratones por sexo y genotipo que fueron ubicados en jaulas individuales 48 hs antes del experimento con acceso libre al agua y al alimento. Las inyecciones de LPS y vehículo se hicieron en paralelo por grupo (ratones del mismo sexo y genotipo) para controlar los efectos del manejo de los animales durante la inyección en la posterior determinación de los niveles de CORT y ACTH.

El protocolo de inyección comenzó en la mañana una h después del encendido de las luces (8 AM) para evitar la variación diurna observada en la secreción basal de CORT y ACTH y los grupos de animales fueron inyectados con una frecuencia de 5 minutos con LPS y vehículo.

Tres horas después del tratamiento los animales se decapitaron según los pares organizados para la inyección y la sangre proveniente del tronco fue colectada en presencia de 10 μ l EDTA 75 mg/ml, centrifugada y reservado el plasma a -70 C para la determinación de ACTH y CORT.

Los resultados que se muestran en la Figura 14 (A y B) mostraron la presencia de un aumento significativo en todos los grupos de los niveles del CORT y ACTH como consecuencia de la inyección con LPS (ANOVA, $d=p<0.0001$, para ambas determinaciones, análisis de Fisher PLSD). Los grupos inyectados con vehículo para controlar el estrés transiente producido por el manejo de los animales durante la inyección revelaron, además, que los niveles del CORT en los animales WT (entre 30 y 40 ng/ml) se mantuvieron constantes respecto de los niveles basales observados en ausencia de la inyección (determinaciones AM).

En cambio, los animales KO, tanto las hembras como los machos presentaron un incremento hormonal del CORT de 4 veces (200 y 250 ng/ml) respecto de los niveles observados en ausencia de la inyección (determinaciones AM) aunque no significativo respecto de sus pares WT inyectados con el mismo vehículo, indicando que el simple manejo de los ratones durante la inyección produce un estrés suficiente para disparar los niveles del CORT plasmático en los ratones que carecen de SST.

De acuerdo con lo esperado las hembras WT tratadas con LPS mostraron un incremento significativo en los niveles plasmáticos del CORT y ACTH respecto de los machos WT que recibieron el mismo tratamiento (ANOVA, $b=p<0.01$ y $a=p<0.05$, CORT Y ACTH, respectivamente, análisis de Fisher PLSD), mostrando la presencia del dimorfismo sexual, también en las funciones del HPA que regulan el estrés.

La activación del HPA por acción de la endotoxina bacteriana (LPS) es también sexualmente dimórfica y está caracterizada por respuestas exacerbadas en el patrón secretorio de ACTH Y CORT en las hembras (Vamvakopoulos et al., 1994; Spinedi et al., 1992).

El análisis de los niveles plasmáticos de CORT de los ratones que carecen de SST reveló diferencias muy significativas respecto de sus pares WT tratados con la toxina ($d=p<0.0001$ análisis de Fisher PLSD). Los niveles de ACTH, sin embargo, sólo presentaron diferencias significativas entre los machos WT y KO tratados con la toxina ($d=p<0.0001$ análisis de Fisher PLSD), mientras que las hembras de ambos genotipos mostraron niveles de ACTH indistinguibles entre si. Estos resultados indican que los elevados niveles plasmáticos del CORT y ACTH estarían relacionados en un patrón de alguna forma diferente al observado en las funciones basales del HPA sugiriendo la intervención de la SST en más de un mecanismo de control de la fisiología del HPA.

El análisis de los niveles hormonales de CORT y ACTH en el estrés producido por la acción de LPS sugiere que la ausencia de la SST es responsable de la presencia de dos efectos diferentes en la fisiología del estrés producido por la toxina bacteriana (LPS). Por un lado, el incremento combinado del CORT y ACTH en las hembras WT respecto de los machos WT que muestra la presencia del dimorfismo sexual en las funciones del HPA y que es perdido en los machos KO donde está ausente la SST.

Por otro lado, un efecto del genotipo en los animales KO de ambos sexos que muestran un incremento desproporcionado del CORT plasmático respecto de los correspondientes niveles de ACTH (hembras WT vs. KO, 0.58 ± 0.12 vs 1.06 ± 0.11 ng CORT/pg ACTH, y ; machos WT vs. KO 0.46 ± 0.06 vs 1.14 ± 0.25 ng CORT/pg ACTH; $p<0.05$ y $p<0.005$ respectivamente).

En los experimentos de estrés por inmovilización se utilizaron 8 ratones de cada sexo y genotipo. En estos experimentos se investigó la respuesta, en niveles de ACTH y CORT plasmáticos, del estrés producido por la inmovilización de los ratones en un tubo plástico por el término de 20 minutos.

Para realizar este experimento los ratones fueron enjaulados individualmente 48 hs antes de realizar el experimento con acceso libre al agua y al alimento. Con el objeto de evitar la variación en los ritmos diurnos de secreción del CORT y ACTH, estos experimentos también fueron realizados por la mañana. Los ratones fueron sangrados de la cola antes de ser sometidos a la inmovilización (tiempo 0) y a los 5 y 20 minutos durante la inmovilización (tiempo 5 y 20).

Figura 14 C.

Después de los 20 minutos de estrés físico los ratones fueron devueltos a sus jaulas para permitir su recuperación. A los 60 minutos de iniciado el experimento, 40 minutos después de la inmovilización, los ratones fueron decapitados y colectada la sangre proveniente del tronco para las determinaciones del CORT. Los resultados indicaron un incremento significativo en los niveles del CORT plasmático en todos los tiempos y grupos analizados (ANOVA, $d=p<0.0001$, análisis de Fisher PLSD).

Las determinaciones hormonales a tiempo 0 min. fueron interpretadas como los niveles basales del CORT en ausencia del estrés producido por la inmovilización, pero en presencia del estrés producto de sujetar al ratón por la cola mientras es sangrado. Los niveles de CORT obtenidos a tiempo 0 fueron comparables con los provenientes del tratamiento con LPS en los ratones que fueron inyectados solo con vehículo. De esta forma, los valores presentes en las hembras WT superaron a los encontrados en los machos WT (93.21 ± 21 vs 19.4 ± 4.5 ng CORT/ml, hembras vs machos), evidenciando la presencia del dimorfismo sexual en las funciones del HPA que controlan el estrés. Los ratones KO, mostraron niveles superiores de CORT respecto de los animales WT similar al efecto observado en los ratones KO inyectados con vehículo (228 ± 78 vs. 267 ± 85 ng CORT/ml hembras KO, vehículo vs. tiempo 0 de inmovilización y 162 ± 21 vs. 118 ± 23 ng CORT/ml machos KO, vehículo vs. tiempo 0 inmovilización).

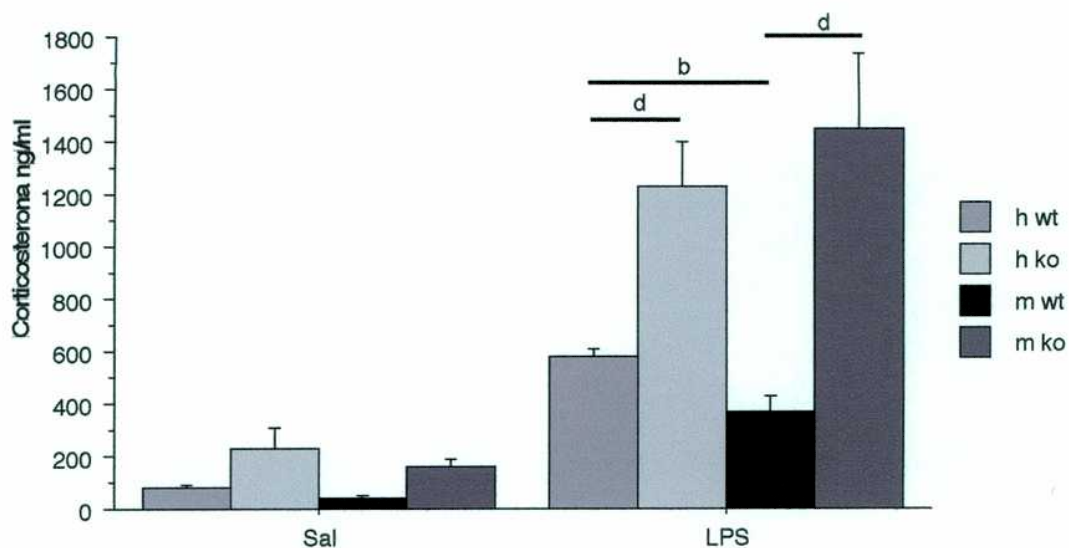
De la misma forma que en el estrés producido por acción de la toxina bacteriana los niveles plasmáticos de CORT utilizando un paradigma de estrés físico mostraron la presencia de dos efectos.

El primero, vinculado a la presencia del dimorfismo sexual en las funciones del HPA que regulan el estrés, donde las hembras WT exhibieron un incremento significativo en los niveles del CORT plasmático respecto de los machos WT a todos los tiempos analizados (ANOVA, $d=p<0.0001$, análisis de Fisher PLSD). El dimorfismo sexual, en las respuestas al estrés físico es también perdido en los machos que carecen de SST, de la misma forma que en el estrés inmunológico (ANOVA, $d=p<0.0001$, análisis de Fisher PLSD). Los ratones KO machos y hembras KO no mostraron diferencias significativas entre sus niveles de CORT plasmático ($p<0.97$ análisis de Fisher PLSD).

El segundo, un efecto sobre el genotipo donde los ratones KO, hembras y machos, mostraron incrementos desproporcionados en los niveles de CORT y ACTH mostrando la presencia de un efecto similar al observado en el estrés inmunológico producido por la toxina. Los niveles de ACTH sólo se pudieron determinar al final del experimento (tiempo 60 min.) donde el volumen plasmático obtenido permitió la cuantificación de ACTH. Sin embargo, muchos de los valores cayeron fuera del límite de sensibilidad del ensayo. El análisis estadístico utilizando una distribución no paramétrica de los datos indicó diferencias significativas entre los grupos analizados debido a diferencias entre las hembras y los machos WT pero no a diferencias entre los genotipos (Kruskal-Wallis, $p<0.01$, análisis de Mann-Whitney).

EVALUACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL HPA DURANTE EL ESTRÉS INMUNOLÓGICO POR LPS Y EL ESTRÉS FÍSICO POR INMOVILIZACIÓN EN RATONES WT Y KO

A. Niveles de corticosterona en condiciones de estrés por LPS



B. Niveles de ACTH en condiciones de estrés por LPS

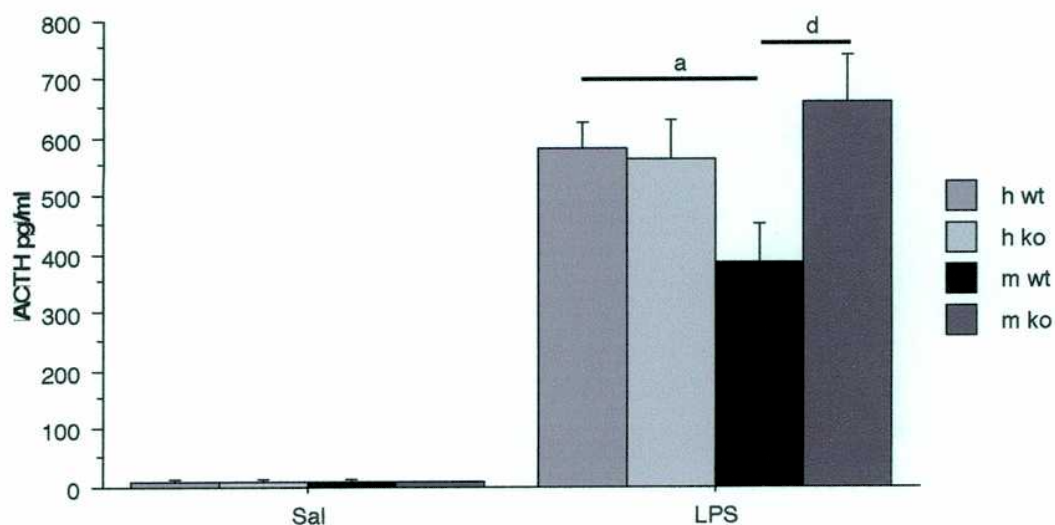


Figura 14: Evaluación de las funciones del HPA utilizando dos paradigmas diferentes de estrés en ratones WT y KO

A y B. Niveles plasmáticos de CORT y ACTH en el estrés producido por la acción de una endotoxina bacteriana (LPS).

