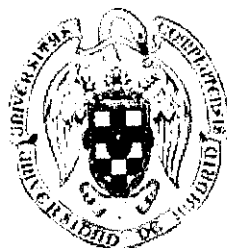


**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**

DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA



**FUNCIÓN REGULADORA DEL  
PÉPTIDO LIBERADOR DE GASTRINA  
(GRP) SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-  
HIPÓFISIS-ADRENAL**

DIRECTORES

Jorge Manzanares Robles  
José Angel Fuentes Cubero

MEMORIA

Que para optar al grado de  
DOCTOR EN FARMACIA  
presenta

**MARGARITA M<sup>a</sup> GARRIDO OCHOA**

Madrid, 2000

*A mis padres y a mi hermana*

La presente tesis doctoral ha sido realizada en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia y en la Unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar, ambos pertenecientes a la Universidad Complutense de Madrid, con la ayuda de una Beca de Formación de Personal Investigador de la Universidad Complutense de Madrid.

## AGRADECIMIENTOS

*Durante estos casi cinco años de aventuras y desventuras, son muchas las personas que me han ayudado y apoyado para realizar esta tesis y a las que quiero expresar mi agradecimiento en estas páginas.*

*En primer lugar, quiero dar las gracias a mis directores de tesis, Jose Ángel Fuentes y Jorge Manzanares. A Jose Ángel, por haberme aceptado en tu grupo de investigación hace cinco años, primero como alumna interna del Departamento de Farmacología, y después como "doctoranda", por tu buen carácter y por la oportunidad que me has dado de introducirme en este mundillo de la ciencia, gracias al cual he podido conocer mundo y relacionarme con tanta gente interesante. Y a tí Jorge, gracias, por haber sido un gran director y haberme iniciado en la investigación, por hacerme reír con tu buen humor, y por tus largas charlas fundamentalistas, aunque no haya logrado convencerte, pero quizás algún día...!*

*A mis compañeros de trabajo. Muy especialmente, a Mercedes, que ha compartido conmigo codo a codo el estrés del final de la tesis. Gracias por haberme ayudado tanto con mis últimos experimentos, por escuchar mis agobios y por ser tan buena "compi". A Maru, por echarme una "gran mano" en mis experimentos y compartir conmigo largas charlas y horas de laboratorio; a Nacho, gran amigo dentro y fuera del "lab" y responsable de que haya hecho la tesis en este grupo; a Javier, por las largas horas de RIAs e hibridaciones in situ compartidas; a Luis, por tus consejos de veterano; a Fernando, por tu ayuda en los cultivos celulares a través del correo electrónico. Y a Alicia, el último fichaje, por tu servicialidad y por animarme constantemente.*

*A todos mis compañeros del Departamento de Farmacología de la Facultad de Farmacia, donde realicé mis dos primeros años de tesis, y a Sole y Azucena, por vuestra ayuda en las "tareas burocráticas".*

*A mis compañeros de la Unidad de Cartografía Cerebral del Instituto Pluridisciplinar, donde he trabajado durante mis últimos años de tesis doctoral, y a todo el personal del Instituto, por haberme hecho estos dos últimos años tan agradables.*

*A todos mis amigos, por haber mostrado tanto interés por mis "aventuras" con las ratas: A Charo, por tu gran amistad y tu inmensa paciencia; a mis chicas, Elena "chicken", Beatriz "Elvis", Mónica "Monoco" e Iciar "cacatúa", ¡qué hubiera hecho sin vosotras durante estos años, sin nuestros viajes, y sin nuestras juergas con el "club"! A Marta, por las horas que hemos compartido en la facultad, entre experimento y experimento, tú con tus geles y óxido nítrico y yo con mi GRP y mis ratas, y por la gran amistad que nos une desde hace tanto tiempo. A mis amigas del cole, que me aguantáis desde hace ¡¡¡muchos, muchos años!!! Carmen Segovia y Carmen López, Ana, Susana y Virginia. Y a Juan Antonio, Chuspy y Álvaro, por vuestro constante interés. Mil gracias a todos, ¡de verdad!.*

*A todos los amigos que hice en aquel maravilloso curso de la Isla de Elba y a sus organizadores. De forma muy especial, a todos con los que he mantenido la amistad gracias al correo electrónico: A Chris y Therese, por vuestra gran amistad y por haberme animado tanto con mis experimentos; también a Ingrid, que hemos compartido nuestra recta final de tesis a través de la red.*

*A Emilio Ambrosio y su grupo de investigación, por vuestra colaboración en los primeros experimentos de mi tesis. Y muy especialmente a José M<sup>o</sup> Oliva, por tu gran ayuda en las últimas hibridaciones in situ de este trabajo.*

*A la Universidad Complutense de Madrid, por haberme concedido una beca predoctoral, gracias a la cual he podido realizar esta tesis, y por haberme dado la oportunidad de realizar una fantástica estancia en el extranjero durante tres meses, en la Universidad de California, en San Francisco (EE.UU.), con la Dra. Mary Dallman.*

*Y dejo para el final a las personas a las que más tengo que agradecer, a toda mi familia, por haberme animado tanto para que fuera la segunda doctora en la familia. A mi prima Raquel, la primera doctora de la familia, por haber compartido, al mismo tiempo, nuestras tesis, tú en Málaga y yo en Madrid. A todos mis tíos y primos, a mi hermana Marta y de forma muy especial a mis padres, a quienes dedico esta tesis. ¡Qué paciencia habéis tenido durante estos años escuchando mis agobios! Siempre me habéis animado a continuar y terminar, aún en los peores momentos, y sabiendo que la tesis sería larga. Sin vuestro amor y cariño, y sin vuestros ánimos, sin duda, esta tesis no habría llegado a su fin.*

**A TODOS, ¡¡¡¡GRACIAS!!!!!!**

# Índice

---

<b>RESUMEN</b> .....	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>5</b>
<b>I. EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL</b> .....	<b>7</b>
1. Hipotálamo y núcleo paraventricular del hipotálamo: neuroanatomía y neuroendocrinología .....	7
2. Hipófisis: neuroanatomía y neuroendocrinología .....	13
2.1. Neurohipófisis .....	13
2.2. Adenohipófisis .....	13
3. Glándula adrenal: neuroanatomía y neuroendocrinología .....	14
3.1. Médula adrenal .....	14
3.2. Corteza adrenal .....	14
4. Hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal .....	16
4.1. Factor Liberador de Corticotropina (CRF) .....	16
4.1.1. Descubrimiento y caracterización .....	16
4.1.2. Distribución y receptores .....	16
4.1.3. Regulación de la secreción de CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo .....	18
a) Regulación por catecolaminas .....	18
b) Regulación por serotonina .....	18
c) Regulación por GABA .....	19
d) Regulación por otros neurotransmisores y neuropéptidos .....	19
4.1.4. Efectos endocrinos .....	19
4.1.5. Interacción entre CRF y otros neurotransmisores .....	20
a) Interacción con catecolaminas .....	20
b) Interacción con serotonina .....	20
c) Interacción con GABA .....	21
d) Interacción con opioides endógenos .....	21
4.1.6. CRF y estrés .....	21
4.2. Corticotropina o ACTH .....	22
4.2.1. Receptores de ACTH .....	22

4.2.2. Síntesis .....	23
4.2.3. Almacenamiento .....	24
4.2.4. Liberación .....	24
<u>Regulación de la secreción de ACTH en la hipófisis</u>	
a) Regulación por CRF .....	25
b) Regulación por arginina-vasopresina .....	26
c) Regulación por oxitocina .....	26
d) Regulación por adrenalina y noradrenalina .....	26
e) Regulación por serotonina .....	27
f) Regulación por otros factores .....	27
4.2.5. Metabolismo y excreción .....	27
4.3. Corticosterona .....	28
4.3.1. Receptores para glucocorticoides en el sistema nervioso central .....	28
a) Tipos de receptores y mecanismo de acción .....	28
b) Distribución .....	29
4.3.2. Síntesis .....	29
4.3.3. Almacenamiento .....	31
4.3.4. Liberación y regulación de la secreción de corticosterona en la corteza adrenal .....	31
4.3.5. Transporte .....	31
4.3.5. Metabolismo y excreción .....	32
5. El síndrome de estrés y su fisiología .....	32
5.1. Fisiología del estrés .....	32
5.2. Patofisiología del estrés .....	34
6. Actividad basal del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal .....	35
7. Modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en condiciones basales y situación de estrés por los glucocorticoides y receptores de glucocorticoides .....	36
7.1. Sistemas de retroalimentación negativa .....	36
7.2. Modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por los glucocorticoides .....	36
7.3. Modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por los receptores de glucocorticoides .....	38
7.4. Lugar de acción de los glucocorticoides sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal .....	38

II. FACTOR LIBERADOR DE GASTRINA (GRP) .....	39
1. Descubrimiento y caracterización .....	39
2. Síntesis y procesamiento .....	41
3. Localización de GRP .....	43
4. Distribución de ARNm de GRP .....	45
5. Receptores de GRP .....	47
5.1. Receptor de GRP: Identificación, clonaje y mecanismo de transducción .....	48
5.2. Distribución del receptor de GRP y su ARNm .....	49
6. Circuitos neuronales y co-localización de GRP con otros neurotransmisores y neuropéptidos .....	51
7. Efectos fisiológicos y farmacológicos de GRP .....	53
7.1. Actividad locomotora .....	53
7.2. Acicalamiento .....	53
7.3. Percepción del dolor .....	54
7.4. Conducta alimentaria .....	54
7.5. Regulación de la temperatura .....	55
7.6. Regulación del ritmo circadiano .....	56
7.7. Regulación de la glucemia .....	57
7.8. Contracción del músculo liso .....	57
7.9. Motilidad gastrointestinal .....	58
7.10. Regulación de la secreción gástrica y pancreática.....	58
7.11. Regulación de la secreción hormonal .....	59
7.11.1. <i>Secreción hormonal hipofisaria</i> .....	59
a) Prolactina y hormona de crecimiento .....	59
b) ACTH .....	61
c) Gonadotropinas .....	61
d) Oxitocina y vasopresina .....	62
e) Tirotropina .....	62
7.11.2. <i>Otras hormonas</i> .....	62
a) Hormonas hipotalámicas .....	62
b) Hormonas gastrointestinales .....	62
c) Secreción pancreática exocrina .....	64
d) Secreción pancreática endocrina .....	65
e) Hormonas gonadales: testosterona .....	65
f) Hormonas tiroideas .....	65
g) Parathormona .....	65
h) Hormonas adrenales .....	65

7.12. Función cardiaca .....	66
7.13. Procesos de aprendizaje .....	66
8. Antagonistas del receptor de GRP .....	69
8.1. Antagonistas peptídicos .....	69
8.1.1. Antagonistas peptídicos de clase I .....	69
8.1.2. Antagonistas peptídicos de clase II .....	70
8.1.3. Antagonistas peptídicos de clase III .....	71
8.1.4. Otros antagonistas peptídicos .....	72
8.2. Antagonistas no peptídicos .....	74
9. GRP y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal .....	76
9.1. Regulación de la secreción hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por GRP.....	76
9.2. GRP y su implicación en procesos de ansiedad y estrés .....	77
III. LA SEROTONINA COMO NEUROTRANSMISOR DEL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL Y REGULADOR DEL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL .....	78
1. Biosíntesis, almacenamiento, liberación, degradación y recaptación de serotonina ..	78
1.1. Biosíntesis .....	78
1.2. Almacenamiento y liberación .....	80
1.3. Recaptación .....	80
1.4. Degradación .....	80
2. Distribución de las vías serotoninérgicas en el sistema nervioso central .....	81
2.1. Cuerpos celulares .....	81
2.2. Proyecciones .....	81
3. Receptores serotoninérgicos .....	84
4. Serotonina y regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal .....	84
4.1. Acción de la serotonina sobre el hipotálamo .....	84
4.2. Acción de la serotonina sobre la hipófisis .....	85
4.3. Acción de la serotonina sobre la corteza adrenal .....	86
4.4. Acción de la serotonina sobre el sistema de retroalimentación de glucocorticoides .....	87