C. Niveles de corticosterona en condiciones de estrés por inmovilización

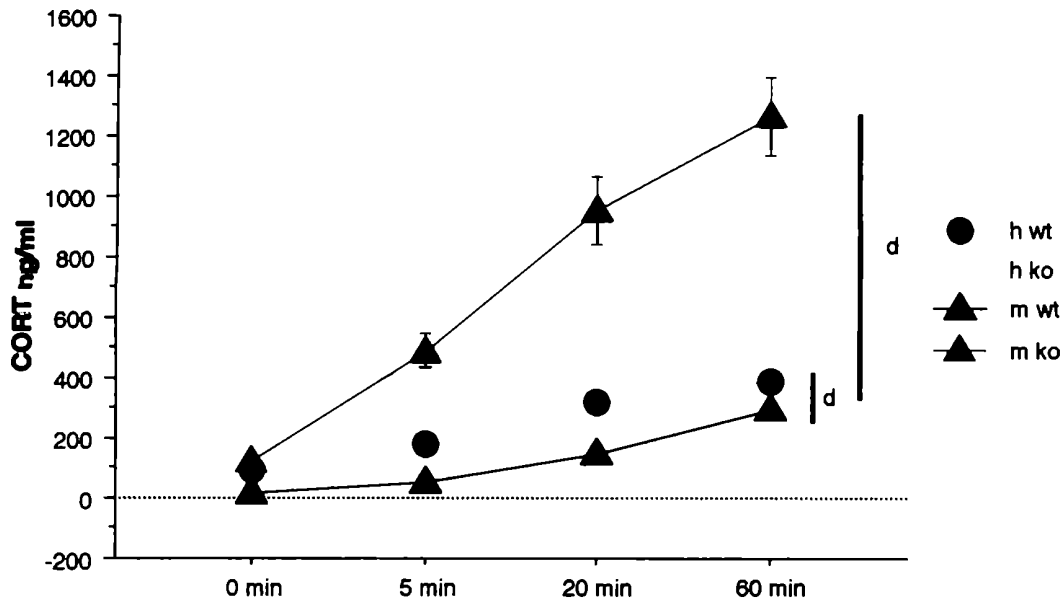


Figura 14: Evaluación de las funciones del HPA utilizando dos paradigmas diferentes de estrés en ratones WT y KO

A y B. Niveles plasmáticos de CORT y ACTH en el estrés producido por la acción de una endotoxina bacteriana (LPS) C. Niveles plasmáticos de CORT en el estrés producido por inmovilización. Las barras representan valores promedio \pm error estándar de 10 determinaciones por sexo y genotipo. Las inyecciones se realizaron con 100 μ l de toxina (0.25 mg/ml) o 100 μ l de vehículo en paralelo para controlar el estrés producido por la inyección. Después de 3 hs. los ratones fueron decapitados de acuerdo a los pares organizados para la inyección. La sangre fue colectada en presencia de EDTA (75 mg/ml), centrifugada y reservado el suero inmediatamente a -70°C para la determinación de CORT y ACTH por RIA.

C. Niveles plasmáticos del CORT en el estrés por inmovilización. Los ratones fueron sometidos al estrés por inmovilización por 20 minutos dentro de un tubo plástico. Las muestras de sangre para la determinación del CORT fueron obtenidas por sangrado de la cola a tiempo 0, sin inmovilizar, y luego a los 5 y 20 minutos durante la inmovilización. Después de los 20 minutos de inmovilización los ratones fueron devueltos a sus jaulas para permitir la recuperación y decapitados 40 minutos mas tarde para la cuantificación de los niveles residuales de CORT en suero. Las curvas muestran la evolución de los niveles del CORT en los 60 min. del experimento. Cada tiempo está expresado en valores promedio \pm error estándar de 8 determinaciones s por sexo y genotipo.

En todos los casos los animales fueron enjaulados individualmente 48 hs antes del experimento.

En el tratamiento con LPS existe un efecto del tratamiento que eleva los niveles del CORT y ACTH de forma significativa (ANOVA, $d=p<0.0001$ para CORT y ACTH).

Los resultados mostraron que la ausencia de SST en el HPA es responsable de la presencia de dos efectos . Por una lado la presencia del dimorfismo sexual, observados en A, B y C donde las hembras WT exhibieron niveles hormonales superiores a los de los machos WT (ANOVA, $d=p<0.0001$ por análisis de Fisher). Mientras que el dimorfismo sexual es perdido en los machos KO cuando son sometidos al condiciones de estrés..El segundo efecto está relacionado con el genotipo, tanto los machos como las hembras que carecen de SST sufrieron un incremento desproporcionado de los niveles de CORT respecto de los de ACTH, como se observa en A. sugiriendo la participación de la SST en por lo menos dos mecanismos que regulan las funciones del HPA.

7.3 Evaluación de niveles de ansiedad

Por último, para investigar si los elevados niveles del CORT y ACTH presentes en los ratones que carecen de SST están acompañados de alguna alteración en la conducta, se evaluó el comportamiento de estos ratones utilizando un laberinto elevado en cruz y la actividad locomotora espontánea. Figura 15.

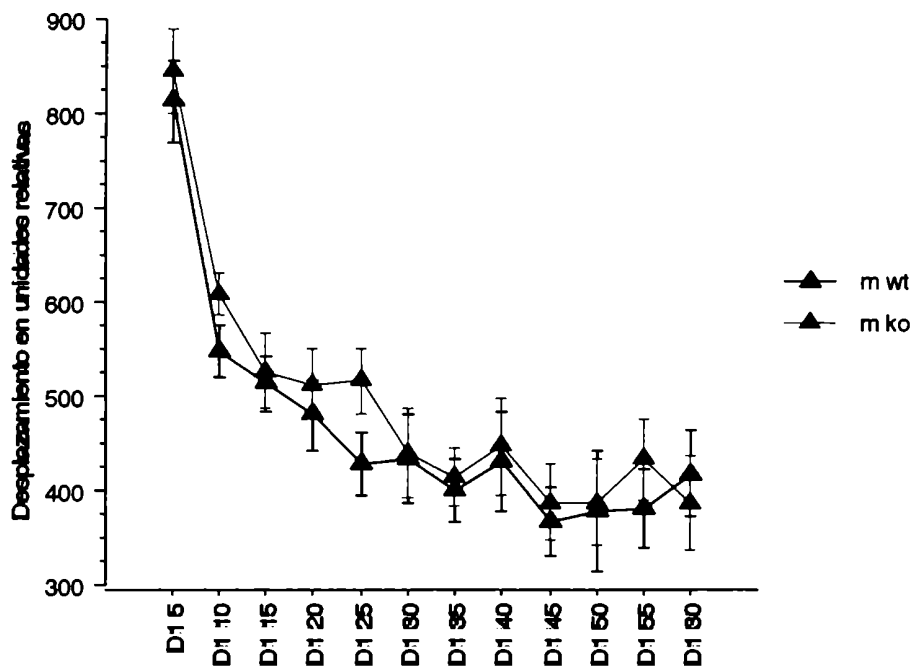
Los experimentos de actividad locomotora fueron realizados por la noche en virtud de los hábitos nocturnos de los roedores. Los experimentos se realizaron en dos días consecutivos durante 1 hora cada día, tomando los registros de su actividad en intervalos de 5 minutos. El aparato donde se midieron tanto el desplazamiento horizontal como movimiento vertical, momentos de inactividad y tiempo invertido en el desplazamiento consta de una caja de acrílico sin tapa que se encuentra dentro de una cámara oscura a través de la cual es posible observar al ratón. Los movimientos fueron censados por rayos infrarrojos acoplados al registro en una computadora. La pantalla mostró en todos los casos el mismo tipo de trayectoria en el desplazamiento y el análisis de la distancia recorrida por cada uno de los grupos por ANOVA de medidas repetidas, no mostró diferencias significativas entre los genotipos (Figura 15 A).

El laberinto en cruz ha sido ampliamente utilizado en el análisis de conductas relacionadas con la ansiedad que pueden ser evaluadas en función de la preferencia de los ratones a permanecer en los espacios cerrados del laberinto.

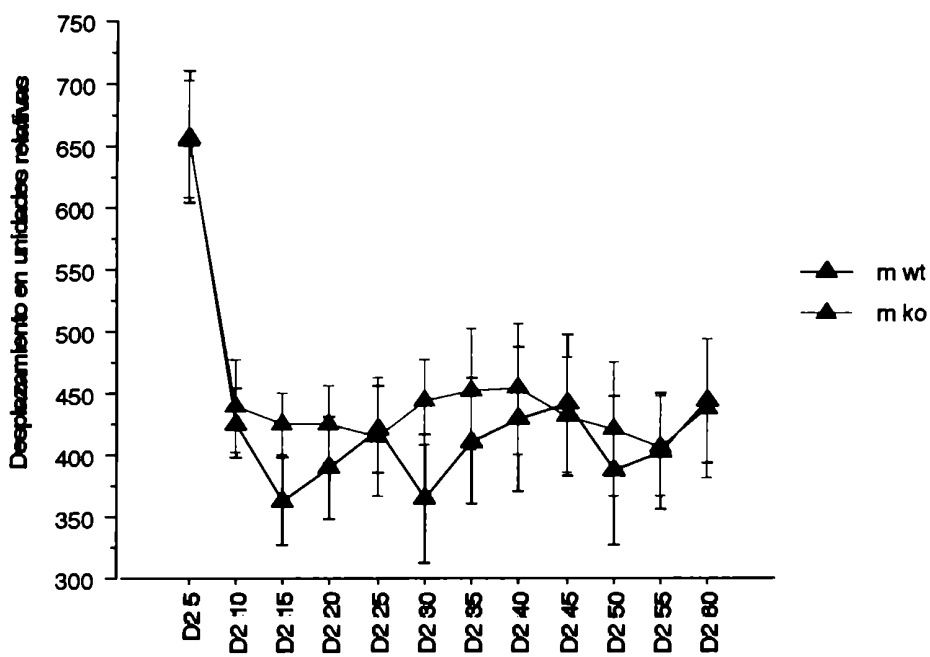
Los ratones fueron sometidos por única vez 5 min. a un laberinto en forma de cruz donde dos brazos opuestos están protegidos lateralmente por la presencia de balcones de acrílico simulando un espacio semi-cerrado. En este experimento se cuantificaron, el número de entradas a los espacios abiertos (no protegidos por los balcones de acrílico) y semi-cerrados, así como la permanencia en tiempo total en cada uno de los brazos. (Figura 15 B). Los resultados no mostraron diferencias significativas ni en el número de entradas ni en la permanencia en los espacios abiertos entre los dos genotipos WT y KO.

EVALUACIÓN DE NIVELES DE ANSIEDAD

A. Actividad locomotora Día 1



B Actividad locomotora Día 2



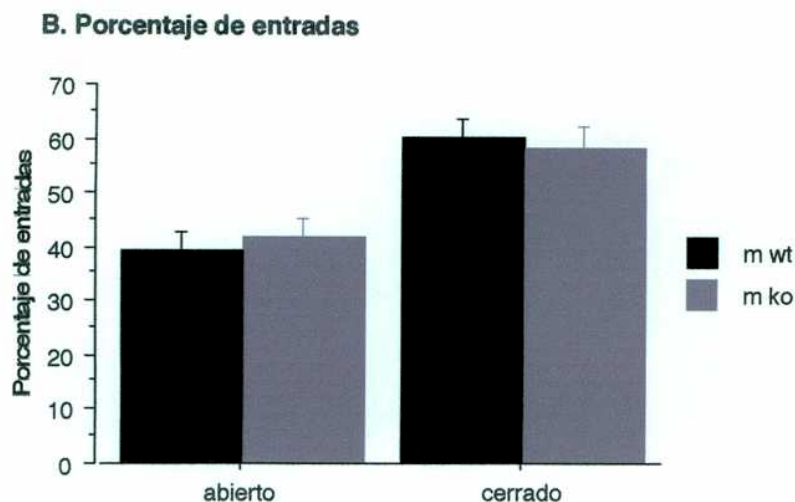


Figura 15: Evaluación de los niveles de ansiedad de ratones WT y KO.

En A. Actividad locomotora testeada en dos días consecutivos. B. Porcentaje de entradas a espacios cerrados en el laberinto en cruz.

A. Los ratones machos WT y KO fueron sometidos a un ensayo de actividad locomotora espontánea durante la noche por dos días consecutivos utilizando un aparato descrito previamente en la sección de Materiales y Métodos. El desplazamiento espontáneo de los ratones fue registrado durante 60 min. con datos parciales cada 5 minutos. Cada tiempo representa el desplazamiento promedio en unidades relativas \pm de 8 ratones de cada genotipo. En B los ratones fueron sometidos a 5 minutos de actividad en un laberinto elevado en cruz donde se cuantificó número de entradas a los espacios cerrados. Las barras expresan en porcentaje el número promedio de entradas a los espacios cerrados \pm el error estándar de 18 ratones de cada genotipo.

Los resultados no muestran diferencias significativas ni en la locomoción espontánea, ni en el número de entradas a los espacios cerrados entre los animales WT y KO, sugiriendo que los elevados niveles de corticosterona no se ven reflejados en un mayor nivel de ansiedad.

8. Discusión de la los efectos de la ausencia de SST en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal

Así como en las funciones del eje hipotalámico-hipofisario-somatotrópico, los machos que carecen de SST muestran la feminización de las funciones del HPA, indicando que la presencia de SST es necesaria para el establecimiento del dimorfismo sexual. Los ratones KO exhiben el peso de sus glándulas adrenales y los niveles de CORT y ACTH similares a los niveles observados en las hembras pero muy diferentes de los observados en los machos WT, indicando que la SST podría funcionar como un componente supresor esencial para mantener los bajos niveles plasmáticos de las hormonas de estrés en los machos.

Tanto las funciones basales como las que regulan el estrés en el HPA aparecen feminizadas en los machos que carecen de SST. En este sentido, la presencia de SST en los núcleos peri- y paraventricular del hipotálamo, en las células piramidales de la CA1 del hipocampo y en áreas corticales señalan a esta hormona como posible mediadora de los proceso que regulan la fisiología del HPA.

En los animales normales, los estrógenos juegan un papel esencial en el establecimiento de los componentes que regulan las funciones basales y del estrés como se deduce de la abundante expresión de los receptores a estrógenos (ERs) en las neuronas de CRH del núcleo paraventricular de las hembras. Por lo tanto, en condiciones basales, las hembras normales están continuamente expuestas a niveles mas elevados de ACTH y CORT que los machos. La exposición crónica a elevados niveles de ACTH y CORT se ve reflejada en el aumento de peso y la hipertrofia natural que presentan sus glándulas adrenales.

Los estudios acerca de influencia de la testosterona en el HPA son controvertidos y por lo tanto la función de los andrógenos en el HPA ha sido menos caracterizada. Sin embargo la activación del HPA en los machos podría explicarse por la presencia de receptores a andrógenos (ARs) en las células piramidales CA1 del hipocampo y en áreas que rodean al núcleo paraventricular del hipotálamo. Estas células, que finalmente se proyectan al hipotálamo dorsal,

podrían ser activadas a través de los receptores a andrógenos y esa actividad transmitida a las células productoras de CRH, estimulándolas.

Los bajos niveles de ACTH y CORT en la intensidad de la respuesta de los machos comparados con la de las hembras conducen la idea de la presencia de varios mecanismos de acción que podrían actuar en forma exclusiva o combinada en la regulación de las funciones del HPA. El primero, donde las células de CRH reciben un estímulo de menor intensidad que se ve reflejado en una respuesta de menor magnitud en los niveles plasmáticos de las hormonas del estrés. El segundo, donde el estímulo y la respuesta sean de una magnitud comparable a la de las hembras pero bajo la acción supresora de un agente diferencialmente expresado en los machos que permita disminuir los elevados niveles de respuesta. Y por último, el feedback a nivel central que permite el restablecimiento de los niveles de corticoides adrenales a sus valores normales muy rápidamente en los machos.

En rigor, ninguno de estos mecanismos parece ser exclusivo, ni ha sido totalmente elucidado hasta el momento, sino que cada uno participa desde algún aspecto en la regulación de las funciones del HPA.

En el primero de los mecanismos, la eficiencia en los niveles de activación del HPA en los machos, podría estar disminuida como consecuencia de la ausencia de receptores a andrógenos en las células de CRH. La activación de las células de CRH a través de un mecanismo indirecto, podría ser el origen de una respuesta de menor intensidad. Sin embargo, los machos que carecen de SST demuestran su potencial capacidad de elevar la magnitud de la respuesta a niveles comparables con los de las hembras.

El segundo, parece seguir el comportamiento de muchos otros mecanismos que están controlados una presencia inhibitoria, más que por una disminución en la magnitud de la respuesta. Es decir que la activación del sistema HPA se produce por *default* como en las hembras, pero es suprimida por presencia de un agente inhibidor, de la misma forma que sucede con la liberación de GH, donde la presencia de intervalos muy prolongados de indetectable

concentración de hormona en el plasma está debida a la acción inhibitoria de la SST. La presencia de SST en áreas como el tálamo, el núcleo paraventricular del hipotálamo y las células piramidales de la CA1 del hipocampo, podrían indicar, en los machos, la influencia de la hormona en la supresión de la magnitud en la respuesta del HPA. Los efectos observados en los machos KO, donde aparecen las respuestas feminizadas, se asemejan a los presentes en la feminización de los machos en la fisiología del eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico. La ausencia de SST en los ratones KO podría ser traducida en la falta de acción supresora sobre la activación del HPA tanto en condiciones basales como en presencia de estrés, mostrando elevados niveles plasmáticos de ACTH y CORT. De hecho, los machos que carecen de SST presentan las glándulas adrenales similares en peso y tamaño a las de las hembras, consecuente con la exposición crónica a altos niveles de ACTH. Los niveles de ACTH y CORT de similar magnitud a los de las hembras son una evidencia que podría contradecir, en primera instancia, el mecanismo propuesto anteriormente donde se propone una disminución en la respuesta a la activación del HPA, fortaleciendo la idea de la acción supresora de la SST. Por último, en las hembras existe un déficit en el control negativo de CRH por feedback que es debido a la acción de los receptores a glucocorticoides. El efecto inhibitorio del HPA a nivel central está mediado por los receptores a glucocorticoides (GRs) y los receptores a mineralocorticoides (MRs). Ambos tipos de receptores unen glucocorticoides pero los MRs lo hacen con mas afinidad que los GRs. Esto significa que los GRs necesitan altos niveles de CORT para activar el control negativo de CRH a nivel central, mientras que los MRs, mas sensibles, son capaces de unir corticoides adrenales a muy bajas concentraciones. La presencia de dos tipos de receptores que unan glucocorticoides en células donde normalmente se produce SST como las células piramidales de CA1 del hipocampo, o las del núcleo paraventricular del hipotálamo podrían constituir un mecanismo adicional en el control de la fisiología del HPA.

El incremento de peso que muestran los machos que carecen de SST puede ahora ser explicado en el contexto de los elevados niveles de CORT plasmáticos que presentan los

animales KO. Muchas líneas de investigación han postulado a los glucocorticoides adrenales, como la corticosterona, ser los responsables de la hiperfagia y la ganancia de peso en los ratones obesos (Green et al., 1992). Los machos que carecen de SST pueden ser fácilmente identificables en una jaula de varios ratones de ambos genotipos debido a su diferencia de peso.

Por lo tanto, las diferencias observadas en el incremento del peso de los ratones WT y KO no están debidas a un aumento real en el tamaño consecuencia de la presencia de gigantismo, ni de efectos secundarios como resultado de la presencia de la mutación sino mas bien consecuencia de los niveles elevados de glucocorticoides adrenales debidos a la pérdida del dimorfismo sexual en las funciones del HPA que elevan los niveles de Corticosterona y por lo tanto la ingesta.

Varias líneas de investigación han relacionado los elevados niveles de glucocorticoides con estados patológicos como la depresión y la ansiedad. Los tratamientos con dexametasona, son capaces de revertir el elevado nivel de glucocorticoides en condiciones normales, pero no pueden hacerlo en casos de exposición crónica a los glucocorticoides adrenales. Los estudios de ansiedad utilizando el laberinto elevado en cruz y la actividad locomotora espontánea en los ratones que carecen de SST, demuestran que el incremento de los niveles de corticoides adrenales no tiene efectos en la conducta de estos animales. Los ratones KO y WT invierten el mismo tiempo en espacios abiertos y cerrados, así como el número de entradas. De la misma forma los registros de la actividad locomotora en cuanto al desplazamiento, tiempo invertido en el desplazamiento y el reposo entre los dos genotipos no muestran diferencias en la motivación producida por un entorno novedoso. Estos resultados podrían indicar que los elevados niveles de exposición a los glucocorticoides adrenales, en ausencia de SST, no alteran de forma evidente los mecanismos de feedback a nivel central tal como sucede en las hembras en condiciones normales, que también se caracterizan por la presencia de elevados niveles de corticosteroides adrenales circulantes. En este sentido un estudio mas profundo de estos animales podría

esclarecer los mecanismos de disfunción de HPA en patologías como la depresión en la ansiedad y su vínculo con el sistema SSTérgico.

9. Evaluación de la ausencia de SST extrahipotalámica . Paradigmas conductuales

Tanto la SST como sus proyecciones y sus receptores han sido localizados en diferentes áreas del SNC que incluyen la corteza cerebral (Cx), septum, estriado y el sistema límbico, amígdala (Am) e hipocampo (HIP). Estas estructuras están, todas, involucradas de alguna manera en los procesos de consolidación de la memoria.

Varias líneas de trabajo muestran una fuerte asociación entre la pérdida de inmunorreactividad positiva en las neuronas SSTérgicas de la corteza y la disminución progresiva de facultades cognitivas, como ha sido observado en la enfermedad de Alzheimer y en el envejecimiento natural. (Tullio et al. 1991; Miettinen et al, 1993).

Por otra parte, las manipulaciones experimentales de los niveles de somatostatina en roedores como su depleción con tratamientos con Cysteimina resultan en la inhabilidad de adquirir, retener o evocar información en los tests de evitamiento activo y pasivo y memoria de trabajo (Harountunian et al. , 1987; Cook et al., 1989; Bakhit et al., 1986). Estas alteraciones pueden ser revertidas o mejoradas mediante la inyección i.c.v de somatostatina así como la de sus análogos (Matsuoka et al, 1994; Matsuoka et al., 1992). Por último la formación de los LTP, procesos involucrados en la memoria y el aprendizaje, están significativamente incrementados por la adición exógena de somatostatina en las fibras musgosas de la CA3 del hipocampo (Matsuoka et al., 1991), sumando mas evidencias sobre el posible papel modulador de la SST. En este sentido, el modelo de un ratón que no expresa SST es una oportunidad para estudiar la verdadera participación de la SST en los procesos de memoria.

Para investigar los efectos de la ausencia de SST en los procesos de memoria se ensayaron diversos paradigmas experimentales utilizando un estímulo no condicionado como la presencia de un shock eléctrico.

La memoria asociativa de corto y largo plazo fue evaluada con el test de evitamiento pasivo y en el condicionamiento por miedo. Como se describe en la sección de Materiales y Métodos, ambos tests consisten en evaluar la capacidad de estos ratones de asociar a un espacio físico determinado, la presencia del estímulo eléctrico. En el condicionamiento por miedo el test es complementado con un análisis de las funciones de memoria independientes del hipocampo, como puede ser un tono auditivo y que sirven para evaluar la memoria de otros circuitos. En este experimento se ensayaron 12 ratones de cada sexo y genotipo. La intensidad del estímulo eléctrico a utilizar en el shock fue determinada con una curva donde se sometió a los ratones a varias intensidades de corriente provocando diferentes actitudes estereotípicas como caminar mas rápido sobre la grilla, vocalizar, saltar o saltar y vocalizar simultáneamente. Los 12 ratones de cada genotipo fueron aclimatados 1 h en el cuarto donde se realizó el experimento. En el día 1 los ratones fueron sometidos al entrenamiento en el compartimento con la presencia de una luz muy intensa (estímulo condicionado) y se tomó el tiempo de latencia en el que entran al otro compartimento, donde reciben el shock (0.18mA). Un grupo de animales equivalente fue sometido al mismo entrenamiento, pero al entrar al compartimento no recibió el shock. Todos los animales fueron devueltos al bioterio inmediatamente después del experimento y el test para evaluar la adquisición del aprendizaje fue realizado a los 60 min. y a las 24 hs. de aplicado el shock. Los resultados mostraron que en los dos tiempos analizados los ratones KO no pudieron retener el aprendizaje a pesar que todos los ratones vocalizaron dentro del compartimento, indicando que recibieron el estímulo eléctrico. Por el contrario, los ratones que no recibieron el shock en el día 1, no mostraron diferencias en la latencia respecto del día del entrenamiento confirmando que, el aumento de la latencia observado en los ratones WT no está debido a la búsqueda de novedad dentro del mismo compartimento sino al efecto del shock. En la figura se muestra el análisis de los datos a través de una estadística no paramétrica para el test de evitamiento pasivo de 1 y 24 h (Mann-Whitney, wt vs. ko $p=0.032$ y $p=0.0081$, para 1 h y 24 hs respectivamente). Figura 16.

EVALUACIÓN DE LA MEMORIA A CORTO Y LARGO PLAZO UTILIZANDO EL TEST DE EVITAMIENTO PASIVO Y EL CONDICIONAMIENTO POR MIEDO.

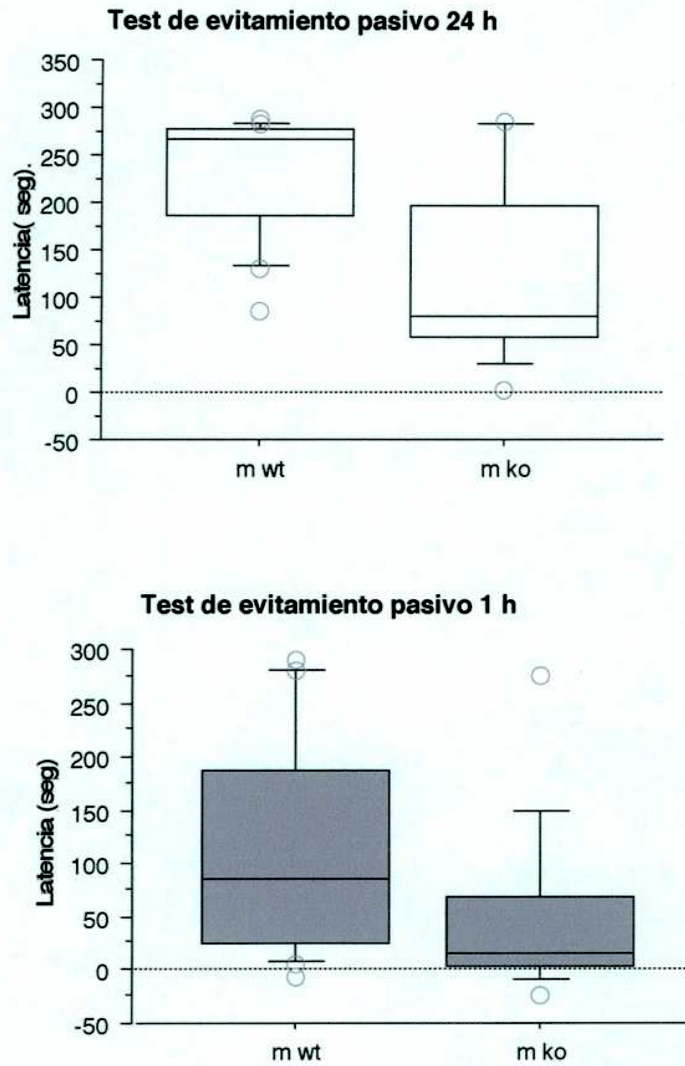


Figura 16: Evaluación de la memoria de corto y largo plazo utilizando un test de evitamiento pasivo.