4.5. Acción de la serotonina sobre el control circadiano de ACTH y corticosterona .....	87
4.6. Serotonina, ansiedad y estrés .....	87
<b>IV. EXPRESIÓN GÉNICA DE NEUROPEPTIDOS .....</b>	<b>87</b>
1. Estructura génica .....	87
2. Regulación de la expresión génica .....	88
2.1. Regulación de la expresión génica por el receptor de hormonas esteroideas .....	89
2.2. Regulación de la expresión génica por la proteína fijadora al elemento de respuesta a AMPc (CREB) .....	89
2.3. Regulación de la expresión génica por genes de expresión temprana .....	89
3. Distribución del ARNm de CRF, POMC y PENK .....	90
3.1. Distribución del ARNm de CRF .....	90
3.2. Distribución del ARNm de POMC .....	90
3.3. Distribución del ARNm de PENK .....	90
4. Regulación de la expresión génica de CRF, POMC y PENK .....	90
3.1. Regulación de la expresión génica de CRF .....	91
3.2. Regulación de la expresión génica de POMC .....	93
3.3. Regulación de la expresión génica de PENK .....	95
<b>PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS .....</b>	<b>97</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>101</b>
1. Animales, péptidos y reactivos químicos .....	103
1.1. Animales .....	103
1.2. Péptidos .....	103
1.3. Reactivos químicos .....	103
2. Métodos experimentales <i>in vitro</i> .....	103
2.1. Explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal .....	103
2.1.1. <i>Explantes de hipotálamo e hipófisis</i> .....	103
2.1.2. <i>Explantes de hipófisis</i> .....	104
2.1.3. <i>Explantes de adrenal</i> .....	105

2.2. Disociados de adenohipófisis .....	105
2.2.1. Cultivo primario de células adenohipofisarias de rata .....	105
2.2.2. Experimento de secreción de ACTH .....	107
3. Procedimientos quirúrgicos .....	108
3.1. Administración intracerebroventricular .....	108
3.2. Administración intravenosa .....	110
4. Modelo experimental de estrés: estrés por restricción de movimientos .....	111
5. Medida de ACTH y corticosterona por radioinmunoensayo .....	111
5.1. Radioinmunoensayo de ACTH .....	112
5.1.1. Obtención de la muestra .....	112
5.1.2. Ensayo .....	112
5.2. Radioinmunoensayo de corticosterona .....	115
5.2.1. Obtención de la muestra .....	115
5.2.2. Ensayo .....	115
6. Hibridación <i>in situ</i> .....	117
6.1. Preparación del tejido .....	117
6.2. Hibridación <i>in situ</i> .....	118
6.2.1. Marcaje de la sonda de oligonucleótidos .....	118
6.2.2. Tratamientos de prehibridación .....	120
6.2.3. Hibridación .....	120
6.2.4. Posthibridación .....	121
6.2.5. Autorradiografía .....	121
7. Determinación de serotonina en distintas regiones cerebrales .....	122
7.1. Preparación del tejido .....	122
7.2. Medida de serotonina por cromatografía líquida de alta resolución .....	122
7.3. Medida del contenido de proteína de los núcleos cerebrales diseccionados .....	124
8. Análisis estadístico de los resultados .....	124
<b>RESULTADOS</b> .....	<b>124</b>
I. ACCIÓN REGULADORA DE GRP SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS- ADRENAL .....	127

## ESTUDIOS *IN VITRO*

1. Efecto de GRP sobre la liberación de ACTH y corticosterona en explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal ..... 127
2. Efecto del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)bombesina sobre la liberación basal e inducida por GRP de ACTH y corticosterona en explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal ..... 128
3. Estudio de la implicación de calcio extracelular en el efecto estimulador de GRP sobre la liberación de ACTH en disociados de adenohipófisis ..... 129

## ESTUDIOS *IN VIVO*

1. Efecto de GRP sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona ..... 131
  - 1.1. *Dosis-respuesta* ..... 131
  - 1.2. *Curso temporal* ..... 132
2. Efecto del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)bombesina sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona tanto basal como inducida por GRP ..... 132
  - 2.1. *Dosis-respuesta* ..... 132
  - 2.2. *Bloqueo del efecto producido por GRP* ..... 134
3. Efecto del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona tanto basal como inducida por GRP ..... 134
  - 3.1. *Dosis-respuesta* ..... 134
  - 3.2. *Bloqueo del efecto producido por GRP* ..... 134

## II. ACCIÓN REGULADORA DE GRP SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL EN SITUACIÓN DE ESTRÉS ..... 135

1. Efecto del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF sobre la secreción de ACTH y corticosterona tras estrés por restricción de movimientos ..... 135
2. Efecto del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)bombesina sobre la secreción de ACTH y corticosterona tras estrés por restricción de movimientos ..... 136

## III. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEROTONINÉRGICA DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO POR GRP ..... 137

1. Efecto de GRP sobre la actividad serotoninérgica en distintos núcleos cerebrales ..... 138

2. Efecto del antagonista del receptor de GRP (Leu <sup>13</sup> -ψ-CH <sub>2</sub> NH-Leu <sup>14</sup> )bombesina sobre la activación serotoninérgica producida por GRP en el núcleo paraventricular .....	139
2.1. Dosis-respuesta .....	139
2.2. Bloqueo del efecto producido por GRP .....	139
3. Efecto del antagonista del receptor de CRF (Leu <sup>13</sup> -ψ-CH <sub>2</sub> NH-Leu <sup>14</sup> )bombesina sobre la activación serotoninérgica producida por GRP o por estrés en el núcleo paraventricular .....	140
3.1. Dosis-respuesta .....	140
3.2. Bloqueo del efecto producido por estrés .....	142
3.3. Bloqueo del efecto producido por GRP .....	142
4. Efecto del antagonista del receptor de GRP (Leu <sup>13</sup> -ψ-CH <sub>2</sub> NH-Leu <sup>14</sup> )bombesina sobre la activación serotoninérgica en el núcleo paraventricular producida por estrés .....	143
<b>IV. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE NEUROPEPTIDOS POR GRP .....</b>	<b>144</b>
1. Efecto de GRP sobre la expresión génica de CRF en el núcleo paraventricular .....	144
2. Efecto de GRP sobre la expresión génica de PENK en el núcleo paraventricular y núcleo ventromedial .....	145
3. Efecto de GRP sobre la expresión génica de POMC en el lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis .....	148
3.1. Lóbulo anterior .....	148
3.2. Lóbulo intermedio .....	149
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>151</b>
<b>I. ACCIÓN REGULADORA DE GRP SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL .....</b>	<b>153</b>
ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....	153
ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....	154
<b>II. ACCIÓN REGULADORA DE GRP SOBRE EL EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-ADRENAL EN SITUACIÓN DE ESTRÉS .....</b>	<b>156</b>
<b>III. REGULACIÓN DE LA ACTIVIDAD SEROTONINÉRGICA DEL NÚCLEO PARAVENTRICULAR DEL HIPOTÁLAMO POR GRP .....</b>	<b>157</b>
<b>IV. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DE NEUROPEPTIDOS POR GRP .....</b>	<b>159</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>163</b>

## ABREVIATURAS

aa:	aminoácido
ACC:	núcleo accumbens
Ach:	acetilcolina
ACTH:	corticotropina u <i>hormona adrenocorticotropa</i>
ADN:	ácido desoxirribonucleico
AM:	ciclo diurno
AMPc:	adenosin monofosfato cíclico
ANOVA:	análisis de varianza
ARC:	núcleo arqueado del hipotálamo
ARNm:	ácido ribonucleico mensajero
ARNt:	ácido ribonucleico de transferencia
Asn:	arginina
ATP:	adenosin trifosfato
ATV:	área tegmental ventral
AVP:	arginina-vasopresina
BBS:	bombesina
CCK-8:	octapéptido terminal de colecistoquinina
CCK:	colecistoquina
Ci:	curios
CLIP:	péptido del lóbulo intermedio análogo a la corticotropina o "corticotropin-like intermediate lobe peptide"
cm:	centímetro
cpm:	cuentas por minuto
CRF:	factor liberador de corticotropina
CTEP:	extensión carboxilo terminal del péptido o "carboxi terminal extension peptide"
Cys:	cisteína
DA:	dopamina
DAG:	diacilglicerol
DEPC:	dietil pirocarbonato
DHPG:	3,4, dihidroxifeniletilenglicol
5,7-DHT:	5,7-dihidroxitriptamina
DMEM:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMV:	núcleo motor dorsal del vago
DNAsa:	desoxirribonucleasa
DOI:	2,5, dimetoxi-4-yodo-fenil-2-aminopropano
DOPAC:	ácido 3,4 dihidroxifenilacético
EM:	eminencia media
ETIC:	eticloprida
fmol:	fentomol
FSH:	<i>hormona estimulante del foliculo</i>
g:	gramo
GABA:	ácido $\gamma$ -aminobutírico
GH:	hormona de crecimiento o somatotropina
GH-RH:	hormona liberadora de la hormona de crecimiento
Gly:	glicina
GRP:	péptido liberador de gastrina o "gastrin-releasing peptide"
GRP-10:	decapéptido terminal de GRP
GRP <sub>1-27</sub> :	péptido liberador de gastrina (secuencia de aminoácidos 1-27)

GRP <sub>18-27</sub> :	péptido liberador de gastrina (secuencia de aminoácidos 18-27)
GRPh:	péptido liberador de gastrina humano
GTP:	guanosin trifosfato
h:	hora
HHA:	eje hipotálamo-hipófisis-adrenal
5-HIAA:	ácido 5- hidroxindolacético
His:	histidina
HPLC:	cromatografía líquida de alta resolución
5-HT:	serotonina o 5-hidroxitriptamina
5-HTP:	5-hidroxitriptófano
HVA:	ácido homovanílico
icv:	administración intracerebroventricular o en el ventrículo lateral cerebral
ip:	administración intraperitoneal
IP <sub>3</sub> :	inositol trifosfato
IR-GRP:	inmunorreactividad a GRP
ISRS:	inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina
iv:	administración intravenosa
kg:	kilogramo
l:	litro
LC:	locus coeruleus
Leu:	leucina
leu-enk:	péptido leucina-encefalina
LH:	hormona luteinizante
LH-RH:	factor liberador de la hormona luteinizante
β-LPH:	β-lipotropina
γ-LPH:	γ-lipotropina
Lys:	lisina
MAO:	monoaminoxidasa
m-CPBG:	1-(m-clorofenil)-biguanida
m-CPP:	m-clorofenil-piperazina
Met:	metionina
met-enk:	péptido metionina-encefalina
min:	minuto
mg:	miligramo
ml:	mililitro
mm:	milímetro
mmol:	milimol
mM:	milimolar
M:	molar
μg:	microgramo
μl:	microlitro
μm:	micra
μM:	micromolar
α-MSH:	hormona α-estimulante del melanocito
β-MSH:	hormona β-estimulante del melanocito
NA:	noradrenalina
ng:	nanogramo
nM:	nanomolar
NMDA:	N-metil-D-aspartato
NMB:	neuromedina B