B. Condicionamiento por miedo

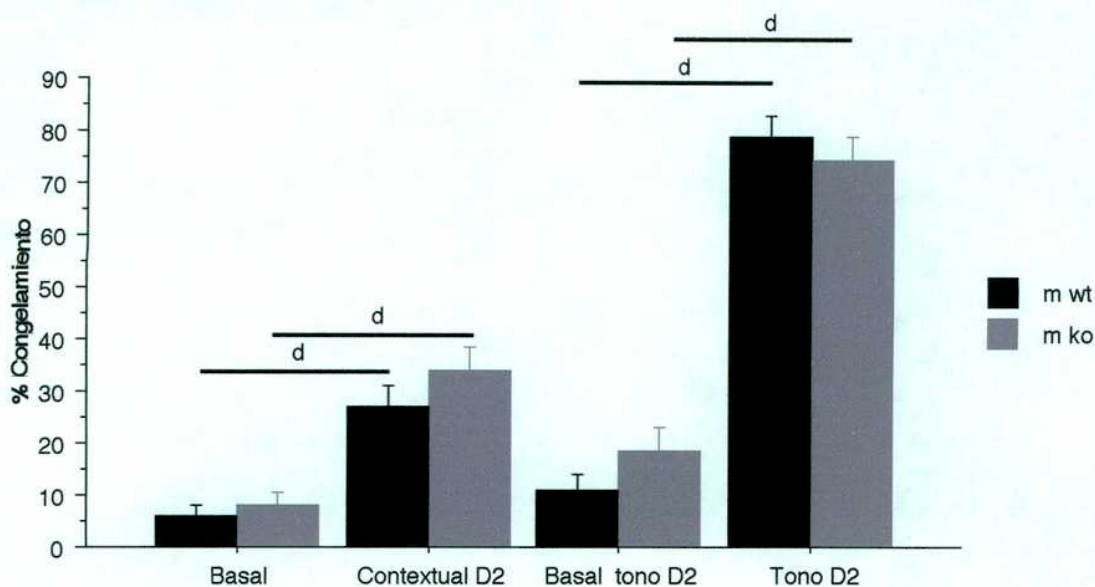


Figura 16: Evaluación de la memoria de corto y largo plazo utilizando un test de evitamiento pasivo y el condicionamiento por miedo.

A. Evitamiento pasivo con test a 1 h y a 24 h. Los animales fueron entrenados en el día 1 donde se registró la latencia para entrar al compartimento oscuro. Una vez dentro del compartimento, los ratones recibieron un shock eléctrico de 0.18 mA y fueron testeados 1 h o 24 h después del test. Los valores en la figura fueron analizados según una estadística de Mann-Whitney y representan la media de la altencia del Día 2 – Día 1 con la distribución no paramétrica de los datos. Tanto a corto como a largo plazo, los animales KO mostraron un déficit en la retención de los eventos aprendidos durante el entrenamiento (Mann-Whitney, wt vs. ko $p=0.032$ y $p=0.0081$, para 1 y 24 h respectivamente). En B. Condicionamiento por miedo. Como se describe en la sección de materiales y Métodos, los ratones fueron sometidos a una aclimatación en un lugar novedoso por 5 min., después de los cuales, se aplicó un tono por 30 seg. de 85 db que fue seguido por la presencia de un shock eléctrico de 0.5 mA durante 4 segundos. Una vez terminada la sesión del shock., ningún estímulo fue presentado durante 1 min. Terminado el tiempo, la serie de sonido, shock y ausencia de estímulo fue repetida por 3 veces mas. El test se realizó a las 24 h del entrenamiento para evaluar la memoria contextual y la dependiente de claves auditivas. Se cuantificaron en cada caso el número de veces que el ratón permaneció en la actitud de congelamiento (*freezing*). Las barras indican en porcentaje el valor promedio \pm error estándar de posiciones típicas de congelamiento (ausencia total de movimiento, con excepción de la respiración) respecto del total de movimiento cuantificados durante 3 min. Los resultados muestran que la ausencia de SST no tiene consecuencias en la retención de la memoria contextual (dependiente de hipocampo), ni en la memoria con claves auditivas. Las diferencias significativas obtenidas reflejan que los ratones pueden asociar el espacio físico con el shock y “congelar” sus movimientos. Este fenómeno es aún de mayor intensidad con las claves auditivas (ANOVA, $d=p<0.0001$, análisis de Fisher).

El condicionamiento por miedo, en cambio no presenta diferencias entre los animales de los dos genotipos ni en la memoria contextual dependiente del hipocampo ni en la memoria con claves auditivas. El experimento se realizó según se detalla en la sección de los Materiales y Métodos. En el día 1 los ratones fueron ubicados en un espacio físico novedoso y cuantificados sus movimientos basales. Después de 5 min. los animales recibieron un tono de 85 db por 30 seg. seguido de la presentación de un shock de 0.5 mA por 4 seg. Los animales no recibieron ningún estímulo en el minuto siguiente importante en la consolidación de los eventos recientemente ocurridos. La serie de sonido y shock fue repetida por 3 veces más. Luego, los animales fueron devueltos al bioterio hasta el día siguiente que fueron testeados. Los test se hicieron en el espacio físico donde recibieron el shock por 3 min. en ausencia de tono y se cuantificó el número de veces que el animal presenta la posición de congelamiento. Después de 2 hs, se hizo el test con claves auditivas en un espacio físico diferente. Como se observa en la figura, tanto los ratones normales como los mutantes son capaces de retener la memoria contextual y la proveniente de claves auditivas. Estos resultados parecen contradecir el déficit presente en los test de evitamiento pasivo. Por un lado porque el condicionamiento de miedo podría interpretarse como una versión de mayor alcance que el test de evitamiento pasivo, y también evalúa la capacidad de asociar un espacio físico y un estímulo, como un shock eléctrico. Por otro lado, los ratones no tienen reacción de “congelamiento” en el compartimento donde recibieron el shock durante los tests de evitamiento pasivo. Si bien es cierto que el shock utilizado es de mayor intensidad en el condicionamiento por miedo y esto podría redundar en la respuesta de “freezing”.

Estos resultados podrían indicar la participación de la SST en la memoria en algunos de los mecanismos que transmiten el flujo de la información desde la corteza hacia el hipocampo a través de las células parahipocampales en la CA1, o dentro del hipocampo mismo en el giro dentado. Los resultados del condicionamiento de miedo prueban que los ratones KO, pueden retener otro tipo de información proveniente de otras vías sensoriales que no estén mediadas por las células de la corteza parahipocampal.

CONCLUSIONES GENERALES

- En esta tesis se han investigado los efectos de la ausencia del neuropéptido SST utilizando un ratón que porta una mutación nula en el gen de *sst* y que causa la pérdida selectiva y completa de todas las formas de la hormona en el sistema nervioso central y en los tejidos periféricos.
- En el sistema nervioso central la ausencia de la SST no genera alteraciones morfológicas en el normal desarrollo de las estructuras cerebrales analizada. Tampoco se observan efectos compensatorios en la expresión y el número de neuronas productoras de GHRH en el núcleo arcuato del hipotálamo.
- La ausencia de SST no presenta alteraciones en las estructuras morfológicas del páncreas endócrino ni parece modificar la expresión de péptidos y hormonas que son normalmente reguladas por la SST. Contrariamente a lo esperado, los ratones que carecen de SST mantienen la homeostasis de la glucosa y los niveles normales de insulina plasmática. La expresión normal de glucagon, neuropéptido Y e insulina en los islotes de Langerhans sugiere que el control en la liberación de estas hormonas y péptidos pancreáticos no estaría ejercido únicamente por la presencia de SST en el tracto gastrointestinal.
- La ausencia de SST en el hipotálamo demuestra el papel central de la hormona como mediadora en el establecimiento del patrón sexualmente dimórfico de la secreción de hormonas hipofisarias de los ejes hipotalámico-hipofisario-somatotrópico e hipotalámico-hipofisario-adrenal.
- Una gran variedad de marcadores fisiológicos del eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico pierden su dimorfismo sexual característico en ausencia de SST. Los machos que carecen de SST presentan un patrón feminizado en la expresión de los genes hepáticos sexualmente dimórficos del hígado que responden a la pulsatilidad de secreción de la hormona de crecimiento (GH) propia de cada sexo. Por lo tanto, la actividad supresora o inhibitoria de la SST en la liberación de GH resulta indispensable para establecer el patrón sexualmente dimórfico en la secreción de la hormona de crecimiento.
- Contrariamente a lo esperado, el dimorfismo sexual en la longitud y el peso es mantenido en los ratones que carecen de SST. Tanto los ratones mutantes machos como hembras mostraron una curva de crecimiento idéntica a la de sus hermanos salvajes, indicando una participación de la SST en la fisiología del crecimiento, diferente a la aceptada hasta el momento. La función de la SST podría extenderse, entonces, a un concepto mas amplio que el de “el” factor hipotalámico inhibitor de la secreción de GH . Esta nueva concepción implica a la SST como responsable, al menos en parte, del origen de la diferenciación sexual a través de su participación en el ritmo de los pulsos de GH mas que en la modificación de sus concentraciones plasmáticas medias.

- En el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal, los machos que carecen de SST también exhiben un patrón feminizado de las funciones basales del HPA. La ausencia de SST en los machos, ocasiona la pérdida del dimorfismo sexual y eleva los niveles de ACTH y corticosterona a valores similares a los de las hembras en los ritmos diurnos. Consistente con la acción trófica de la ACTH, los machos también muestran una hipertrofia en sus glándulas adrenales de un tamaño equivalente al que se observa normalmente en las hembras.

- De la misma forma que en el eje hipotalámico-hipofisario-somatotrópico, la acción inhibitoria de la SST a nivel central resulta esencial para el establecimiento de los componentes que regulan el HPA en condiciones basales .

- La ausencia de SST, es responsable, además, de la presencia de un segundo efecto, donde los ratones que carecen de SST exhiben niveles exacerbados de corticosterona en ambos sexos en respuesta a diferentes tipos de estrés, el estrés inmunológico por la acción de una endotoxina bacteriana y el físico por inmovilización. A diferencia de la disfunción observada sólo en los niveles basales de los machos que carecen de SST, el incremento en los niveles de corticosterona en condiciones de estrés, no está acompañado por el correspondiente aumento en los niveles de ACTH , indicando que la SST podría intervenir en al menos dos mecanismos diferentes de control de las funciones del HPA.

- Por último la ausencia de SST en el sistema límbico y la corteza cerebral produce un déficit en la retención de memorias aprendidas en un test de evitamiento pasivo a corto y largo plazo, pero ninguna alteración de la memoria espacial dependiente e independiente del hipocampo. Estos resultados sugieren que la SST podría mediar a través de las células piramidales del área parahipocampal el flujo de información desde la corteza hacia los circuitos de consolidación de la memoria en el hipocampo.



Dr. Marcelo Rubinstein
INGEBI (UBA-CONICET)



VERONICA OTERO

ÍNDICE

Introducción: *La somatostatina*

1. Reseña histórica de su descubrimiento,	2
2. El gen de <i>sst</i> ,	5
2.1 Origen evolutivo y unidad transcripcional,	5
2.2 Control transcripcional,	6
2.3 Antecedentes en la identificación de elementos de regulación transcripcional del gen de <i>sst</i> ,	7
3. La proteína SST como neuropéptido y neuromodulador,	9
3.1 Procesamiento, secreción y transporte,	9
3.2 Distribución anatómica. Generalidades,	10
3.3 Distribución en el sistema nervioso central,	11
3.3.1 La SST en el hipotálamo y la corteza cerebral,	11
3.3.2 La SST en el sistema nervioso periférico,	13
3.4 Distribución de la SST en el tracto gastrointestinal (TGI). Páncreas, intestino y estómago,	14
4. Receptores de SST (SSTRs),	14
4.1 Estructura,	15
4.2 Distribución anatómica. Generalidades,	15
4.2.1 Distribución en cerebro e hipófisis,	17
4.2.2 Distribución en tejidos periféricos,	19
5. Fisiología de la somatostatina,	20
5.1 Aspectos neuroendócrinos: SST y GH,	20
5.1.1 Regulación de GH hipofisaria por SST y GHRH,	20
5.1.2 Pulsatilidad de la hormona de crecimiento,	22
5.1.3 La pulsatilidad y el dimorfismo sexual,	23
5.1.4 La pulsatilidad y sus efectos en el hígado,	26
5.2 La SST y el eje hipotalámico hipofisario adrenal,	30
5.3 La SST extrahipotalámica y su papel en la memoria,	35

Modelo de trabajo y objetivos,	40	
Materiales y Métodos,	42	
1. Obtención de ADN genómico		
2. Genotipificación por PCR,	43	
2.1 Identificación de bandas,	43	
3. Bioterio,	44	
4. Inmunohistoquímica,	44	
4.1 Tratamiento con colchicina y adsorción de anticuerpos,		44
4.2 Fijación de los tejidos,	45	
4.3 Preservación de las secciones a -20°C,	45	
4.4 Reacciones con anticuerpo,	46	
4.5 Anticuerpos y diluciones utilizadas,	47	
5. Expresión de proteínas dimórficas en el hígado,	48	
5.1 Preparación de ARN total,	48	
5.2 Geles y transferencia de ARN,	49	
5.3 Sondas utilizadas. Marcado de las sondas y condiciones de hibridación,		50
6. Determinación de CORT y ACTH,	52	
6.1 Niveles basales,	52	
6.2 Estrés producido por la inyección LPS,	52	
6.3 Estrés producido por inmovilización,	53	
7. Ensayos de RIA y determinaciones plasmáticas,	54	
8. Paradigmas conductuales,	55	
8.1 Actividad locomotora,	55	
8.2 Laberinto elevado en cruz,	56	
8.3 Evitamiento pasivo,	57	
8.4 Condicionamiento por miedo,	58	