NO:	óxido nítrico
NPe:	núcleo periventricular del hipotálamo
NPV:	núcleo paraventricular del hipotálamo
NPY:	neuropéptido Y
NRS:	suero normal de conejo
NSO:	núcleo supraóptico del hipotálamo
NSQ:	núcleo supraquiasmático del hipotálamo
NTS:	núcleo del tracto solitario
NVM:	núcleo ventromedial del hipotálamo
8-OH-DPAT:	8-hidroxi-2-(dipropilamino) tetralina
PBS:	solución salina tamponada con fosfato
PCPA:	p-clorofenilalanina
PEG:	polietilenglicol
PENK:	proencefalina
pg:	picogramo
PGE2:	prostaglandina E2
Phe:	fenilalanina
PHI:	péptido histidina-isoleucina
PIP <sub>2</sub> :	fosfatidil inositol fosfato
PKC:	proteína-quinasa C
PKA:	proteína-quinasa A
PLC:	fosfolipasa C
PM:	ciclo nocturno
pmol:	picomol
POMC:	proopiomelanocortina
PP:	polipéptido pancreático
PRL:	prolactina
pro-GRP:	polipéptido precursor de GRP
p/v:	peso/volumen
RG:	receptor de glucocorticoides
RIA:	radioinmunoensayo
RM:	receptor de mineralocorticoides
rpm:	revoluciones por minuto
sc:	administración subcutánea
SCLC:	tumor pulmonar de células pequeñas o "small cell lung carcinoma"
Ser:	serina
seg:	segundo
SGP:	sustancia gris periacueductal
SNC:	sistema nervioso central
SNP:	sistema nervioso periférico
SSC:	citrato sódico salino
T3:	triyodotirosina
T4:	tetrayodotironina o tiroxina
$\Delta^9$ -THC:	$\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
TRH:	hormona liberadora de tirotrópina
Trp:	triptófano
TSH:	tirotrópina
Tyr:	tirosina
UI:	unidades internacionales
Val:	valina

VIP: péptido intestinal vasoactivo  
v/v: volumen/volumen  
W: vatio

# **Resumen**

---



El Péptido Liberador de Gastrina (GRP) es un péptido de 27 aminoácidos que fue aislado por Mc Donald y cols. en 1977 de tejido gástrico porcino e identificado posteriormente en el Sistema Nervioso Central (SNC) de mamíferos y en el hombre (Moghimzadeh y cols., 1983; Price y cols., 1984). Asimismo, GRP es un estimulador potente de las secreciones pancreática y gástrica en animal de experimentación y en humano (Knigge y cols., 1984; Knuhtsen y cols., 1984).

Además de su localización en tejido gástrico se ha encontrado inmunorreactividad a GRP así como receptores específicos en el tejido cerebral, principalmente en el hipotálamo (Moody y cols., 1981). GRP regula la temperatura, el apetito, y también interviene en el control de las funciones cardíaca y gástrica (Brown y cols., 1977; Gibbs y Smith, 1988; Makhoulf y Schubert, 1988; Walsh y cols., 1988). Además, GRP participa en la regulación neuroendocrina de la secreción de hormonas hipofisarias; por ejemplo, GRP inhibe indirectamente la secreción de hormona de crecimiento (GH) y prolactina (PRL) *in vivo* (Kentroti y cols., 1988a y b; Manzanera y cols., 1991).

Su abundancia en el SNC, concretamente en el hipotálamo, apunta hacia una finalidad coordinada con el factor liberador de corticotropina (CRF) en el proceso de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), implicado en la fisiopatología de algunas alteraciones mentales que cursan con ansiedad, como son la depresión, anorexia nerviosa y bulimia.

El presente trabajo ha tenido como objetivo en primer lugar estudiar la participación de GRP en la regulación del eje HHA en condiciones basales. Para ello se han realizado experimentos tanto *in vivo* como *in vitro*.

Los experimentos *in vitro* revelan que GRP activa el eje HHA y aumenta la liberación de corticotropina (ACTH) y corticosterona actuando a través de su receptor a los tres niveles del eje HHA, es decir, en el hipotálamo, aumentando la liberación de CRF, en la hipófisis, aumentando la liberación de ACTH, y en la glándula adrenal, aumentando la liberación de corticosterona. Asimismo, se ha observado que GRP no regula de forma tónica la liberación de estas hormonas a ninguno de los tres niveles del eje. Por otra parte, y con el fin de determinar si la liberación de ACTH inducida por GRP a nivel hipofisario es dependiente de calcio, se estudió el efecto de distintas concentraciones de GRP sobre la liberación de esta hormona tanto en condiciones fisiológicas (concentración de calcio extracelular 1,5 mM) como en concentraciones bajas de calcio extracelular (200 nM), encontrándose que la liberación de ACTH inducida por GRP es un proceso calcio-dependiente.

Los experimentos *in vivo* demuestran que GRP es un potente activador del eje HHA, efecto ejercido a nivel central, ya que su administración intracerebroventricular (icv), pero no su administración intravenosa (iv), eleva de forma marcada las concentraciones plasmáticas de ACTH y corticosterona. Este efecto parece estar mediado tanto por el receptor de GRP como por el de CRF, ya que la administración de antagonistas de ambos receptores bloquea la secreción plasmática de ACTH y corticosterona inducida por GRP. Asimismo, y mediante el uso de estos mismos antagonistas se ha observado que tanto GRP como CRF no regulan de forma tónica la secreción plasmática de ambas hormonas.

Una vez descritas tanto la vía de administración, como las dosis, los tiempos y el mecanismo de acción por el cual GRP activa el eje HHA, y tras no haberse encontrado evidencias de su participación en la regulación endógena de la secreción de ACTH y corticosterona en condiciones basales, se decidió estudiar la posible función fisiológica de este neuropéptido y la implicación del receptor de GRP tras la activación del eje HHA en situación de estrés, y compararla con el efecto que CRF (el activador más potente del eje HHA conocido hasta ahora) ejerce sobre estos procesos. Para ello se han utilizado los antagonistas mencionados anteriormente, y se ha observado, como ya era sabido, que el estrés por restricción de movimientos produce una gran elevación de la secreción de ACTH y corticosterona, pero que además, ese aumento es atenuado, no sólo como era previsible tras el bloqueo previo con un antagonista del receptor de CRF, sino que también posee el mismo efecto un antagonista del receptor de GRP.

Dada la importancia de la serotonina en la regulación del eje HHA, el objetivo del siguiente bloque de experimentos ha sido caracterizar el papel de GRP sobre la actividad serotoninérgica del núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV) tanto en situación basal como de estrés, así como los mecanismos eventualmente implicados en dicho efecto. La administración icv de GRP aumenta la actividad serotoninérgica en el NPV, efecto que parece estar mediado por el receptor de GRP, pero no por el de CRF; asimismo, se ha observado que tanto GRP como CRF no regulan de forma tónica la actividad serotoninérgica en el NPV en condiciones basales, pero sí en procesos de estrés.

En la última parte de experimentos se ha estudiado el efecto que produce la administración icv de GRP sobre la regulación de la expresión génica de CRF, proopiomelanocortina (POMC) y proencefalina (PENK) y cómo dicho efecto eventual podría modificarse a lo largo del tiempo. La medida del ARNm de estos polipéptidos se ha realizado mediante técnicas de histoquímica por hibridación *in situ*, en distintas regiones hipotalámicas e hipofisarias, áreas en las que se expresan dichos precursores en alta proporción. Estas son el NPV y el núcleo ventromedial (NVM) del hipotálamo, y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis. GRP eleva los niveles de ARNm de CRF en el NPV, 120 min tras su administración, mientras que la expresión génica de PENK a los tiempos estudiados no se modifica ni en el NPV ni en el NVM. Por último, GRP eleva de forma marcada los niveles de ARNm de POMC en el lóbulo anterior (60 y 120 min tras su administración) e intermedio de la hipófisis (30 y 60 min tras su administración).

En conclusión, los resultados presentados ponen de manifiesto que GRP es un potente activador del eje HHA, actuando de forma coordinada con CRF en la regulación de la secreción de ACTH y corticosterona, y demuestran la implicación de GRP en el aumento de la secreción hormonal adenohipofisaria y de la actividad serotoninérgica en el NPV que se produce en situaciones de estrés. Aparentemente, este neuropéptido es capaz de modificar la expresión génica de CRF en el NPV y POMC en la hipófisis en condiciones basales. Todo ello apunta que GRP podría ser un nuevo secretagogo de ACTH y corticosterona, y sugiere la eventual aplicación de antagonistas de GRP en el tratamiento de patologías relacionadas con determinados tipos de estrés que cursan con alteraciones del eje HHA como son la ansiedad y/o la depresión.

# **Introducción**

---



## I. El eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El mantenimiento de la homeostasis es fundamental para la supervivencia del individuo y propagación de su especie. Para ello, debe existir una coordinación entre las condiciones ambientales externas y los procesos fisiológicos que materializan la respuesta. Así, los seres vivos han desarrollado una serie de mecanismos y sistemas que les permiten mantener esta homeostasis y adaptarse de este modo al ambiente.

Con este fin, los mamíferos, han desarrollado un procedimiento de defensa complejo que incluye algunos de los componentes del Sistema Nervioso Central (SNC), como son el núcleo paraventricular del hipotálamo (NPV), distintos núcleos noradrenérgicos del tallo cerebral, el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) y el sistema nervioso autónomo. El objetivo de todos estos sistemas en su conjunto es mantener la homeostasis tanto en situación basal como de estrés, e intervenir en la regulación de funciones corporales fundamentales, como el tono cardiovascular, la respiración y el metabolismo. La activación de estos sistemas inhibe algunas funciones ejercidas por el SNC, como son el comportamiento sexual y la conducta alimenticia, y en cambio estimula otras, como son las emociones. Por otra parte, la activación de estos sistemas también altera funciones reguladas por el sistema nervioso autónomo periférico, como son la funcionalidad gastrointestinal y la respuesta inflamatoria e inmune.

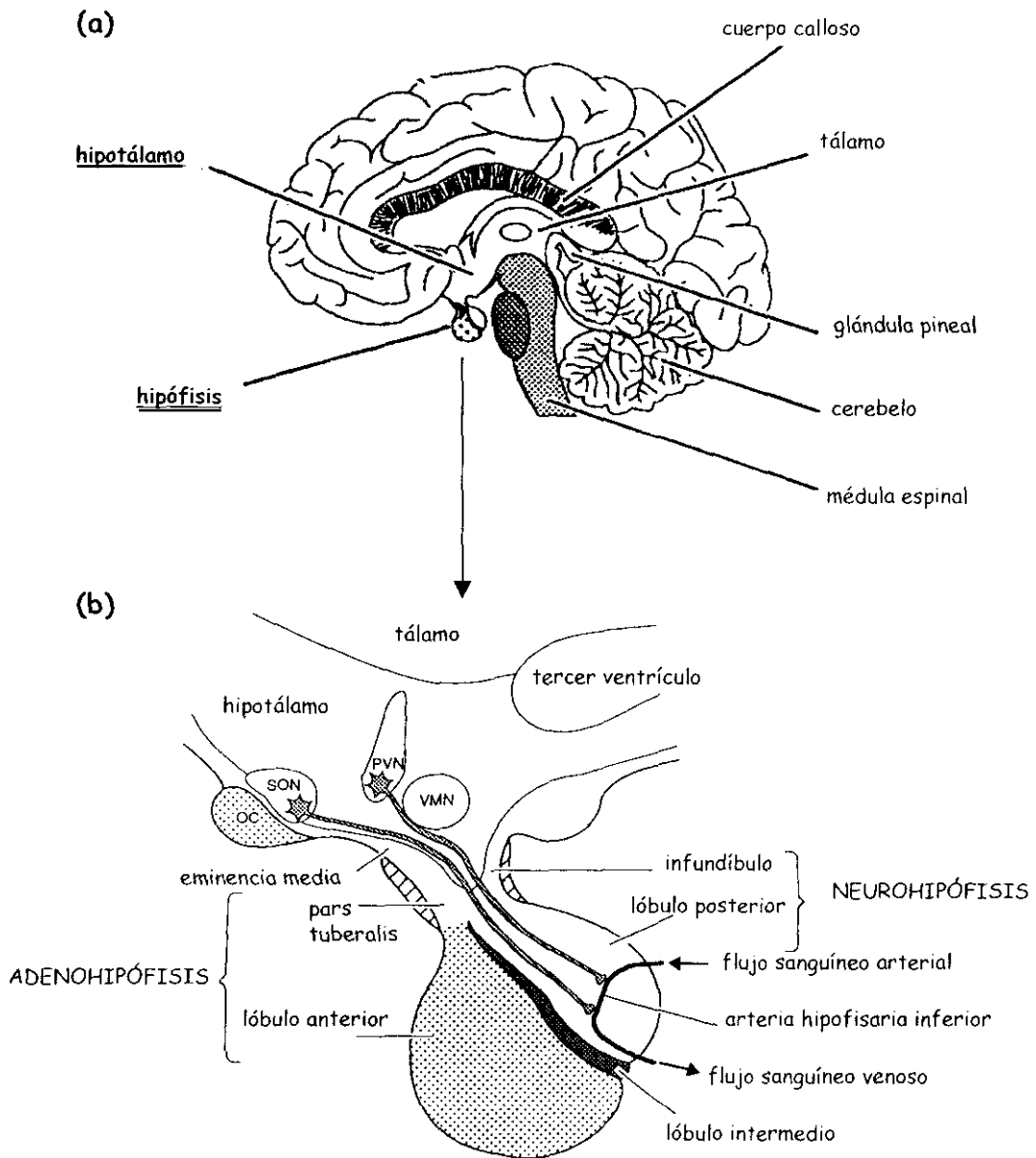
El eje HHA es un sistema que integra tres niveles diferentes. La activación de este eje se inicia en el NPV, con la liberación del factor liberador de corticotropina (CRF) a la circulación portal hipofisaria. En la hipófisis anterior, CRF actúa sobre sus receptores situados a este nivel para estimular así la liberación de la hormona adrenocorticotropa o ACTH, que a su vez actúa sobre las glándulas adrenales para inducir la síntesis y liberación de glucocorticoides, corticosterona en roedores y cortisol en primates y en el hombre. Los glucocorticoides ejercen un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de CRF y ACTH. Esta alteración hormonal responde a distintos estímulos estresantes y a cambios debidos a la adaptación del individuo a su entorno, así como a procesos fisiológicos endógenos.

### 1. Hipotálamo y núcleo paraventricular del hipotálamo: neuroanatomía y neuroendocrinología

El hipotálamo está localizado en la base del cerebro anterior, por debajo del tálamo (*figura 1*) y está dividido en dos partes por el tercer ventrículo. El hipotálamo contiene a su vez distintas regiones, cada una de ellas formada por cuerpos celulares situados de forma bilateral en relación al tercer ventrículo (Zaborszky, 1982).

Distintas fibras nerviosas conectan el hipotálamo con la corteza cerebral, el tálamo, otras partes del sistema límbico (como el hipocampo, la amígdala y el septum) y la médula espinal. Las neuronas de estas regiones cerebrales liberan neurotransmisores que regulan las neuronas hipotalámicas (Martin, 1985).

**FIGURA 1**  
**El hipotálamo y la hipófisis**



(a) El hipotálamo se encuentra en la base del cerebro medio, por debajo del tálamo; la hipófisis se encuentra unida a la eminencia media hipotalámica por el infundíbulo. (b) Conexiones entre el hipotálamo y la hipófisis y principales subdivisiones de la hipófisis.

Es importante destacar la gran cantidad de funciones que realizan los distintos núcleos hipotalámicos. Además de sintetizar hormonas, el hipotálamo: a) regula el sistema nervioso

autónomo simpático y parasimpático, que controla las funciones viscerales; b) interviene en la regulación de la temperatura corporal del organismo; c) contiene el “reloj biológico” que regula los ritmos biológicos del organismo; d) regula el balance electrolítico; e) controla el comportamiento emocional (enfado, miedo, euforia, ansiedad) y otros tipos de comportamiento como hambre, sed, agresión y comportamiento sexual (Zaborszky, 1982; Martin, 1985).

El hipotálamo contiene además células neurosecretoras encargadas de liberar hormonas. Existen dos grupos de células neurosecretoras hipotalámicas agrupadas en dos sistemas: el sistema magnocelular y el sistema parvocelular:

a) *Sistema magnocelular*: Las células neurosecretoras magnocelulares están localizadas en el NPV y en el núcleo supraóptico (NSO). El NPV contiene dos tipos de células, un grupo que sintetiza oxitocina y otro grupo que sintetiza arginina-vasopresina (AVP). Asimismo, el NSO también produce oxitocina y vasopresina. Estas células se proyectan hasta el lóbulo neural de la hipófisis, donde estas hormonas se liberan a partir de las terminaciones nerviosas (Swanson y Sawchenko, 1983).

b) *El sistema parvocelular*: Las células neurosecretoras parvocelulares se encuentran en el área preóptica, núcleo ventromedial (NVM), núcleo arqueado (ARC), NPV y NSO, y se proyectan hasta la eminencia media (EM) del hipotálamo. Esta última región contiene venas portales hipofisarias que desembocan en la adenohipófisis. Los axones de las neuronas parvocelulares desembocan en la EM, donde forman terminaciones sobre el espacio pericapilar que rodea los capilares del sistema portal hipofisario (Antoni, 1986a). De esta forma, las hormonas hipotalámicas (llamadas hormonas hipofisiotrópicas) se liberan en la EM (tabla 1), desde donde se incorporan a la circulación portal hipofisaria, alcanzando la adenohipófisis, donde a su vez regulan la liberación de distintas hormonas. Para ser llamadas hipofisiotrópicas, estas hormonas deben cumplir tres condiciones: a) estar presentes en la EM; b) presentar niveles mayores en circulación portal hipofisaria que en el resto del sistema circulatorio; c) presentar niveles en circulación portal hipofisaria correlacionables con la secreción de la correspondiente hormona hipofisaria (Sarkar, 1983).

El NPV del hipotálamo posee ocho subdivisiones, tres magnocelulares (anterior, medial y posterior), cuyas neuronas emiten sus axones a la neurohipófisis, y cinco parvocelulares (periventricular, anterior, medial, dorsal y lateral), cuyas neuronas emiten sus axones a la zona externa de la EM y a distintos núcleos del tallo cerebral y de la médula espinal, algunos de los cuales están relacionados con el sistema nervioso autónomo. Por otro lado, las neuronas de este núcleo reciben aferencias del tallo cerebral, de las regiones límbicas del telencéfalo y del hipotálamo, incluyendo el área preóptica, los núcleos supraquíasmático (NSQ), ARC y NVM, el núcleo subfornical y las áreas hipotalámicas anterior y lateral. Estas proyecciones son pequeñas, exceptuando las aferencias del ARC y del área subfornical, y alcanzan el NPV para continuar y terminar en otras regiones, como la EM, y en menor medida el tallo cerebral y la médula espinal (Swanson y Sawchenko, 1983).

**TABLA 1**  
**Hormonas sintetizadas y liberadas a partir de células neurosecretoras del hipotálamo**

Área hipotalámica	Síntesis hormonal
Área preóptica	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH)</li> <li>● Hormona liberadora de tirotrópina (TRH)</li> </ul>
Núcleo supraóptico	<ul style="list-style-type: none"> <li>● En la región magnocelular:               <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ AVP</li> <li>⇒ Oxitocina</li> </ul> </li> <li>● En la región parvocelular:               <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ CRF</li> </ul> </li> </ul>
Núcleo paraventricular	<ul style="list-style-type: none"> <li>● En la región magnocelular:               <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ AVP</li> <li>⇒ Oxitocina</li> </ul> </li> <li>● En la región parvocelular:               <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ CRF</li> <li>⇒ TRH</li> </ul> </li> </ul>
Núcleo ventromedial	<ul style="list-style-type: none"> <li>● Hormona liberadora de somatotropina (GH-RH)</li> <li>● Somatostatina</li> <li>● CRF</li> <li>● TRH</li> </ul>
Núcleo arqueado Eminencia media	<ul style="list-style-type: none"> <li>● TRH</li> <li>● CRF</li> <li>● GH-RH</li> <li>● Somatostatina</li> </ul>

Numerosos cuerpos celulares de neuronas parvocelulares que se proyectan a la zona externa de la EM contienen una alta concentración de CRF (Antoni, 1986a), un péptido de 41 aminoácidos que es la principal hormona encargada de activar el eje HHA, como se explicará posteriormente. Estas neuronas también contienen el ARNm que codifica el precursor de CRF (Young y cols., 1986a). Se ha descrito que CRF y AVP, y sus respectivos ARNm coexisten en las neuronas parvocelulares del NPV que terminan en la EM (Tramu y cols., 1983; Sawchenko y cols., 1984a y b; Wolfson y cols., 1985). De hecho, CRF y AVP están presentes en las mismas vesículas secretoras de la zona externa de la EM, lo que sugiere que pueden ser liberados de forma conjunta (Whitnall y cols., 1985). También existen otros péptidos co-localizados con CRF en estas neuronas, como angiotensina II (Lind y cols., 1985) y octapéptido amino-terminal de colecistoquinina (CCK-8; Mezey y cols., 1986). El conjunto de sustancias neuroactivas localizadas en el NPV se resume en la *tabla 2*.

Asimismo, pero en menor medida, existen neuronas que contienen CRF que se proyectan hacia la zona interna de la EM desde la región magnocelular del NPV. En estas neuronas, CRF coexiste con AVP (Sterba y Schober, 1979), oxitocina (Sawchenko y cols.,

1984b), angiotensina II (Hoffman y cols., 1982) y CCK-8 (Vanderhaeghen y cols., 1985).

Todos los péptidos mencionados anteriormente inducen la secreción de ACTH en la adenohipófisis, por lo que se les considera *secretagogos de ACTH*.

**TABLA 2**  
**Sustancias neuroactivas identificadas en el núcleo paraventricular**

<b>Sustancia neuroactiva</b>	<b>Subdivisión del núcleo paraventricular en la que se encuentra</b>
<i>A. Cuerpo celular</i>	
Oxitocina y vasopresina	División magnocelular principalmente, también parvocelular
Somatostatina	Subdivisión periventricular parvocelular
Dopamina	Subdivisión periventricular parvocelular y regiones adyacentes
metionina-encefalina (met-enk) y leucina-encefalina (leu-enk)	División parvocelular y magnocelular. Predomina met-enk sobre leu-enk
Neurotensina	Subdivisión medial y periventricular parvocelular
Dinorfina	Coexiste con vasopresina en división magnocelular
Sustancia P	División parvocelular
Glucagón	División magnocelular
Renina	En neuronas oxitocinérgicas en división magnocelular
CRF	Subdivisión anterior y medial parvocelular
ACTH (1-39) y $\beta$ -endorfina	División magnocelular

<b>Sustancia neuroactiva</b>	<b>Subdivisión del núcleo paraventricular en la que se encuentra</b>	<b>Procedencia</b>
<i>B. Fibras y terminales</i>		
Noradrenalina	División parvocelular. También en neuronas vasopresinérgicas en división magnocelular	Células catecolaminérgicas A1(médula ventral), A2 (núcleo del tracto solitario) y A6 (locus coeruleus)
Adrenalina	División parvocelular	Células catecolaminérgicas C1(médula ventral) y C2 (núcleo del tracto solitario)
Serotonina	División parvocelular y células oxitocinérgicas de la división magnocelular	Núcleo dorsal y medial del rafe
Acetilcolina	Neuronas colinocéptivas	Desconocida
ACTH (1-39), β-endorfina y hormona α-estimulante del melanocito	Subdivisión periventricular, dorsal y medial parvocelular	núcleo arqueado
Péptido intestinal vasoactivo	Subdivisión periventricular parvocelular	Desconocida. Quizás núcleo supraóptico
Ácido γ-aminobutírico (GABA)	Distribución detallada en el núcleo paraventricular desconocida	Desconocida
TRH	División parvocelular principalmente. También en división magnocelular	Desconocida
Polipéptido pancreático	Presente en fibras en el núcleo paraventricular	Desconocida
Bradiquinina	Presente en pocas fibras del núcleo paraventricular	Desconocida
Prolactina (PRL)	Presente en fibras del núcleo paraventricular	Desconocida
Angiotensina II	Varicosidades dispersas en el núcleo paraventricular	Desconocida

(Tomado de Swanson y Sawchenko, 1983)

## 2. Hipófisis: neuroanatomía y neuroendocrinología

La hipófisis es una glándula que se encuentra unida al hipotálamo, concretamente a nivel de la EM, por el pedúnculo hipofisario. Está dividida en tres partes: lóbulo anterior (pars distalis), lóbulo intermedio (pars intermedia) y lóbulo posterior (pars nervosa). De forma conjunta, el lóbulo anterior y el intermedio forman una verdadera glándula endocrina, la adenohipófisis, mientras que el lóbulo posterior, también llamado neurohipófisis es una extensión del hipotálamo y por tanto está formada por tejido neural (*figura 1*). La hipófisis secreta diez hormonas a partir de sus tres lóbulos (*tabla 3*), y esta secreción es regulada por el hipotálamo (Brown, 1994).