Resultados y Discusión, 60

1. Generación y diagnóstico de animales deficientes en SST (KO). *Figuras 1 y 2,* 60
 - 1.1 Mutación dirigida al *locus* de SST por recombinación homóloga, 61
 - 1.2 Genotipificación por PCR, 62
2. Evaluación de la presencia de somatostatina en tejidos periféricos. *Figuras 3, 4 y 5.,* 64
 - 2.1 Evaluación de los contenidos de SST en cerebro, estómago e intestino, 64
 - 2.2 Expresión de SST y, hormonas y péptidos pancreáticos (insulina, glucagon y neuropéptido Y) en el páncreas, 65
 - 2.3 Efecto de la ausencia de SST en la liberación de insulina, 69
3. Evaluación de la presencia de somatostatina en el sistema nervioso central. *Figuras 6 y 7,72*
 - 3.1 Expresión de SST y GHRH en el hipotálamo, 72
 - 3.2 Expresión de SST y marcadores estructurales y neuroanatómicos en amígdala e hipocampo: SST calbindina, calretinina, parvalbumina, tinción de Nissl y Acetilcolinesterasa., 75
4. Efectos de la ausencia de SST en el eje hipotalámico-hipofisario-somatotrópico, 81
 - 4.1 Evaluación del peso y la longitud corporal como parámetros del crecimiento. *Figuras 8 y 9,* 82
 - 4.2 Evaluación de efectos compensatorios hipotalámicos e hipofisarios: Niveles plasmáticos de IGF-1 y Contenidos hipofisarios de GH. *Figuras 10 y 11,* 95
5. Efectos de la ausencia de SST en el hígado, 97
 - 5.1 Pulsatilidad y expresión de proteínas sexualmente dimórficas en el hígado.: MUPs I,II y III, ProR y CYP15 α /2A4. *Figura 12,* 104
6. *Discusión de los efectos de la ausencia de SST en el eje hipotálamo-hipofisario-somatotrópico,* 106
7. Evaluación de la ausencia de SST en el eje hipotalámico-hipofisario-adrenal (HPA). *Figuras 13, 14 y 15,* 108
 - 7.1 Determinaciones de CORT y ACTH en condiciones basales. Ritmos diurnos de secreción, 109
 - 7.2 Determinaciones de CORT y ACTH en condiciones de estrés: estrés inducido por endotoxina bacteriana (LPS) y por inmovilización, 115
 - 7.3 Evaluación de niveles de ansiedad: actividad locomotora y laberinto elevado en cruz, 122

8. <i>Discusión de los efectos de la ausencia de SST en el eje hipotálamo-hipofisario-adrenal,</i>	125
9. Evaluación de la ausencia de SST extrahipotalámica. Paradigmas conductuales. <i>Figuras 16,</i>	
129	
9.1 Evitamiento pasivo	
9.2 Condicionamiento por miedo	
Conclusiones generales del trabajo,	134
Referencias,	136

BIBLIOGRAFIA

Andrisani OM, Hayes TE, Roos B and Dixon JE. 1987. Identification of the Promoter Sequences Involved in the Cell Specific Expression of the Rat Somatostatin Gene. *Nucleic Acids Res* 15: 5715-5728.

Andrisani OM and JE Dixon. 1990. Somatostatin Gene Regulation. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 793-806.

Argente Jesus and Julie A Chowen. 1993. Control of the Transcription of the Growth Hormone-Releasing Hormone and Somatostatin genes by Sex Steroids. *Hormone Research* 40: 48-53.

Atkinson Helen C and Brendan J Waddell. 1997. Circadian Variation in Basal Plasma Corticosterone and Adrenocorticotropin in the Rat: Sexual Dimorphism and Changes across the Estrous Cycle. *Endocrinology* 138 (9):3842-3848.

Baimbridge KG, MR Celio and JH Rogers. 1992. Calcium Binding Proteins. *TINS* 15 (8): 303-308.

Baker J, Liu JP, Robertson EJ and Efstradiatis A. 1993. *Cell* 75:73-82.

Bakhit Charles and Neal Swerdlow. 1986. Behavioral Changes Following Central Injection of Cysteamine in Rats. *Brain Research* 365: 159-163.

Baldwin JM. 1994. Structure and Function of Receptors Coupled to G Proteins. *Curr Opin Cell Biol* 6:180-190.

Banbury Conference on Genetic Background in Mice. Mutant Mice and Neuroscience: Recommendations Concerning Genetic Background. *Neuron* 19: 755-759.

Bannerman DM, MA Good, SP Butcher, M Ramsay and RGM Morris. 1995. Distinct Components of Spatial Learning Revealed by Prior Training and NMDA Receptor Blockade. *Nature* 378:182-186.

Bertherat J, Dournaud P, Béroud A, Normand E, Bloch B, Rostène W, Kordon C and Epelbaum J. 1992. Growth Hormone-Releasing Hormone-Synthesizing Neurons are a Subpopulation of Somatostatin-Receptor-Labelled Cells in the Rat Arcuate Nucleus: A Combined in situ Hybridization and Receptor Light-Microscopic Radioautographic Study. *Neuroendocrinology* 56:25-31.

Bhalla Upinder S and Ravi Iyengar. 1999. Emergent Properties of Networks of Biological Signaling Pathways. *Science* 283: 381-387.

Bingaman EW, Magnuson D, Gray TS and Handa RJ. 1994. Androgens Inhibits the Increases in Hypothalamic Corticotropin Releasing Hormone (CRH) and CRH Immunoreactivity following Gonadectomy. *Neuroendocrinology* 59:228-234.

Bliss TVP and GL Collingridge. 1993. A Synaptic Model of Memory: Long Term Potentiation in the Hippocampus. *Nature* 361: 31-39.

Brazeau p, Vale W., Burgus R et al.,. 1973. Hypothalamic polypeptide that Inhibits the Secretion of Immunoreactive Pituitary Growth Hormone. *Science* 179: 77-79.

Brown M, Rivier J and Vale W. 1977. Somatostatin Analogs with Selected Biological Activities. *Science* 196:1467-1468.

Breder Christopher D, Yuichiro Yamada, Kazuki Yasuda, Susumu Seino, Clifford B Sapper and Graeme I Bell. 1992, Differential Expression of Somatostatin Receptor Subtypes in Brain. *J Neuroscience* 12 (10): 3920-3934.

Bruno John F, Yun Xu and Michael Berelowitz. 1992. Molecular Cloning and Functional Expression of a Novel Brain-Specific Somatostatin Receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89; 11151-11155.

Brownstein M, Arimura A, Fernandez-Durango R, Schally AV, Palkovits M and JS Kizer. 1977. The Effect of Hypothalamic Deafferentation on Somatostatin-like Activity in the Rat Brain. *Endocrinology* 100: 246-249.

Brownstein M, Arimura A, Sato H, Schally AV and JS Kizer. 1975. The regional Distribution of Somatostatin in the Rat Brain. *Endocrinology* 96: 1456-1471.

Burton Kimberly A, Emilia B Kabigting, Donald K Clifton and Roberta Steiner. 1992. Growth Hormone Receptor Messenger Ribonucleic Acid Distribution in the Adult Male Rat Brain and its Colocalization in Hypothalamic Somatostatin Neurons. *Endocrinology* 131 (2): 958-963.

Burgess LH and Handa RJ. 1992. Estrogen alters Adrenocorticotrophic Hormone and Corticosterone Secretion and Glucocorticoid Receptor Mediated Function. *Endocrinology* 131: 1261-1269.

Cain Donald Peter. 1997. LTP, NMDA, Genes and Learning. *Current Opinion in Neurobiology* 7: 235-242.

Carter-Su C, Schwartz J and Smit LS. 1996. Molecular Mechanism of Growth Hormone Action. *Ann Rev Physiol* 58:187-207.

Chen Chong and Susumu Tonegawa. 1997. Molecular genetic Analysis of Synaptic Plasticity, Activity-Dependent Neural Development, Learning, and Memory in the Mammalian Brain. *Annu Rev Neurosc* 20:157-184.

Chomczynski P and Sacchi N. 1984. Single Step Method for RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.

Chowen JA, Argente J, Gonzalez-Parra S and Garcia-Segura LM. 1993. Differential Effects of the Neonatal and Adult Sex Steroid Environments on the Organization and Activation of Hypothalamic Growth Hormone-Releasing Hormone and Somatostatin Neurons. *Endocrinology* 133: 2792-2802.

Chowen JA, Garcia-Segura LM, Gonzalez-Parra S, and Argente J. 1996. Sex Steroid Effects on the Development and Functioning of the Growth Hormone Axis. *Cellular and Molecular Neurobiology* 16 (3):297-309.

Chowen JA, Steiner R and Clifton DK. 1989. Sexual Dimorphism and Testosterone-Dependent Regulation of Somatostatin gene Expression in the Periventricular Nucleus in the Rat Brain. *Endocrinology* 125(1):357-362.

Chun Marvin M and Elizabeth A Phelps. 1999. Memory Deficits for Implicit Contextual Information in Amnesic Subjects with Hippocampal Damage. *Nature Neuroscience* 2 (9): 844-847.

Cook Larry L, Garth Bissette, Kenneth Dole and Charles B Nemeroff. 1989. A Critical Evaluation of Cysteamine as a Tool to Deplete Somatostatin in the Rat Central Nervous System. *Endocrinology* 124 (2): 855-861.

Corness JD, Demchyshyn LL, Seeman P, Van Tol HHM, Srikant CB, Kent G, Patel YC and Nizik HB. 1993. A Human Somatostatin Receptor (SSTR3), Located in Chromosome 22, Displays Preferential Affinity for Somatostatin-14 Like Peptides. *FEBS Lett* 321:279-284.

Crithlow V, Abe S, Urman S, and Vale W. 1981. Effects of Lesions of the Periventricular Nucleus of the Preoptic anterior Hypothalamus on Growth Hormone and Thyrotropin Secretion and Brain Somatostatin. *Brain res* 222:267-276

Davis SL, Ohlson DL, Klindt J and Anfinson MS. 1977. Episodic Growth Hormone Secretory Patterns in Sheep: Relationship to Gonadal Steroid Hormones. *Am J Physiol* 233:E 519.

Day R, Dong W, Panetta R, Kraiser J, Greenwood M and Patel YC. 1995. Expression of mRNA for Somatostatin Receptor (SSTR) Types 2 and 5 in Individual Rat Pituitary cells. A Double labelling in situ Hybridization Analysis. *Endocrinology* 136(11):5232-5235.

Denef C and P deMoor. 1969. *Endocrinology* 94:1577-1582.

De Noble V, Hepler D and Barto R. 1989. Cysteamine-Induced Depletion of Somatostatin Produces Differential Cognitive Deficits in Rats. *Brain Research* 482: 42-48.

Demchyshyn LL, Srikant CB, Sunahara RK, Kent G, Seeman P, Van Tol HHM, Panetta R, Patel YC and Niznik HB. 1993. Cloning and Expression of Human Somatostatin-14 Selective Receptor Variant (Somatostatin Receptor 4) located on Chromosome 20. *Mol Pharmacol* 43:894-901.

Dubois MP. 1975. Immunoreactive Somatostatin is Present in Discrete cells of the Endocrine Pancreas. *Proc Natl Acad Scie USA* 72:1340-1343.

Eden S. 1979. Age and Sex Differences in Episodic Growth Hormone secretion in the Rat. *Endocrinology* 105:555.

Elrod, Karey and Jerry Buccafusco 1988. An Evaluation of the Mechanism of Scopolamine-Induced Impairment in Two Passive Avoidance Protocols. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 29: 15-21.

Endo H, Yamaguchi M, Farnsworth R, G Thordarson L, Ogren L, Alonso FJ, Sakata M, Hirota K and F. Talamantes. 1994. *Biology of Reproduction* 51: 1206-1212.

Epelbaum J, Willoughby JO, Brazeau p and martin JB. 1977. Effects of Brain Lesions and Hypothalamic deaffermentation on Somatostatin Distribution in the Rat. *Endocrinology* 101:1495.

Ferland L, Labrie P, Jobin M, Arimura A and Schally AV. 1976. Physiological Role of Somatostatin in the Control of Growth Hormone and Thyrotropin Secretion. *Biochem Biophys Res Commun* 68:149.

Ferrara Cincia, Daniela Cocchi and Eugenio E Müller. 1991. Somatostatin in the Hippocampus Mediates Dexamethasone-Induced Suppression of Corticosterone Secretion in the Rat. *Neuroendocrinology* 53: 428-431.

Fife Susan K, Rebecca S Brogan, Andrea Giustina and William B Wehrenberg. 1996. Immunocytochemical and Molecular Analysis of the Effects of Glucocorticoid Treatment on the Hypothalamic-Somatotropic Axes in the Rat. *Neuroendocrinology* 64: 131-138.

Finkelstein JW, Roffwarg HP, Boyar RM, Kream J and Hellman L. 1972. Age Related in the Twenty-four Hour Spontaneous Secretion of Growth Hormone. *J Clin Endocrinol Metab* 35:665.

Gerlai Robert and Nicola Clayton. 1999. Analysing Hippocampal Function in Transgenic Mice: an Ethological Perspective. *TINS* 22 (2): 47-51.

Gerlai. Robert 1996. Gene-Targeting Studies of Mammalian Behavior: is it the Mutation or the Background Genotype? *TINS* 19 (5): 177-189.

Goelet Philip, Vincent F Castellucci, Samuel Schacher and Eric Kandel. 1986. The Long and the Short of Long-Term-Memory a Molecular Framework. *Nature* 322: 419-422.

Giustina A and Wehrenberg WE. 1992. The Role of Glucocorticoids in the Regulation of Growth Hormone Secretion: Mechanisms and Clinical Significance. *Trends Endocrinol Metab* 3:306-311.

Goodman RH , Aaron DC and Roos BA. 1983. Rat Preprosomatostatin: Structure and Processing by Microsomal Membranes. *J Biol Chem* 258: 5770-5773.