**TABLA 3**  
**Hormonas sintetizadas y liberadas por la hipófisis**

Lóbulo hipofisario	Síntesis hormonal
Lóbulo anterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Hormona de crecimiento o somatotropina (GH)</li> <li>•ACTH</li> <li>•Hormona estimulante del tiroides o tirotropina (TSH)</li> <li>•Prolactina (PRL)</li> <li>•Gonadotropinas:                             <ul style="list-style-type: none"> <li>⇒ Hormona estimulante del foliculo (FSH)</li> <li>⇒ Hormona luteinizante (LH)</li> </ul> </li> </ul>
Lóbulo intermedio	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Hormona estimulante del melanocito (MSH)</li> <li>•<math>\beta</math>-endorfina</li> </ul>
Lóbulo posterior	<ul style="list-style-type: none"> <li>•Oxitocina</li> <li>•AVP</li> </ul>

### 2.1. Neurohipófisis

La neurohipófisis, como se ha mencionado anteriormente, es una proyección del cerebro formada por tejido neural. Contiene el lóbulo posterior de la hipófisis y una parte del pedúnculo hipofisario, llamado infundíbulo, que contiene los axones de las células neurosecretoras hipotalámicas. Estas células neurosecretoras están localizadas en el NPV y NSO del hipotálamo, núcleos en los que se sintetizan oxitocina y AVP, que son liberadas en esta región hipofisaria (Brown, 1994).

### 2.2. Adenohipófisis

La adenohipófisis, como se ha indicado anteriormente, es una verdadera glándula endocrina, constituida por el lóbulo anterior e intermedio, y se encuentra unida al hipotálamo

por una parte del pedúnculo hipofisario llamada pars tuberalis, que contiene los vasos sanguíneos del sistema portal hipofisario. Las terminaciones nerviosas de las células neurosecretoras hipotalámicas terminan en la EM, desde donde las hormonas liberadas por estas neuronas se liberan a la circulación portal hipofisaria, alcanzando así la adenohipófisis.

El sistema portal hipofisario, que conecta el hipotálamo con la hipófisis, es relativamente complejo. La arteria superior hipofisaria desemboca en la EM, donde se forman una serie de capilares, llamados en su conjunto "plexo primario", donde las hormonas hipotalámicas son liberadas. Estas hormonas viajan a través de las venas portales hipofisarias de la pars tuberalis hasta otra serie de capilares en la adenohipófisis llamados en su conjunto "plexo secundario". En este lugar, las hormonas hipotalámicas estimulan las células hipofisarias para liberar sus hormonas, desde donde alcanzan la circulación general (Brown, 1994). Además de liberarse en el plexo secundario, algunas hormonas adenohipofisarias, como prolactina (PRL), se liberan en el líquido cerebroespinal (Lenhard y Deftos, 1982).

### **3. Glándula adrenal: neuroanatomía y neuroendocrinología**

Existen dos glándulas adrenales, cada una de ellas situada sobre cada riñón. Cada glándula adrenal contiene a su vez dos glándulas endocrinas: la médula adrenal, situada más internamente, y la corteza, que rodea la médula (*figura 2*).

#### **3.1. Médula adrenal**

La médula adrenal es una glándula endocrina cuya secreción está controlada por el sistema nervioso simpático. A partir de esta glándula se liberan a la sangre adrenalina, y noradrenalina (NA). La adrenalina se libera tras una situación de estrés debido a condiciones ambientales extremas, como el frío, o en situaciones de peligro, y actúa elevando la frecuencia cardíaca y los niveles plasmáticos de glucosa, lo que contribuye a aumentar la capacidad de trabajo que el músculo puede realizar. La NA eleva la presión arterial y produce la contracción de los vasos sanguíneos.

Además, la médula adrenal libera pequeñas cantidades de dopamina (DA) y otras sustancias no catecolaminérgicas (Brown, 1994).

#### **3.2. Corteza adrenal**

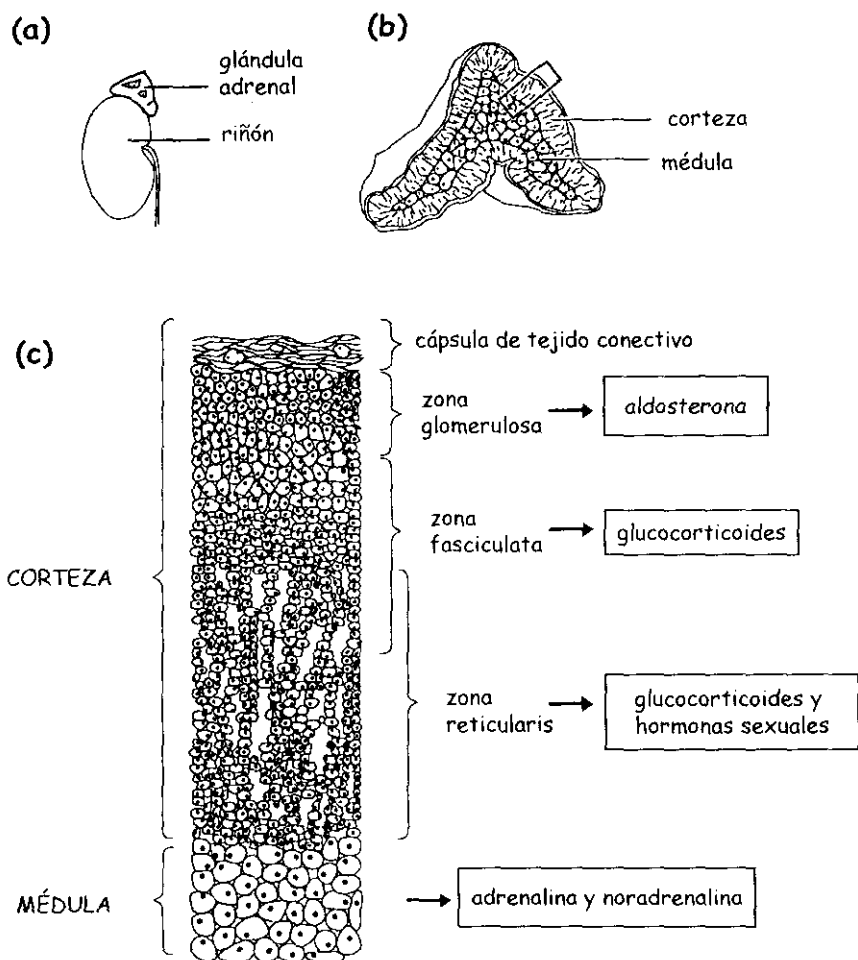
La corteza adrenal sintetiza y libera tres tipos de hormonas esteroideas: mineralocorticoides, glucocorticoides y andrógenos.

La síntesis y liberación de glucocorticoides (cortisol y corticosterona) se estimula por ACTH. Estas hormonas modulan el metabolismo de glucosa y otros nutrientes orgánicos y transforman las grasas y proteínas en carbohidratos. Además, los glucocorticoides se liberan tras una situación de estrés y ejercen funciones antiinflamatorias e inmunosupresoras: inhiben la respuesta inflamatoria y alérgica y la producción de linfocitos por el sistema

inmune.

La aldosterona es un mineralocorticoide que interviene en el metabolismo de sales minerales. Su secreción se estimula al disminuir los niveles de sodio, y al liberarse incrementa la reabsorción de iones sodio en el riñón y las glándulas salivares, principalmente. Por último, la corteza adrenal libera pequeñas cantidades de andrógenos (dehidroepiandrosterona y androstenodiona), que debido a su baja potencia respecto a la testosterona, no poseen una función fisiológica relevante en el hombre, aunque sí la tienen en la mujer.

**FIGURA 2**  
**La glándula adrenal**



(a) Situación de la glándula adrenal, encima del riñón. (b) Sección transversal de la glándula adrenal, mostrando la corteza y la médula. (c) Sección transversal de la glándula adrenal, mostrando las diferentes capas de la corteza que rodean la médula y las hormonas liberadas en cada una de ellas.

La corteza adrenal no es una glándula homogénea, ya que está formada por tres láminas o tejidos (*figura 2*): La lámina más externa -zona glomerulosa- contiene gran cantidad de enzimas necesarios para transformar corticosterona en aldosterona, pero carece de los enzimas necesarios para la síntesis de cortisol y andrógenos. Por lo tanto, en esta lámina se sintetiza aldosterona principalmente. Por el contrario, la zona fasciculata y la zona reticularis presentan un perfil enzimático diferente, por lo que secretan cortisol y andrógenos y no aldosterona (Brown, 1994).

## **4. Hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

### **4.1. Factor Liberador de Corticotropina (CRF)**

#### *4.1.1. Descubrimiento y caracterización*

Harris, en 1948, fue el primer investigador en postular la existencia de hormonas hipotalámicas que podrían ser liberadas desde la EM hipotalámica hasta la hipófisis, y así modular la secreción de hormonas hipofisarias. En 1955, Guillermin y Rosenberg, y Saffran y Schally, demostraron de forma independiente la existencia de un factor presente en el hipotálamo que podría producir la liberación de ACTH en hipófisis de ratas intactas. Esta sustancia fue llamada factor liberador de corticotropina o CRF por su capacidad para estimular la secreción de ACTH. A pesar de que CRF fue el primer factor liberador hipotalámico en ser descubierto, su estructura no fue determinada hasta muchos años más tarde. En 1981, Spiess y cols. determinaron la estructura de CRF a partir de hipotálamo bovino, y ese mismo año, Vale y cols. aislaron, caracterizaron y sintetizaron este péptido, que consta de 41 aminoácidos (*figura 3*) y presenta homología con dos péptidos aislados en invertebrados, urotensina I y sauvagina (Fisher, 1989).

La secuencia de este péptido fue posteriormente determinada en oveja, rata, cerdo, cabra, vaca y hombre; en todos los casos este péptido contiene 41 aminoácidos y una estructura primaria similar (Rivier y Plotsky, 1986). Curiosamente, la estructura de CRF es similar en rata y humano (Fisher, 1989). Hoy en día se considera que el péptido sintetizado por Vale y cols. en 1981 es el principal factor que produce la liberador de ACTH, tanto en rata (Rivier y cols., 1982a) como en humanos (Grossman y cols., 1982). Parece ser que los dos residuos de leucina (Leu) en las posiciones 14, 15 y 37, 38, y los grupos básicos en las posiciones 16 y 35 son fundamentales para la actividad biológica de este péptido (Vale y cols., 1983a).