Green PK, Wilkinson CW and Woods SC. 1992. Intraventricular Corticosterone Increases the Rate of Body Weight Gain and Underweight Adrenalectomized Rats. *Endocrinology* 1992:130(1):269-275.

Grossman CJ, Roselle GA and Mendehall CL. Sex Steroid regulation of Autoimmunity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 40:649-659.

Guillemin Roger. 1992. Somatostatin: The Early Days. . *Metabolism* 41 (9) Suppl 2: 2-4.

Gustafsson Jan-Åke, Magnus Ingelman-Sundberg, Åke Stenberg and Tomas Hökfelt. 1976. Feminizing of Hepatic Steroid Metabolism in Male Rats Following Electrothermic Lesion of the Hypothalamus. *Endocrinology* 98 (4): 922-926.

Gustafsson Jan-Åke, A mode, G Nordstedt and P Skett. 1983. Sex Steroid Induced Changes in Hepatic Enzymes. *Ann Rev Physiol* 45: 51-60.

Handa Robert, Ioyd H Burgess, Janice E Kerr and Joan O'Keefe. 1994. Gonadal Steroid Hormone Receptors and Sex differences in the Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis. *Hormones and Behavior* 28: 464-476.

Harada Nobuhiro and Masahiko Negishi. 1984. Mouse Liver Testosterone 15 α -Hydroxylase (Cytochrome P450 15 α). *J Biological Chemistry* 259 (2): 1265-1271.

Harada Nobuhiro and Masahiko Negishi. 1984. Mouse Liver Testosterone 16 α -Hydroxylase (Cytochrome P450 16 α). *J Biological Chemistry* 259 (19): 12285-12290.

Harada Nobuhiro and Masahiko Negishi. 1988. Substrate specificities of Cytochrome P450, CP45016 α and P45015 α and Contribution to Steroid Hydroxylase Activities in Mouse Liver Microsomes. *Biochemical Pharmacology* 37 (24): 4778-4780.

Haroutunian V, R mantin, G A Campbell, GK Tsuboyama and KL Davis. 1987. Cysteamine-Induced Depletion of Central Somatostatin-Like Immunoactivity ; Effects on Behavior, Learning, Memory and Brain Neurochemistry. *Brain Research* 403: 234-242.

Heidet V, A Faivre-Bauman, C kordon, C Loudes, S Rasolonjanahary and J Epelbaum. 1990. Functional Maturation of Somatostatin neurons and Somatostatin Receptors during Development of Mouse Hypothalamus in vivo and in vitro. *Dev Brain Research* 57: 85-92.

Heise George. 1984. Behavioral Methods for Measuring Effects of Drugs on Learning and Memory in Animals. *Medicinal Research Reviews* 4 (4): 535-558.

Herbert DC and Scheridan PJ. 1983. Uptake and Retention of of Sex Steroids by the Baboon Pituitary Gland-Evidence of Sexual Dimorphism with Respect to Dihydrotestosterone. *Biol Reprod* 28:377.

Herbison AE and Theodosis D. 1993. Absence of Estrogen Receptor Immunoreactivity in Somatostatin (SRIF) Neurons in the Periventricular Nucleus but Sexually Dimorphic Colocalization of Estrogen Receptor and SRIF Immunoreactivities in Neurons in the Bed Nucleus of the Stria Terminalis. *Endocrinology* 132(4):1707-1714.

Herbison AE. Sexually Dimorphic Expression of Androgen Receptor Immunoreactivity by Somatostatin Neurons in Rat Hypothalamic Periventricular Nucleus and Bed Nucleus of the Stria Terminalis.

Hobart P, Crawford R, Shen LP, Pictet R and Rutter WJ. 1980. Cloning and Sequence Analysis of cDNAs Encoding Two Distinct Somatostatin Precursors found in the Endocrine Pancreas of Anglerfish. *Nature* 288: 137-141.

Höckfelt T, Efendic S, Hellerstrom C et al. 1975. Cellular Localization of Somatostatin in Endocrine-Like Cells and Neurons of the Rat with Special References to the A-1 Cells of the Pancreatic Islets and to the Hypothalamus. *Acta Endocrinol* 80: 5-41.

Höckfelt T, Johansson O, Ljungdahl A, Lundberg JM and Schultzberg M. 1980. Peptidergic Neurons. *Nature* 284:515-521.

Horvath S, Palkovits M, Gores T and Arimura A. 1989. Electron Microscopy Immunocytochemical Evidence for the Existence of Bidirectional Synaptic Connections between Growth Hormone-Releasing hormone and Somatostatin Containing Neurons in the Hypothalamus of the Rat. *Brain Research* 481(1): 8-15.

Hsiao Karen, Paul Chapman, Steven Nilsen, Chris Eckman, Yasuo Harigaya, Steven Younkin, Fushen Yang and Greg Cole. 1996. Correlative Memory Deficits, A β Elevation and Amyloid Plaques in Transgenic Mice. *Science* 274: 99-102.

Huang Yan-You, Xiao-Ching Li and Eric R Kandel. 1994. cAMP Contributes to Mossy Fiber LTP by Initiating Both a Covalently Mediated Early Phase and Macromolecular Synthesis-Dependent Late Phase. *Cell* 79: 69-79.

Hunyady B, Hipkin RW, Schonbrunn A and Mezey E. 1997. Immunohistochemical Localization of Somatostatin Receptor sst-2A in the Rat pancreas. *Endocrinology* 138:2632-2635.

Hurley DJ and Phelps CJ. 1992. Hypothalamic Preprosomatostatin Messenger Ribonucleic Acid Expression in Mice Transgenic for Excess or Deficient Endogenous Growth Hormone. *Endocrinology* 130 (4): 1819-1815.

Husman Bolette, Gunnar Norstedt, Agneta Mode and Jan-Åke Gustafsson. 1985. The Mode of Growth Hormone Administration is of Major Importance for the Excretion of the Major Male Rat Urinary Proteins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 40: 205-210.

Ikonen Sami, Bernard H Schmidt and Paavo Riekkinen Jr. 1999. Characterization of Learning and Behaviors and the Effects of Metrifonate in the C57BL Strain of Mice. *European J Pharmacology* 372: 117-126.

Impey Soren, Dave M Smith, Karl Obrietan, Rachel Donahue, Christian Wade and Daniel R Storm. 1998. Stimulation of cAMP Response Element (CRE)- Mediates Transcription during Contextual Learning. *Nature Neuroscience* 1 (7): 595-601.

Jansson John Olov, Staffan Eden and Olle Isaksson. 1985. Sexual Dimorphism in the Control of Growth Hormone Secretion. *Endocrine Reviews* 6 (2): 128-150.

Jackerot M, Oster A and Larsson LI. 1994. PYY in Developing Murine Islet Cells: Comparisons to Development of Islet Hormones NPY, and BrdU Incorporation. *J Histochem Cytochem* 44(8): 809-817.

Kawai K, Ipp E, Orci L, Perrelet A and Unger RH. 1982. Circulating Somatostatin Acts on the islets of Langerhans by Way of Somatostatin-poor compartment. *Science* 218:477-478.

Kimura N, Tomizawa S, Nakata Arai K and Kimura N. 1998. Chronic Treatment with Estrogen Up Regulates Expression of SST2 Messenger Ribonucleic Acid (mRNA) but Down-Regulates Expression of SST5 mRNA in Rat Pituitaries. *Endocrinology* 139(4):1573-1579.

Koerker DJ, Ruch W, Chicadee E, et al. 1974. Somatostatin: Hypothalamic Inhibitor of the Endocrine Pancreas. *Science* 184:482-484.

Kong H, De Paoli AM, Breder CD, Yasuda K, Bell GI and Reisine T. 1994. Differential Expression of Somatostatin Receptor Subtypes SSTR1, SSTR2 and SSTR3 in Adult Rat Brain, Pituitary and Adrenal Gland. Analysis by Rna Blotting and *in situ* Hybridization *Neuroscience* 59:175-184.

Koob George F. *Neuropeptides and Memory*.

Krieger DT. 1973. Effect of Ocular Enucleation and Altered Lighting Regimens at Various Ages on the Circadian Periodicity of Corticosterone Corticosteroid Levels in the Rat. *Endocrinology* 1993:1077-1091.

Krulich L and Mc Cann SM. 1969. Effect of GH- Releasing Factor and GH Inhibiting Factor on the Release and Concentration of GH in Pituitaries Incubated in vitro. *Endocrinology* 85: 319-324.

LaBar Kevis S, Christopher Gatenby, John C Gore, Joseph E LeDoux and Elizabeth A Phelps. 1998. Human Amygdala Activation during Conditioned Fear Acquisition and Extinction: a Mixed-Trial fMRI Study. *Neuron* 20: 937-945.

Lam Karen S L and Gopesh Srivastava. 1997. Gene Expression of Hypothalamic Somatostatin and Growth Hormone-Releasing Hormone in Dexamethasone treated Rats. *Neuroendocrinology* 66: 2-8.

Lamartiniere CA. 1985. Modulation (Feminizing) of Hepatic Enzymes by an Ectopic Pituitary Tumor. *Endocrinology* 117 (2): 523-526.

Lamberts SW, Zuyderwijk J, den Holder F, van Koetsveld P and Hofland L. 1989. Studies on the Conditions Determining the Inhibitory Effect of Somatostatin on Adrenocorticotropin, Prolactin and Thyrotropin release by Cultured Rat Pituitary Cells. *Neuroendocrinology* 50:44-50.

Leal Sandra, J Paulo Andrade, Manuel M Paula-Barbosa and M Dulce Madeira. 1998. Arcuate Nucleus in the Hypothalamus: Effect of Age and Sex. *The Journal of Comparative neurology* 401:65-88.

Legraverend Catherine, Agneta Mode, Stefan Westin, Anders Ström, Hidetaka Eguchi, Peter G Zaphiropoulos and Jan-Åke Gustaffson. 1992. Transcriptional Regulation of Rat P-450 2C gene Subfamily Members by Sexually Dimorphic Pattern of Growth Hormone Secretion. *Molecular Endocrinology* 6 (2): 259-266.

Legraverend Catherine, Agneta Mode, Timothy Wells, Iain Robinson and Jan-Åke Gustaffson. 1992. Hepatic Steroid Hydroxylating Enzymes are Controlled by the Sexually Dimorphic Pattern of Growth Hormone Secretion in Normal and Dwarf Rats. *FASEB J* 6: 711-718.

Li X-J, Forte M, North RA, Ross CA and Snyder SH. 1992. Cloning and Expression of a Rat Somatostatin Receptor Enriched in Brain. *J Biol Chem* 267:21307-21312.

Ling N, Burgus R, Rivier J et al. 1973. The use of Mass Spectrometry in Deducing the Sequence of Somatostatin-A Hypothalamic Polypeptide that Inhibits the Secretion of Growth Hormone. *Biochem Biophys Res Commun* 50:127-133.

Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ and Efstratiadis A. 1993. *Cell* 75:59-72.

Low M, Goodman RH and Ebert KM. 1989. Cryptic Growth Hormone Sequences Direct Gonadotroph-Specific Expression in Transgenic Mice. *Molecular Endocrinology* 3(12):2028-2033.

Mandarino L, Stenner D, Blanchard W, Nissen S, Gerich J, Ling N, Brazeau P, Bohlen P, Esch F and Gillemain R. 1981. Selective effects of Somatostatin-14, Somatostatin-25 and Somatostatin-28 on in vitro Insulin and Glucagon Secretion. *Nature* 291:76-77.

Martin JL, Chesselet MF, Raynor K, Gonzales C and Reisine T. 1991. Differential Distribution of Somatostatin Receptor Subtypes in Rat Brain Revealed by Newly Developed Somatostatin Analogs. *Neuroscience* 41:581-593.

Martin JB, Renauld LP and Bazeau P. 1974. Pulsatile Growth Hormone Secretion: Suppression by Hypothalamic Ventromedial Lesions and by Long-Acting Somatostatin. *Science* 186:538.

Mason AJ, Pitts SL, Nikolics K, Szonyi E, Wilcox JN, Seeburg PH and TA Stewart. 1986. The Hypogonadal Mouse: Reproductive Functions Restored by Gene Therapy. *Science* 234:1372-1378.

Matsuoka N, M Yamazaki and I Yamaguchi. 1995. Changes in Brain Somatostatin in Memory-Deficient Rats: Comparison with Cholinergic Markers. *Neuroscience* 66 (3): 617-626.

Matsuoka Nobuya, Noriaki Maeda, Mayaco Yamazaki, Yoshitaka Ohkubo and Isamu Yamaguchi. 1992. Effect of FR 121196, a Novel Cognitive Enhancer, on the Memory Impairment of Rats in Passive Avoidance and Radial Arm Maze Tasks. *J Pharmacological and Experimental Therapeutics* 263 (2):436-444.

Matsuoka, N Shuji Kaneko and Masamichi Satoh. 1991. Somatostatin Augments Long-Term Potentiation of the Mossy Fiber-CA3 System in Guinea Pig Hippocampal Slices. *Brain Research* 553: 188-194.

Matsuoka, N, Noriaki Maeda, Isamu Yamaguchi and Masamichi Satoh. 1994. Possible Involvement of Brain Somatostatin in the Memory Formation of Rats and the Cognitive-Enhancing Action of FR 121196 in Passive Avoidance Task. *Brain Research* 642: 11-19.

McCarthy GF, Beaudet A and Tannenbaum GS. 1992. Colocalization of Somatostatin Receptors and Growth Hormone -Releasing Factor Immunoreactivity in Neurons of the Rat Arcuate Nucleus. *Neuroendocrinology* 56: 18-24.