#### *4.1.2. Distribución y receptores*

En líneas generales, se ha detectado inmunorreactividad a CRF principalmente en el hipotálamo de rata (NPV y zona externa de la EM; Bloom y cols., 1982) y en áreas del sistema límbico, concretamente en estructuras implicadas en la regulación del sistema nervioso autónomo y en regiones relacionadas con el procesamiento de la información sensorial. Además, existe CRF en el telencéfalo, corteza, núcleo central de la amígdala, bulbo olfatorio,

algunos núcleos talámicos, sustancia nigra, sustancia gris periacueductal (SGP), locus ceruleus (LC), núcleo del tracto solitario (NTS), núcleos parabraquiales dorsal y ventral y algunos núcleos del cerebelo (Dunn y Berridge, 1990). Asimismo, se ha detectado inmunorreactividad a CRF en el lóbulo posterior de la hipófisis (Bloom y cols., 1982), y en sangre portal hipofisaria (en una concentración de  $104,9 \pm 9,7$  pmol/ml plasma, mientras que en sangre periférica esta concentración es mucho menor,  $27,5 \pm 6,8$  pmol/ml plasma; Gibbs y Vale, 1982). En humanos, se ha detectado inmunorreactividad a CRF en hipotálamo, pedúnculo hipofisario, lóbulo posterior de la hipófisis, tálamo, corteza, cerebelo, pons, médula oblongata y médula espinal. Fuera del SNC, es importante destacar la presencia de CRF en la glándula adrenal en humanos (Suda y cols., 1984).

**FIGURA 3**  
**Estructura de CRF ovino, humano y de rata**

CRF ovino

H-Ser-**Gln**-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-**Thr-Lys**-Ala-**Asp**-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-**Leu-Asp**-Ile-**Ala**-NH<sub>2</sub>

CRF humano y de rata

H-Ser-**Glu**-Glu-Pro-Pro-Ile-Ser-Leu-Asp-Leu-Thr-Phe-His-Leu-Leu-Arg-Glu-Val-Leu-Glu-Met-**Ala-Arg**-Ala-**Glu**-Gln-Leu-Ala-Gln-Gln-Ala-His-Ser-Asn-Arg-Lys-Leu-**Met-Glu**-Ile-**Ile**-NH<sub>2</sub>

*Las diferencias en la secuencia de CRF ovino y humano/rata aparecen resaltadas en negrita*

Las neuronas CRFérgicas del NPV contienen vesículas secretoras de 80-100 nm con inmunorreactividad a CRF. Las dendritas de estas células también contienen CRF. Del cuerpo celular deriva un único axón que suele ramificarse y establecer conexiones con otras neuronas CRFérgicas del NPV (Antoni, 1986a). No se conoce, sin embargo, si un axón es capaz de establecer conexiones con su propio cuerpo celular, lo que explicaría que CRF regule su propia biosíntesis, como han sugerido Ono y cols. (1985a). Los axones de estas neuronas forman conexiones con neuronas magnocelulares del NPV (Liposits y cols., 1985) y del NSO (Shioda y cols., 1985). Por último, distintos estudios sugieren que los receptores de ACTH podrían estar localizados en neuronas hipofisiotrópicas CRFérgicas, aunque se desconoce si están implicados en el circuito de retroalimentación corta que regula la secreción de CRF (Antoni, 1986a).

Hasta el momento se han descrito dos tipos de receptores para CRF: CRF-1 y CRF-2. Ambos tienen una estructura bastante similar, presentando una homología del 70%, y pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteína G, con siete dominios transmembrana (Giguère y cols., 1982; Aguilera y cols., 1983; Stenzel y cols., 1995). El receptor CRF-1 se expresa principalmente en cerebro e hipófisis (Chen y cols., 1993), mientras que CRF-2 se localiza además en tejido periférico, concretamente en músculo esquelético y

corazón (Kishimoto y cols., 1995). Recientemente se ha descrito tanto en rata como en humanos que el receptor CRF-2 presenta dos subtipos, CRF-2<sub>α</sub> y CRF-2<sub>β</sub>, distribuidos de forma diferente, ya que mientras el ARNm del receptor CRF-2<sub>α</sub> se encuentra exclusivamente en cerebro, el ARNm del receptor CRF-2<sub>β</sub> se localiza tanto en cerebro como en tejido periférico, concretamente en músculo esquelético y corazón (Lovenberg y cols., 1995). Además, en humanos se ha identificado un tercer subtipo de receptor CRF-2 en cerebro, al que se ha denominado CRF-2<sub>γ</sub> (Kostich y cols., 1998).

En cerebro, la distribución de receptores de CRF coincide en líneas generales con la distribución de inmunorreactividad a CRF (De Souza y cols., 1985), y su ARNm se encuentra distribuido en estructuras límbicas, corticales e hipocampales, en hipotálamo (incluyendo el NPV y la EM) y en estructuras del tallo cerebral relacionadas con sistemas auditivos, viscerales, somáticos y vestibulares, además de estar presente en distintos núcleos cerebelares (Potter y cols., 1994). Asimismo existen receptores de CRF en hipófisis (De Souza y cols., 1984). Fuera del SNC, hay que destacar la presencia de receptores de CRF en la médula adrenal (Dave y cols., 1985), además de ganglios simpáticos, estómago, páncreas y bazo (Udelsman y cols., 1986). En tejido cerebral y en hipófisis la unión de CRF a su receptor activa la adenilato ciclasa (Aguilera y cols., 1986; Chen y cols., 1986; Udelsman y cols., 1986), y en el caso de la hipófisis, este hecho contribuye a la regulación de la liberación de ACTH (Giguère y cols., 1982). Por otra parte, parece que el receptor de CRF presenta una regulación diferencial en cerebro e hipófisis, ya que tanto la adrenalectomía como la administración de corticosterona en ratas disminuye la densidad de receptores en hipófisis, mientras que los receptores cerebrales no se alteran (Wynn y cols., 1985; Hauger y cols., 1987).

#### *4.1.3. Regulación de la secreción de CRF en el núcleo paraventricular*

##### *a) Regulación por catecolaminas*

Se considera que la NA inhibe la liberación de CRF a través de un mecanismo  $\alpha$ -adrenérgico (Jones y Hillhouse, 1977), al igual que la adrenalina (Roth y cols., 1981; Mezey y cols., 1984). Así se ha descrito que la activación de receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos en el NPV induce la secreción de CRF y que las catecolaminas activan neuronas que contienen CRF y AVP, pero no las que contienen sólo CRF (Al-Damluji y cols., 1987a y b, 1990). Contrariamente a este hecho se ha demostrado la existencia de un control presináptico mediado por receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos del NPV y el mecanismo por el cual la activación de estos receptores inhibe la liberación de CRF (Ganong y cols., 1976). Por ello, existe una gran controversia sobre el papel que juegan las catecolaminas en la regulación de la secreción de CRF.

Por el contrario, si existe un consenso general sobre el papel minoritario de la DA en la regulación de la liberación de CRF (Fehm y cols., 1980).

##### *b) Regulación por serotonina (5-HT)*

El NPV recibe aferencias serotoninérgicas de los núcleos del rafe (Sawchenko y cols., 1983). La activación de receptores de serotonina 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> aumenta la secreción de CRF

en el hipotálamo (Gibbs y Vale, 1983; Nakagami y cols., 1986; Spinedi y Gaillard, 1991). Además, la 5-HT facilita la liberación de CRF bioactivo a partir de tejido hipotalámico, tanto por activación directa de neuronas hipotalámicas (Buckingham y Hodges, 1979) como por activación de vías colinérgicas que confluyen en esta región (Jones y Hillhouse, 1977).

c) Regulación por ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA)

Meister y cols. demostraron en 1988 la presencia de neuronas GABAérgicas en el NPV. La activación de receptores de GABA inhibe tanto la secreción portal de CRF (Plotsky y cols., 1987) como la elevación de corticosterona inducida por estrés (Makara y Stark, 1974; Plotsky y cols., 1987). Además, GABA inhibe la liberación de CRF bioactivo a partir de hipotálamo aislado *in vitro* (Jones y Hillhouse, 1977; Buckingham y Hodges, 1979). Todos estos datos sugieren la función inhibitoria que tiene el GABA sobre la liberación de CRF.

d) Regulación por otros neurotransmisores y neuropéptidos

Existen datos en la literatura que indican como otros neurotransmisores o neuropéptidos podrían intervenir en la modulación de la secreción de CRF en el NPV. Por ejemplo, la acetilcolina (ACh) induce la liberación de CRF tanto *in vitro* (Suda y cols., 1987) como *in vivo* (Plotsky y cols., 1987) y eleva los niveles de CRF en sangre portal hipofisaria (Rivier y Plotsky, 1986). El factor atrial natriurético y la sustancia P poseen efecto inhibitorio, mientras que angiotensina II actuaría como estimulante (Antoni, 1993; Larsen y cols., 1993). CCK-8 coexiste con CRF en neuronas parvocelulares del NPV (Mezey y cols., 1985 y 1986) que se proyectan a la zona externa de la EM (Swanson y cols., 1980; Kiss y cols., 1984). Por último, se ha encontrado que otros péptidos, como  $\beta$ -endorfina y AVP disminuyen la secreción de CRF en sangre portal, efecto que es bloqueado por antagonistas opioides y del receptor de vasopresina (Rivier y Plotsky, 1986).

4.1.4. Efectos endocrinos

Aunque existen distintos factores con capacidad de inducir la liberación de ACTH, se considera que el factor liberador de corticotropina caracterizado por Vale y cols. en 1981 es el más potente secretagogo de ACTH conocido hasta el momento (Rivier y Plotsky, 1986). Distintos estudios realizados tanto con anticuerpos anti-CRF como con antagonistas de su receptor han demostrado que este péptido es el principal factor que contribuye a la elevación de ACTH en animales sometidos a estrés; así se ha observado que la inmunoneutralización de CRF endógeno mediante administración central (Ono y cols., 1985b) y sistémica (Rivier y cols., 1982b) de anticuerpo anti-CRF es capaz de atenuar la elevación de ACTH plasmático producido tras someter a los animales a estrés; este mismo efecto se observó tras la administración intravenosa (*iv*) del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (Rivier y cols., 1984b), y del recientemente sintetizado CP-154,526 (Schulz y cols., 1996).

CRF es capaz de activar el eje HHA tanto tras administración central como periférica. Lo que no está claro es si este efecto activador se produce por difusión de CRF desde los ventrículos laterales hacia la periferia, o por acción directa sobre el SNC. Por un lado se ha

observado que CRF a altas dosis aumenta la secreción de corticosterona plasmática en ratas tratadas con dexametasona, lo que sugiere un efecto directo de CRF sobre la glándula adrenal (De Souza y Van Loon, 1984). Por otro lado, y de acuerdo con Ono y cols. (1985a), existe un circuito de retroalimentación positiva ultracorto para CRF, de forma que la administración intracerebroventricular (icv) de CRF estimula la liberación de CRF endógeno. Este mecanismo podría explicar la activación del eje HHA tras administración central de CRF.

Además de su efecto sobre la secreción de ACTH, CRF interviene en la regulación de otras hormonas hipofisarias. Así, la administración central de CRF inhibe la secreción de hormona luteinizante (LH; Rivier y Vale, 1984a; Taya y Sasamoto, 1989) y hormona de crecimiento (GH; Rivier y Vale, 1984b), pero no la liberación de hormona estimulante del folículo (FSH; Rivier y Vale, 1984a; Taya y Sasamoto, 1989), tirotropina (TSH; Ono y cols., 1984), o PRL (Taya y Sasamoto, 1989). Sin embargo, la administración iv de CRF en rata no modifica la secreción de LH (Rivier y Vale, 1984a) y GH (Rivier y Vale, 1984b; Katakami y cols., 1985).

#### 4.1.5. Interacción entre CRF y otros neurotransmisores

##### a) Interacción con catecolaminas

Se ha observado que CRF incrementa el metabolismo de DA y NA en ratas, pero dependiendo de la dosis administrada y la vía de administración. Kalivas y cols. (1987) detectaron aumentos de ácido 3,4 dihidroxifenilacético (DOPAC) y ácido homovanílico (HVA) en la corteza prefrontal, estriado y núcleo accumbens (ACC) tras la administración icv de altas dosis de CRF. Sin embargo, la administración de CRF en el área tegmental ventral (ATV) disminuyó las concentraciones de estos dos metabolitos en la corteza prefrontal. Por otro lado, Butler y cols. (1990) encontraron que la administración de CRF en el LC aumenta las concentraciones del metabolito de NA 3,4 dihidroxifeniletilenglicol (DHPG) en la amígdala y el hipotálamo posterior.