Mc Cormick Cheryl M, Brinley F Furey, Meredith Child, Meghan J Sawyer and Sean M Donohue. 1998. Neonatal Sex Hormones Have “Organizational” Effects on the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis of Male Rats. *Developmental Brain Research* 105:295-307.

McDonald RJ and White NM. 1993. A Triple Dissociation of Memory Systems: Hippocampus, Amygdala and Dorsal Striatum. *Behavioral Neuroscience* 107: 3-22.

McLeod James N and Bernard H Shapiro. 1989. Growth Hormone Regulation of the Hepatic Metabolizing Enzymes in the Mouse. *Biochem Pharmacol* 38 (10): 1673-1677.

McLeod JN, NA Pampori and BH Schapiro. 1991. Sex Differences in the Ultradian Pattern of Plasma Growth Hormone Concentrations in Mice. *J Endocrinology* 131: 395-399.

McNamara Robert and RonaldW Skelton. 1994. The Neuropharmacological and Neurochemical Basis of Place Learning in the Morris Water Maze. *Brain Research Reviews* 18: 33-49.

Meterhof W , Wulfsen I, Schornock C, Feher S and Richter D. 1992. Molecular Cloning of Somatostatin-28 Receptor and Comparison of its Expression pattern with that of a Somatostatin-14 Receptor in Rat Brain. *Proc Natl Acad Scie USA* 89:10267-10271.

Mczey Eva, Bela Hunyady, Sudha Mitra, Ed Hayes, Qisheng Liu, James Schaeffer and Agnes Schonbrunn. 1998. Cell Specific Expression of the SST2A and SST5 Somatostatin Receptors in the Rat Anterior Pituitary. *Endocrinology* 139 (1): 414-419.

Michalek SM, Moore RN, McGhee JR, Rosentreich DL and Merghenhagen SE. 1980. The Primary Role of Lymphoreticular Cells in the Mediation of Host Responses to Bacterial Endotoxin. *J Infect Dis* 141:55-63.

Miettinen R J Sirviö, P Riekkinen, MP Laakso, M Riekkinen and P Riekkinen Jr. 1993. Neocortical, Hippocampal and Septal Parvalbumin- and Somatostatin-Containing Neurons in Young and Aged Rats: Correlation with Passive Avoidance and Water Maze Performance. *Neuroscience* 53 (2): 367-378.

Miller Earl K. 1999. The Prefrontal Cortex: Complex Neural Properties of Complex Behavior. *Neuron* 22: 15-17.

Mitsuhide Noshiro and Masahiko Negishi. 1986. Pretranslational Regulation of Sex-Dependent Testosterone Hydroxylases by Growth Hormone in Mouse Liver. *J Biol Chem* 261 (34): 15923-15927.

Montminy MR, Goodman RH, Horovitch SJ y JF Habener. 1984. Primary Structure of the Gene Encoding Rat Pre-Prosomatostatin. *Proc Natl Acad Scie USA* 81:3337-3340.

Montminy M R, Sevarino KA, Wagner JA, Mandel G and Goodman RH. 1986. Identification of a Cyclic-AMP Responsive Element within the Rat Somatostatin gene. *Proc Natl Acad Scie USA* 83:6682-6686.

Montminy MR and Bilezikjian LM. 1987. Binding of a Nuclear protein to the Cyclic-AMP Response Element of the Somatostatin Gene. *Nature* 328:175-178.

Montminy M, P Brindle, J Arias, K Ferreri and R Armstrong. 1996. Regulation of Somatostatin Gene Transcription by Cyclic Adenosine Monophosphate. *Metabolism* 45 (8): 4-7.

Murray HE, Simonian SX, Herbison, AE and Gillies GE. 1999. Ontogeny and Sexual Differentiation of Somatostatin Biosynthesis and Secretion in the Hypothalamic Periventricular-Median Eminence Pathway. *J Neuroendocrinology* 11(1): 35-42.

Murray HE, Simonian SX, Herbison AE and Gillies GE. 1999. Correlation of Hypothalamic Content with Secretion: Sexual Dimorphism and Differential regulation by Gonadal Effects. *J Neuroendocrinology* 11(1): 27-33.

Nagy Z Michael, Karen Thaller and Timothy A. Mazzaferri. 1977. Acquisition and Retention of a Passive Avoidance Task as a Function of Aging in Mice. *Developmental Psychobiology* 10 (6): 563-573.

Norsted G, B Husman, A Mode, P Eneroth, UJ Lewis and J-Å Gustaffson. 1987. Induction of Prolactin Receptors in the Liver is More Closely Related to the Growth-Promoting than to the Lactogenic Potency of the Peptides. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 114:350-356.

Norstedt Gunnar and Richard Palmiter 1984. Secretory Rhythm of Growth Hormone Regulates Sexual Differentiation of Mouse Liver. *Cell* 36:805-812.

Norstedt Gunnar, Agneta Mode, Tomas Hökfelt, Peter Eneroth, Robert Elde, Louise Ferland, Fernand Labrie and Jan-Åke Gustafsson. 1983. Possible Role of Somatostatin in the Regulation of the Sexually Differentiated Steroid Metabolism and Prolactin Receptor in Rat Liver. *Endocrinology* 112 (3): 1076-1089.

Nurhidayat, Yasuhiro Tsukamoto, Koeswinaring Sigit and Fumihiko Sasaki. 1999. Sex Differentiation of Growth-Hormone releasing Hormone and Somatostatin Neurons in Mouse Hypothalamus: an Immunohistochemical and Morphological Study. *Brain Research* 821:309-321.

O'Carroll A-M, Lolait SJ, Koning M and Mahan LC. 1992. Molecular Cloning and Expression of a Pituitary Somatostatin Receptor with Preferential Affinity for Somatostatin-28. *Mol Pharmacol* 42: 939-946.

Ohno Masuo, Misuzu Kikusui, Ayaco Yosimatsu, Tsuneyuki Yamamoto and Shigenori Watanabe. 1994. Somatostatin Alleviates Impairment of Working Memory Induced by Hippocampal Muscarinic M1 Receptor Blockade in Rats. *European J Pharmacology* 271: 557-560.

Ohno, Masuo, Shigenobu Shibata, Tsuneyuki Yamamoto and Shigenori Watanabe. 1993. Working Memory Deficits Following Muscarinic Blockade Combined with Depletion of Brain Somatostatin in Rats. *Brain Research* 610: 348-353.

Painson J-C and Tannenbaum G. 1991. Sexual Dimorphism and Growth Hormone Releasing factor Signaling in the Control of Pulsatile Growth Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology*: 128(6): 2858-2866.

Painson J-C, Thorner M, Krieg R and Tannenbaum G. 1992. Short-Term Adult Exposure to Estradiol feminizes the Male Pattern of Spontaneous and Growth Hormone-Releasing Factor-Stimulated Growth Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology* 130(1): 511-519.

Panetta R, Greenwood MT, Warszynska A, Demchyshyn LL, Day R, Niznik HB, Srikant CB and Patel YC. 1994. Molecular Cloning, Functional Characterization, and Chromosomal Localization of a Human Somatostatin Receptor (Somatostatin Receptor Type 5) with Preferential Affinity for Somatostatin-28. *Mol Pharmacol* 45:417-427.

Park Soo-Hee, Xiuwen Liu, Lothar Hennighausen, Helen W Davey and David Waxman. 1999. Distinctive Roles of STAT5a and STAT5b in Sexual Dimorphism of Hepatic P450 gene Expression. *J Biol Chem.* 274 (11): 7421-7430.

Pasleau F, C Kolodcizi-Mehaignoul and JE Gielen. 1984. Genetic regulation of hepatic Steroid 16 α -hydroxylase activities in Inbred Strains in Mice. *Endocrinology* 115 (4): 1371-1379.

Patel YC, MT Greenwood, R Panetta, L Demchyshyn, H Niznik and CB Srikant. 1995. Minireview The Somatostatin Receptor Family. *Life Sciences* 57 (13) 1249-1265.

Patel YC, and William O'Neil. 1988. Peptides Derived from Cleavage of Prosomatostatin at Carboxil- and Amino-Terminal Segments. *J Biol Chem* 263(2): 745-751.

Patel YC and Srikant CB. 1986. Somatostatin Mediation of Adenohypophysial Secretion. *Ann Rev Physiol* 48:551-567.

Perez J, Rigo M, Kaupmann C, Bruns C, Yasuda K, Bell GI, Lubbert H and Hoyer D. 1994. Localization of Somatostatin (SRIF) SSTR1, SSTR2 and SSTR3 Receptor mRNA in Rat Brain by *in situ* Hybridization. *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol* 349:145-160.

Phelps Carol J, Hakki Dalcik, Hisako Endo, Frank Talamantes and David L. Hurley. 1993. Growth Hormone-Releasing Hormone Peptide and mRNA are Overexpressed in GH-Deficient Ames Dwarf Mice. *Endocrinology* 133 (6): 3034-3037.

Phillips G Russel and Joseph LeDoux. 1995. Lesions of the Fornix but not the Entorhinal or Perirhinal Cortex Interfere with Contextual Fear Conditioning. *J Neuroscience* 15 (7): 5308-5315.

Posner BI, Kelly PA and Friesen HG. 1975. Prolactin Receptors in Rat Liver: possible Induction by Prolactin. *Science* 188: 57.

Radke James M and Steven R Vincent. 1988. Effects of Systemic and Intracerebroventricular Cysteamine on Dexamethasone-Induced Suppression of Corticosterone Levels in the Rat. *Neuroendocrinology* 48: 258-263.

Ram Prabha A and David J Waxman. 1991. Hepatic P450 Expression in Hypothyroid Rats: Differential Responsiveness of Male-Specific P450 Forms 2a (IIIA2), 2c (IIC11) and RLM2 (IIA2) to Thyroid Hormone. *Molecular Endocrinology* 5 (1):13-20.

Reed DK, Korytko AI, Hipkin RW, Wehremberg WB, Schobrunn A and Cuttler R. 1999. Pituitary Somatostatin-Receptor (SST)1-5 Expression during the Rat Development: Age dependent Expression of SST-2. *Endocrinology* 140(10):4739-4744.

Reichlin S. 1961. Growth Hormone Content of Pituitaries from Rats with Hypothalamic Lesions. *Endocrinology*: 69:225.

Reichlin S. 1983. Somatostatin. *N Engl J Med* 309:1495-1563.

Reichlin Seymour. 1986. Somatostatin. Plenum Publishing Corporation 30: 405-425.

Reisine Terry and Graeme I Bell. 1995. Molecular Biology of Somatostatin Receptors. *Endocrine Reviews* 16 (4): 427-443.

Reisine T and Bell GI. 1993. Molecular Biology of the Opioid Receptors. *Trends in Neurosci* 16:506-510.

Reubi JC. 1984. Evidence for Two Somatostatin Receptors Differentiated by Cyclic Somatostatin Analogs. *Science* 228:492-495.

Richardson UI and Sconbrunn A. 1981. Inhibition of Adrenocorticotropin Secretion by Somatostatin in Pituitary Cells in Culture. *Endocrinology* 108:281-290.

Rivier C, Chizzonite R and Vale W. 1989. In the Mouse the Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis by Lipopolysaccharide (Endotoxin) is mediated through Interleukin-1. *Endocrinology* 125:2800-2805.

Rivier C, Rivier J and Vale W. 1989. Stress-Induced Inhibition of reproductive Functions: Role of Endogenous Corticotropin-releasing Factor. *Science* 231:607-609.

Rhodes ME and Rubin T. 1999. Functional Sex Differences (Sexual Diergism) of Centrl Nervous System Cholinergic Systems, Vasopresin, and Hypothalamic-Pituitary-Adrenal Axis Activity in Mammals: a Selective Review. *Brain Res Brain Res Rev* 30 (2):135-152.

Rogan Michael T, Ursula V Stäubli and Joseph LeDoux. 1997. Fear Conditioning Induces Associative Long-Term Potentiation in Amygdala. *Nature* 390: 604-607.

Rohrer L, Raulf F, Bruns C, Buettner R, Hofstaedter F and Schule R. 1993. Cloning and Characterization of a Fourth Human Somatostatin Receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:4196-4200.

Rohrer Susan P et al. 1998. Rapid Identification of Subtype-Selective Agonists of the Somatostatin Receptor Through Combinatorial Chemistry. *Science* 282: 737-740.

Romero Mario I and Carol Phelps. 1997. Identification of Growth Hormone-Releasing Hormone and Somatostatin neurons projecting to the Median Eminence in Normal and Growth Hormone-Deficient Ames Dwarf Mice. *Neuroendocrinology* 65: 107-116.

Rorstad OP, Brownstein MJ and Martin JB. 1979. Immunoreactive and Biologically Active Somatostatine-Like Material in Rat Retina. *Proc Natl Acad Sci* 76:3019-3023.

Roussoudan Bourtchuladze, Bruno Frenguelli, Julie Blendy, Diana Cioff, Gunter Schulz and Alcino Silva. 1994. Deficient Long-Term Memory Mice with a Targeted Mutation of the CAMP-Responsive Element-Binding Protein. *Cell* 79: 59-68.

Rubinstein Marcelo, Ben Liu, Richard Goodman and Malcolm J Low. 1992. Targeted expression of Somatostatin in Vasopressinic Magnocellular Hypothalamic neurons of Transgenic Mice. *Molecular and Cellular Neurosciences* 3:152-161.

Sassolas G and S Melmed. 1992. Symposium: Basic Somatostatin Research. *Metabolism* 41 (9) Suppl 2:11-16.

Saucler Deborah and Donald P Cain. Spatial Learning without NMDA receptor-Dependent Long-Term Potentiation. *Nature* 378: 186-188.

Saunders A, Terry LC, Audet J, Brazeau P and Martin JB. 1979. Dynamic Studies of Growth Hormone and Prolactin Secetion in the Female Rat. *Neuroendocrinology* 21:193.

Schettini Gennaro, Tullio Florio, Gianludovico Magri, Maurizio Grimaldi, Olimpia Meucci, Elisa Landolfi and Adraino Marino. 1988. Somatostatin and SMS 201-995 Reverse the Impairment of Cognitive Functions Induced by Cysteamine Depletion of Brain Somatostatin. *European J Pharmacology* 151: 399-407.

Schonnbrun A and Tashjian AH. 1978. Characterization of Functional Receptors for Somatostatin in Rat Pituitary Cells in Culture. *J Biol Chem* 253: 6473-6483.

Shahan K, M Denaro, M Gilmartin, Y Shi and E Derman. 1987. Expression of Six Major Urinary Proteins Genes in the Mammary, Parotid, Sublingual, Submaxillary and Lachrymal Glands and in the Liver. *Molecular and Cellular Biology* 7 (5): 1947-1954.

Shahan K, M Gilmartin and E Derman. 1987. Nucleotide Sequences of Liver, Lachrymal and Submaxillary Gland Mouse Major Urinary Protein mRNAs : Mosaic Structure and Construction of Panels of Gene-Specific Synthetic Oligonucleotide Probes. *Molecular and Cellular Biology* 7 (5): 1938-1946.

Silva AJ, Alan M Smith and Karl Peter Giese. 1997. Gene Targeting and the Biology of Learning and Memory. *Ann Rev Genet* 31: 526-546.

Sirinathsinghi DJH, Rees LH, Rivier J and Vale W. 1983. Corticotropin-Releasing factor is a Potent Inhibitor of Sexual Receptivity in the Females Rat. *Nature* 305:232-235.

Spinedi Eduardo, Maria O Suescun, Rafi Hadid, Tatiana Daneva and Rolf Gaillard. 1992. Effects of Gonadectomy and Sex Hormone Therapy on the Endotoxin-Stimulated Hypothalamo-Pituitary-Adrenal Axis: Evidence for a Neuroendocrine-Immunological Sexual Dimorphism. *Endocrinology* 131 (5): 2430-2436.

Sreedharan S, Kodama K, Peterson K and Goetzl E. 1989. Distinct subsets of Somatostatin Receptor on Cultured Human Lymphocytes. *J Biol Chem* 264:949-952.

Srikant C and Patel YC. 1981. Somatostatin Receptors: Identification and Characterization in Rat Brain Membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:3930-3934.

Srikant C and Patel YC. 1981. Receptor Binding of Somatostatin-28 is Tissue Specific. *Nature* 294:259-260

Stalla GK, Brockmeier SJ, Renner U, Newton C, Buchfelder M, Stalla J and Muller OA. 1994. Octeocride Exerts Different Effects *in vivo* and *in vitro* in Cushing's Disease. *Eur J Endocrinol* 130 (2):125-131.

Steele Philip M, Javier Medina, William N Nores and Michael D Mauk. 1998. Using Genetic Mutations to Study the Neural Basis of Behavior. *Cell* 95: 879-882.

Stenberg A . 1975. *Acta Endocrinol* 78:294-301.

Su Chung-Jey, James W White, Wen-Hsiung Li, Chi-Cheng Luo, Marsha L Fraizer, Grady F Saunders and Laurence Chan. 1988. Structure and Evolution of Somatostatin Genes. *Molecular Endocrinology* 2:209-216.

Sundseth Scott S and David J Waxman. 1990. Hepatic P450 Cholesterol 7 α -Hydroxylase. *J Biological Chemistry* 265 (25): 15090-15095.

Sundseth Scott S and David J Waxman. 1992. Sex- Dependent Expression and Clofibrate Inducibility of Cytochrome P450 4A Fatty Acid ω -Hydroxylases. *J Biological Chemistry* 267 (6): 3915-3921.

Sundseth Scott S, John A Alberta and David J Waxman. 1992. Sex-Specific, Growth Hormone-Regulated Transcription of the Cytochrome P450 2C11 and 2C12 Genes. *J Biological Chemistry* 267 (6): 3907-3914.

Swanson Larry W and Gorica D Petrovich. 1998. What is the Amygdala?. *TINS* 21 (8):323-331.

Takatsuki K, Shiosaka S, Sakanaka M et al. 1981. Somatostatin in the Auditory System of the Rat. *Brain Res* 213:211-216.

Tang Ya-Ping, Eiji Shimizu, Gilles R Dube, Claire Rampon, Geoffrey a Kerchner, Min Zhuo, Guosong Liu and Joe Tsien. 1999. Genetic Enhancement of Learning and Memory in Mice. *Nature* 401: 63-69.

Tannenbaum GS and Martin JB. 1976. Evidence for an Endogenous Ultradian Rhythm Governing Growth Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology* 98:562.

Tannenbaum GS, Zhang W-H, Lapointe M, Zeitler P and Beaudet A. 1998. Growth Hormone-Releasing Hormone Neurons in the Arcuate Nucleus Express Both Sst1 and Sst2 Somatostatin Receptor Genes. *Endocrinology* 139 (3):1450-1453.

Terry LC and Martin JB. 1981. The Effects of Lateral Hypothalamic-Medial Forebrain Stimulation and Somatostatin Antiserum on Pulsatile Growth Hormone Secretion in Freely Behaving Rats: Evidence for a Dual Regulatory Mechanism. *Endocrinology* 109:622

Thorngren K-G and Hansson LI. 1977. Effects of the Frequency of Growth Administration on Longitudinal Bone Growth in the Hypophysectomized Rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* 84:497

Tran V, Beal MF and Martin JB. 1985. Two Types of Somatostatin Receptors Differentiated by Cyclic Somatostatin Analogs. *Science* 228:492-495.

Tran V, Uhl G and Martin J. 1984. Evidence for Two Somatostatin-14 Receptors in the Rat Brain. *Neurosci Lett* 49:259-263.

Tullio Florio, Carmelo Ventra, Alfreso Postiglione and Gennaro Schettini. 1991. Age-Related Alterations of Somatostatin Gene Expression in Different rat Brain Areas. *Brain Research* 557: 64-68.

Udy Garry B, Raewyn P Towers, Russell G Snell, Richard J Wilkins, Soo-Hee Park, Prhaba A Ram, David Waxman and Helen W Davey. 1997. Requirement of STAT5b for Sexual Dimorphism of Body Growth Rates and Liver Gene Expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 24:7239-7244.

Vale W, Brazeau P, Rivier C et al. 1975. Somatocrinin, the Growth Hormone Releasing Factor. *Recent Prog Horm Res* 31:365-397.

Vale W, C Rivier, P Brazeau and R Guillemin. 1975. Effects of Somatostatin on the Secretion of Thyrotropin and Prolactin. *Endocrinology* 95:968-977.

Vamvakopoulos Nicholas C and George P Chrousos. 1994. Hormone Regulation of Human Corticotropin-Releasing Hormone Gene Expression: Implications for the Stress Response and Immune/ Inflammatory Reaction. *Endocrine Reviews* 15 (4): 409-420.

Vanetti M, Kouba M, Wang X, Vogt G and Holtt V. 1992. Cloning and Expression of Novel mouse Somatostatin Receptor. *FEBS Lett* 311:290-294.

Viguerie N, Tahiri- Jouti N, Esteve J, Clerc P, Logsdon C, Svoboda M, Susini C, Vaysse N and Ribet A. 1988. Functional Somatostatin Receptors on Rat Pancreatic Acinar Cell line. *Am J Physiol* 255:G113-G120.

Vecsei L, E Wderlöv, R Ekman and C Alling. 1989. Cysteamine and Pantethine Effects on Passive Avoidance Behavior, Shuttle Box Learning, Open Field Activity, Striatal Catecholamines and Somatostatin. *Arch Int Pharmacology* 299: 14-27.

Wagner Anthony D. 1999. Working Memory Contributions to Human Learning and Remembering. *Neuron* 22: 19-22.

Walker David L and Michael Davis. 1997. Double Dissociation between the Involvement of Bed Nucleus of the Stria Terminalis and the Central Nucleus of the Amygdala in Startle Increases Produced by Conditioned versus Unconditioned Fear. *J Neuroscience* 17 (23): 9375-9383.

Wang H, Dichter M and Reisine T. 1990. Lack of Cross-Desensitization of Somatostatin-14 and Somatostatin-28 Receptors Coupled to Potassium Channels in Rat Neocortical Neurons. *Mol Pharmacol* 38:357-371.

Wang H, Reisine T and Dichter M. 1990. Somatostatin-14 and Somatostatin –28 Inhibit Calcium Currents in Rat Neocortical Neurons. *Neuroscience* 38:335-342.

Weheremberg WB, Bergman PJ, Stagg L, Ndon J and Giustina A. 1990. Glucocorticoid Inhibition of Growth in Rats: Partial Reversal with Somatostatin Antibodies. *Endocrinology* 127:2705-2708.

Weheremberg WB, Brazeau P, Lu ben R, Bohlen P and Guillemin R. 1982. Inhibition of the Pulsatile Growth Hormone by Monoclonal Antibodies to the Hypothalamic Growth Hormone Releasing Factor (GRF). *Endocrinology* 111: 2147.

Weheremberg WB, Bloch B and Phillips BJ. 1984. Antibodies to Growth Hormone-Releasing factor Inhibit Somatic Growth. *Endocrinology* 115:1218.

Weisz J and Ward IL. 1980. Plasma Testosterone and Progesterone Titers of Pregnant Rats, Their Male and Female Fetuses, and Neonatal Offspring. *Endocrinology* 106:306-316.

Wong Scott T et al. 1999. Calcium Stimulated Adenylyl Cyclase Activity is Critical for the Hippocampus-Dependent Long-Term Memory and Late Phase LTP. *Neuron* 23: 787-798.

Worsted C and Mode A. 1982. On the Primary Site of Action of Estrogens and Androgens in the Regulation of Hepatic Prolactin Receptor. *Endocrinology* 111: 645

Yakar Shoshana, Jun-Li Liu, Bethel Stannard, Andrew Butler, Domenici Accili, Brian Sauer and Derek leRoith. 1999. Normal Growth and development in the Absence of Hepatic Insulin-like Growth Factor I. *Proc. Natl. Acad. Sci* 96: 7324-7329.

Yamada T, Marshak D, Basinger S, Walsh J, Morley J and Stell W. 1980. Somatostatin –Like Immunoreactivity in the Retina. *Proc Natl Acad Sci Usa* 76:3029-3026.

Yamada Yuichiro, Steven R Post, Kenneth Wang, Howard S. Tager, Graeme I Bell and Susumu Seino. 1992. Cloning and Functional Characterization of a Family of Human and Mouse Somatostatin receptors Expressed in Brain, Gastrointestinal Tract and Kidney. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 251-255.

Yamada Y, Stoffel M, Espinosa R, Xiang K, Seino M, Seino S, LeBeau MM and Bell GI. 1993. Human Somatostatin Receptor Genes: Localization to Human Chromosomes 14, 17 and 22 and Identification of Simple Tandem Repeat Polymorphisms. *Genomics* 15:449-452.

Yasuda K, Espinosa R, Davis EM, Le Beau MM and Bell GI. 1993. Human Somatostatin Receptor Genes: Localization of SSTR5 to Human Chromosome 20p11.2. *Genomics* 17:785-786.

Yasuda K, Raynor K, Kong H, Breder CD, Takeda J, Reisine T and Bell GI. 1993. Cloning and Functional Comparison of kappa and delta Opioid receptors from the Mouse Brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:6736-6740.

Yasuda Kazuki, Stephanie Rens-Domiano, Christopher D Breder, Susan F Law, Clifford B Sapper, Terry Reisine and Graeme I Bell. 1992. Cloning of a Novel Somatostatin Receptor, SSTR3, Coupled to Adenylylcyclase. *J Biological Chemistry* 267 (28): 20422-20428.

Yates FE, Herbst AL, and Urquhart J. 1958. *Endocrinology* 63: 887-902.

Yen S, Siler T, De Vane G, et al. 1973. Biological Effects of Somatostatin in Normal and Acromegalic Subjects, in Raiti S (ed). *Advances in Human Growth Hormone Research*, Vol 1 Washington DC, US Government Printing Office, DHEW publication no. (NIH) 74-612:609-631.

Zhang K, Hamanaka K, Kitayama I, Soya H, Yoshizato H, Nakase S, Uesugi Y, Inui K, Nomura J and Okazaki Y. 1999. Decreased Expression mRNA for Somatostatin in the Periventricular Nucleus of Depression- Model Rats. *Life Sci* 65(9):87-94.

Zhang WH, A Beudet and GS Tannenbaum. 1999. Sexually Dimorphic Expression of SST1 and SST2 Somatostatin Receptor Subtypes in the Arcuate Nucleus and Anterior Pituitary of Adult Rats. *J Neuroendocrinology* 11:129-136.

Zheng Hui, Alex Bailey, Ming-Hao Jiang, Kazufumi Honda, Howard Y Chen, Myrna E Trumbauer, Lex HT Van der Ploeg, James M Schaeffer, Garthe Leng and Roy Smith. 1997. Somatostatin Receptor Subtype 2 Knockout Mice Are Refractory to Growth Hormone-Negative Feedback on Arcuate Neurons. *Molecular Endocrinology* 11 (11): 1709-1717.

Zhing HH, and Patel YC. 1982. Biosynthesis of Immunoreactive Somatostatin by Hypotalamic Neurons in Culture. *J Clin Invest* 70:1101-1109.

Zola-Morgan S and LR Squire. 1993. Neuroanatomy of the Memory. *Ann Rev Neurosci* 16: 547-563.