Es un hecho conocido que en procesos de estrés se produce liberación de CRF (Rivier y Plotsky, 1986) y se activan los sistemas catecolaminérgicos (Dunn y Kramarcy, 1984). Por otra parte, existen neuronas noradrenérgicas (Cunningham y Sawchenko, 1988) y dopaminérgicas (Liposits y Paull, 1989) en el NPV. De acuerdo con estas observaciones, y con el hecho de que la NA interviene en la regulación de la liberación de CRF (Dunn y Berridge, 1990), distintos estudios sugirieron que en procesos de estrés los terminales noradrenérgicos del NPV estimulan la liberación de CRF a través del receptor  $\alpha_1$  adrenérgico (Al-Danjuli y cols., 1987a y b; Plotsky, 1987). Todo ello lleva a la conclusión de que CRF puede activar y ser activado por terminales noradrenérgicos.

##### b) Interacción con serotonina

La administración icv de CRF no altera el metabolismo de 5-HT en rata (Van Loon y cols., 1982; Dunn y Berridge, 1987). Sin embargo, la administración central de dosis altas de CRF elevó las concentraciones del metabolito de 5-HT ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en

líquido cerebroespinal en palomas (Barrett y cols., 1989) y activó el enzima triptófano hidroxilasa en ratas (Singh y cols., 1989), aunque su significado fisiológico no queda claro debido a las dosis tan elevadas utilizadas.

#### c) Interacción con GABA

El hecho de que las benzodiazepinas sean capaces de influenciar la respuesta que produce CRF en distintos tests de ansiedad sugiere una interacción entre CRF y los sistemas GABAérgicos, aunque no se ha descrito hasta el momento la posible interacción entre CRF y receptores de benzodiazepinas, o entre receptores de CRF y benzodiazepinas (Dunn y Berridge, 1990). Sin embargo, Sirinathsinghji y Heavens (1989) encontraron que la administración de CRF en estriado y globo pálido estimula la liberación de GABA *in vivo*.

#### d) Interacción con opioides endógenos

Se ha demostrado que existe colocalización de encefalina y CRF en el NPV, área medial preóptica, núcleo de la estría terminalis, núcleo periventricular del hipotálamo (NPe), áreas hipotalámicas dorsales y laterales y núcleo subincertal (Sakanaka y cols., 1989). Además, existen conexiones entre neuronas que contienen ACTH y  $\beta$ -endorfina y neuronas con inmunorreactividad a CRF en el NPV y en el núcleo de la estría terminalis (Hornby y Piekut, 1989). Por otro lado, CRF es capaz de liberar metionina-encefalina (met-enk) y dinorfina tanto *in vivo* como *in vitro* (Sirinathsinghji y cols., 1989).

La implicación de los opioides endógenos en respuestas fisiológicas o comportamentales se determina normalmente utilizando antagonistas como naloxona o naltrexona, o anticuerpos para los distintos opioides endógenos. La utilización de estas herramientas farmacológicas ha permitido confirmar la implicación de los opioides endógenos en los efectos provocados por la administración de CRF. Así se ha observado que la naloxona incrementa los niveles plasmáticos de ACTH, cortisol y aldosterona ya elevados por la administración iv de CRF en humanos (Conaglen y cols., 1985). Además, los opioides endógenos están implicados en otras respuestas endocrinas producidas por CRF: así se ha observado que la naloxona revierte o atenúa el efecto inhibitorio de CRF sobre la secreción de LH (Almeida y cols., 1988) y FSH (Barbarino y cols., 1989) y el efecto activador de CRF sobre la secreción de PRL (Vanvugt y cols., 1989).

#### 4.1.6. CRF y estrés

La administración de CRF produce un gran número de cambios endocrinos, neuroquímicos y comportamentales similares a los producidos en procesos de estrés (Gold y cols., 1985; Koob y Bloom, 1985), como la activación del eje HHA y del sistema nervioso simpático, y las modificaciones en catecolaminas cerebrales (Axelrod y Reisine, 1984; Dunn y Kramarcy, 1984). Sin embargo, estos resultados podrían ser interpretados de otra forma e hipotetizarse que la administración de CRF representa un estímulo estresante y que dispara todas estas respuestas. Pero la capacidad de antagonistas de CRF y del antisuero anti-CRF para bloquear respuestas endocrinas y fisiológicas producidas por estrés demuestra lo

contrario. Así, la administración icv del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF bloquea el aumento de ACTH y adrenalina, y la disminución de GH y LH producida por estrés (Rivier y cols., 1982b; Nakane y cols., 1985; Rivier y Vale 1985a).

Por otro lado, es bien sabido que en procesos de estrés, la activación del sistema noradrenérgico representa el principal mecanismo responsable de la liberación de CRF desde neuronas del NPV, posiblemente a través del receptor  $\alpha_1$ -adrenérgico, aunque es posible que estén implicados otros sistemas de neurotransmisión. Es decir, que en procesos de estrés, la respuesta inicial consiste en la activación de los sistemas cerebrales noradrenérgicos que a su vez aumentan la secreción de CRF y activan el sistema nervioso autónomo, quizás a través de neuronas originadas en el NPV. Alternativamente, la secreción de CRF podría estimular directamente el sistema nervioso autónomo y la médula adrenal. De este modo puede explicarse la activación conjunta del sistema de CRF y sistemas catecolaminérgicos (Dunn y Berridge, 1990).

#### 4.2. Corticotropina o ACTH

ACTH es una hormona peptídica de 39 aminoácidos (*figura 4*) que se sintetiza en neuronas hipotalámicas y células de adenohipófisis llamadas corticotrofos, de apariencia estrellada, con prolongaciones de 50-100  $\mu$ M de longitud (Antoni, 1986a), aunque en suspensión presentan forma redondeada. Este hecho está relacionado con cambios en la organización del citoesqueleto (Ben-Ze'ev A, 1985).

**FIGURA 4**  
**Estructura del ACTH**

---

---

ACTH humana

H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-**Arg**-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-**Gly**-Ala-Glu-**Asp**-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-NH<sub>2</sub>

ACTH de rata

H-Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-**Ala**-Trp-Gly-Lys-Pro-Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tyr-Pro-Asn-**Val**-Ala-Glu-**Asn**-Glu-Ser-Ala-Glu-Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe-NH<sub>2</sub>

---

---

*Las diferencias en la secuencia de ACTH humano y de rata aparecen resaltadas en negrita*

##### 4.2.1. Receptores de ACTH

El receptor de ACTH está formado por 297 aminoácidos y está acoplado a proteína G. Curiosamente es el receptor más pequeño de este tipo conocido hasta el momento (Allolio y Reincke, 1997). Tanto este receptor como su expresión génica están regulados a la alta por ACTH (Morita y cols., 1995; Allolio y Reincke, 1997).

Los receptores de ACTH se encuentran en la membrana plasmática de las células adrenocorticales, tanto en la zona glomerulosa (Gallo-Payet y Escher., 1985) como en las zonas fasciculata y reticularis, y es en estas últimas regiones donde la unión de ACTH a su receptor conduce a la regulación de la síntesis de glucocorticoides y al mantenimiento de la capacidad esteroidogénica (Ganong y cols., 1974; Ramachandran y cols., 1987).

La unión de ACTH a su receptor activa la adenilato ciclasa, lo que incrementa los niveles intracelulares de adenosin monofosfato cíclico (AMPc). Como consecuencia de esta elevación, la célula lleva a cabo su función fisiológica, es decir, se inducen enzimas esteroidogénicas a través de la acción de una proteína-quinasa dependiente de AMPc (Ramachandran y cols., 1987).

Por otro lado se ha estudiado la posible implicación del calcio en la síntesis de esteroides inducida por ACTH, y se ha observado que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es esencial para la interacción de ACTH con su receptor y para su ocupación continuada. Una vez que esta unión se lleva a cabo, ACTH induce la síntesis de corticosterona, que puede realizarse sin la presencia de  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular. Es decir, que el  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular es esencial para facilitar la unión de ACTH a su receptor, pero no para inducir la síntesis de corticosterona, debido quizás a que este ión mantiene a la hormona en una conformación favorable que permite la interacción con su receptor (Ramachandran y cols., 1987).

#### 4.2.2. Síntesis

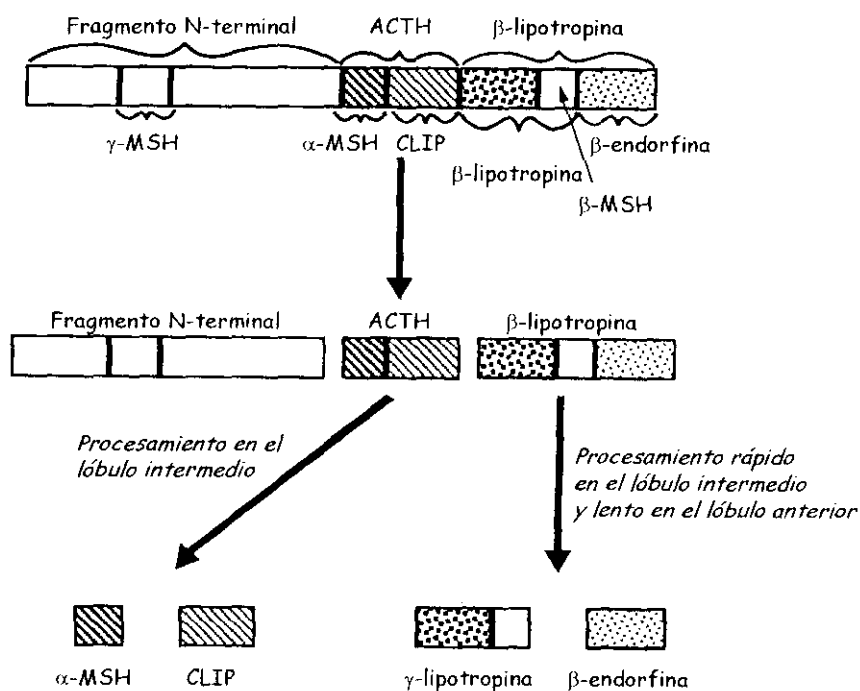
La síntesis de ACTH comienza en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso a partir de una pre-prohormona. Esta pre-prohormona se almacena en vesículas de transporte que se fusionan con el aparato de Golgi, donde por acción de enzimas proteolíticos se transformará en una prohormona llamada proopiomelanocortina (POMC). POMC se almacena en gránulos secretores, donde dependiendo del procesamiento post-traducciona que experimente dará lugar a productos distintos (figura 5).

El procesamiento post-traducciona de POMC es específico de la región hipotalámica o hipofisaria donde se produzca y depende exclusivamente del conjunto de enzimas que intervienen en el proceso. De esta forma, a pesar de que tanto el lóbulo anterior como el intermedio expresan POMC, dependiendo de donde se procese se formarán productos distintos: ACTH y  $\beta$ -lipotropina ( $\beta$ -LPH) en el lóbulo anterior, y hormona estimulante del melanocito  $\alpha$  y  $\beta$  ( $\alpha$  y  $\beta$ -MSH), CLIP ("corticotropin-like intermediate lobe peptide" o péptido del lóbulo intermedio análogo a la corticotropina) y  $\beta$ -endorfina en el lóbulo intermedio. Además, POMC puede sufrir otras modificaciones post-traduccionales, como fosforilación, sulfatación, glicosilación y acetilación; de hecho, la acetilación N-terminal de  $\beta$ -endorfina elimina su actividad opioide. En el hipotálamo destaca la presencia de POMC en el ARC, donde este péptido se procesa de modo similar que en el lóbulo intermedio, originando como producto final principalmente  $\beta$ -endorfina y  $\alpha$ -MSH; sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre en el lóbulo intermedio de la hipófisis, la mayor parte de  $\beta$ -endorfina existente en el ARC no se acetila, conservando por tanto su actividad opioide (Lynch y Snyder, 1986).

4.2.3. Almacenamiento

ACTH se almacena en gránulos secretores en el aparato de Golgi, como se ha mencionado anteriormente (Alberts y cols., 1989). Estos gránulos tienen un gran número de funciones: a) sirven para el transporte y el almacenamiento de hormonas; b) en muchos casos, la síntesis hormonal se completa dentro de estos gránulos gracias a la acción de distintas enzimas, que transforman la prohormona en hormona; c) evitan la degradación de la hormona; d) el almacenamiento de hormonas en estos gránulos ayuda a regular su síntesis mediante retroalimentación negativa; e) facilitan la liberación de la hormona al torrente sanguíneo en forma de "pulsos". En las células neurosecretoras, estos gránulos transportan la hormona desde el cuerpo celular hasta la terminación nerviosa del axón, desde el cual se liberan a la circulación sanguínea; f) los gránulos secretores pueden rellenarse con péptidos recaptados al interior de la terminación nerviosa por endocitosis, para ser reciclados o metabolizados posteriormente, aunque esto no es tan habitual como en las neuronas monoaminérgicas (Brown, 1994).

**FIGURA 5**  
**Procesamiento de POMC en los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis**



4.2.4. Liberación

La liberación de ACTH a partir de los corticotrofos de la adenohipófisis se produce cuando la célula se activa por un estímulo eléctrico, neuroquímico u hormonal. Esta

estimulación produce un cambio en la permeabilidad de la membrana celular, lo que produce la liberación de la hormona al torrente sanguíneo al fusionarse los gránulos secretores a la membrana celular por exocitosis. El ión  $Ca^{2+}$  tiene una función primordial en este proceso, ya que es imprescindible para la fusión del gránulo secretor a la membrana plasmática y por tanto para el proceso de exocitosis (Brown, 1994), y el aumento de su concentración intracelular proviene tanto del líquido extracelular como de los gránulos del retículo endoplásmico rugoso. Como consecuencia de la despolarización de la célula, se produce la apertura de canales de calcio voltaje-dependientes, lo que permite la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula (Vander y cols., 1994).

ACTH, al igual que el resto de hormonas hipofisarias, se libera al torrente sanguíneo en pulsos. A medida que un grupo de gránulos secretores se fusiona con la membrana celular, una cierta cantidad de hormona se libera al torrente sanguíneo. El nivel de hormona circulante aumenta por tanto de forma brusca para disminuir posteriormente a medida que la hormona se degrada. El proceso se repite de nuevo, elevándose el nivel de hormona circulante de nuevo. Este tipo de secreción hormonal en pulsos permite que se obtengan niveles hormonales constantes en periodos largos de tiempo (por ejemplo, en 24 horas) mientras que si se toman muestras de sangre a distintos tiempos durante periodos cortos (por ejemplo, una hora), los niveles hormonales sufren grandes variaciones. Por otro lado, este mecanismo evita la regulación a la baja y la desensibilización que sufrirían los receptores de las células diana si la liberación hormonal fuera constante (Brown, 1994).

#### Regulación de la secreción de ACTH en la hipófisis

La hormona que induce de forma más potente la liberación de ACTH es CRF (Rivier y Vale, 1983a y b; Vale y cols., 1983a y b). El resto de las hormonas que inducen la secreción de ACTH (oxitocina, AVP) y las catecolaminas, lo hacen de forma menos potente, pero administradas junto con CRF, elevan significativamente la secreción de ACTH producida por la sola administración de CRF (Rivier y Vale, 1983b; Vale y cols., 1983b).

En función del tipo de estímulo se activa un tipo u otro de neuronas del NPV que contienen los distintos secretagogos de ACTH. Por tanto, la secreción de ACTH se induce por la liberación de uno o más secretagogos a la EM hipotalámica (Plotsky y cols., 1985; Whitnall, 1989). No obstante, la presencia de niveles basales de CRF en la EM es necesaria para que tenga lugar la liberación de ACTH inducida por el resto de los secretagogos (Plotsky y cols., 1985; Rivier y Vale, 1983a y b).

#### a) Regulación por CRF

CRF actúa sobre los corticotrofos de la adenohipófisis, donde, además de aumentar la liberación de ACTH y de otros péptidos derivados de POMC (Rivier y Plotsky, 1986), estimula la síntesis del propio POMC y de su ARNm (Bruhn y cols., 1984).

Se han identificado receptores de CRF en la hipófisis anterior (De Souza y cols., 1984). Este receptor está acoplado a proteína  $G_s$ , y la unión de CRF a su receptor activa adenilato

ciclasa a través de un mecanismo que requiere  $Mg^{2+}$  y guanosin trifosfato (GTP; Aguilera y cols., 1983; Perrin y cols., 1986), lo que eleva los niveles intracelulares de AMPc y aumenta la actividad de la(s) proteína-quinasa(s) dependientes de AMPc (Aguilera y cols., 1983). Como consecuencia de este proceso, se produce la entrada al interior de la célula de  $Ca^{2+}$  extracelular a través de canales voltaje dependientes tipo L y T (Childs y cols., 1987; Guild y Reisine, 1987), hecho que finalmente produce la depleción de las vesículas que almacenan ACTH. La presencia de  $Ca^{2+}$  extracelular es fundamental para que CRF produzca liberación de ACTH (Vale y cols. 1981; Won y cols., 1990a).

#### b) Regulación por arginina-vasopresina

AVP y CRF actúan de forma sinérgica para estimular la secreción de ACTH, tanto en animal de experimentación como en humanos (Yates y cols., 1971; Orth y cols., 1985). Por lo general, AVP aumenta el efecto de CRF sobre la secreción de ACTH unas 2 o 3 veces (Antoni, 1986a).

AVP regula la secreción de ACTH actuando sobre un receptor situado en los corticotrofos con propiedades similares al receptor de AVP tipo  $V_1$  (Antoni, 1986a). Como resultado, se activa la cascada de segundos mensajeros acoplada a proteína-quinasa C (PKC), lo que eleva el inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>; Raymond y cols., 1985; Todd y Lightman, 1987; Won y cols., 1990b), estimulando la liberación de ACTH. Es decir, AVP regula la secreción de ACTH a través de una vía diferente a la de CRF, que en este caso produce acumulación de AMPc. De esta forma se explica el efecto aditivo de AVP sobre la secreción de ACTH inducida por CRF.

#### c) Regulación por oxitocina

Se ha descrito que oxitocina, al igual que AVP, es capaz de aumentar la secreción de ACTH inducida por CRF, tanto *in vitro* (Antoni y cols., 1983; Gibbs y cols., 1984) como *in vivo* (Rivier y Vale, 1985b). Sin embargo, AVP y oxitocina no presentan un efecto aditivo sobre la secreción de ACTH, por lo que es probable que utilicen el mismo mecanismo intracelular (Gibbs y cols., 1984). Aunque se ha descrito que este efecto podría estar mediado por receptores de oxitocina en adenohipófisis (Antoni, 1986b), Antoni (1989) ha propuesto que el efecto de la oxitocina sobre la liberación de ACTH podría estar mediado por los receptores  $V_3$  de AVP.

Por otro lado, el aumento de ACTH producido por oxitocina se bloquea mediante inmunoneutralización con anticuerpos anti-CRF. Este resultado sugiere que este secretagogo estimula la liberación de ACTH *in vivo* interactuando con CRF endógeno (Rivier y Vale, 1985b).

#### d) Regulación por adrenalina y noradrenalina

Se ha descrito que tanto adrenalina como NA, a través de los receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos (Giguère y cols., 1981), aumentan la liberación de ACTH en cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata (Vale y Rivier, 1977; Giguère y cols., 1981). Sin embargo, en disociados de adenohipófisis se observa una respuesta mixta: la adrenalina aumenta de

forma marcada la liberación de ACTH, pero dado que el isoproterenol, agonista  $\beta$ -adrenérgico, es también capaz de aumentarla, se considera que en este caso también existe un componente  $\beta$ -adrenérgico (Perkins y cols., 1985).

Mientras que algunos autores han propuesto que en la rata los agentes  $\beta$ -adrenérgicos aumentan la liberación de ACTH actuando a nivel del SNC (Tilders y cols., 1985), otros autores han sugerido que estos compuestos aumentan la secreción de ACTH actuando directamente sobre los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos de la hipófisis (Mezey y cols., 1983), lo que sugiere que los agentes  $\beta$ -adrenérgicos aumentan la liberación de ACTH actuando tanto a nivel central como hipofisario.

Por último, se ha descrito que en humanos la administración de agentes noradrenérgicos aumenta la liberación de ACTH por un mecanismo  $\alpha$ -adrenérgico; el lugar de acción en este caso parece ser el cerebro (Al-Damluji y cols., 1987a y b).

#### e) Regulación por serotonina

La administración central de 5-HT estimula la liberación de ACTH. Este efecto está mediado a través de receptores  $5HT_{1A}$ , ya que la administración de antagonistas de este receptor bloquea el aumento de la secreción de ACTH inducido por 5-HT (Kageyama y cols., 1998).

#### f) Regulación por otros factores

Angiotensina II se ha identificado como secretagogo de ACTH en cultivos primarios de células hipofisarias y en disociados de adenohipófisis (Sobel y Vagnucci, 1982). Además, angiotensina II y CRF tienen un efecto sinérgico sobre la secreción de ACTH (Abou Samra y cols., 1986).

Asimismo, CCK-8 presenta un efecto aditivo al producido por CRF sobre la liberación de ACTH, lo que sugiere que su efecto no está mediado por AMPc y que ambos péptidos elevan la secreción de ACTH actuando a través de distintas vías de segundos mensajeros (Reisine y Jensen, 1986).

El péptido histidina-isoleucina (PHI) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) aumentan la liberación de ACTH a altas dosis, por un mecanismo mediado por AMPc (Tilders y cols., 1983, Westendorf y cols., 1983).

Por último, existen otros factores, como el factor natriurético atrial (Horváth y cols., 1986) y el GABA (Anderson y Mitchell, 1986) que también son capaces de estimular la liberación de ACTH.

#### 4.2.5. Metabolismo y excreción

ACTH, al ser una hormona peptídica, y por tanto hidrosoluble, se transporta a través

de la circulación sanguínea disuelta en el plasma y se degrada principalmente en sangre, hígado y riñón, por acción de distintas enzimas, dando lugar a metabolitos que se excretan por orina o heces. Su vida media es corta (minutos a horas) debido al metabolismo que sufre por acción de peptidasas plasmáticas (Brown, 1994).

### 4.3. Corticosterona

#### 4.3.1. Receptores para glucocorticoides en el sistema nervioso central

##### a) Tipos de receptores y mecanismo de acción

Mc. Ewen y cols. (1986) fueron los primeros en demostrar la existencia de receptores para glucocorticoides en el cerebro. Estos receptores son intracelulares, y se encuentran tanto en el citoplasma como en el núcleo celular. Esto es debido a que los glucocorticoides son moléculas lipofílicas que en su forma libre (es decir, cuando no están unidos a proteínas plasmáticas) pueden difundir fácilmente a través de la membrana celular. Existe un equilibrio entre los receptores libres y unidos a glucocorticoides. La unión de los glucocorticoides a su receptor da lugar al complejo hormona-receptor. Es entonces cuando se activa o se inhibe la síntesis de ARNm por acción de la ARN polimerasa. El ARNm formado sale al citoplasma, y una vez en los ribosomas se lleva a cabo la síntesis de proteínas, que será lo que realmente modifique la función celular (Miesfeld, 1990; Munck y cols., 1990).

Existen dos tipos de receptores para glucocorticoides en cerebro: el receptor tipo I o de mineralocorticoides (RM), y el receptor tipo II o de glucocorticoides (RG). Al receptor tipo I se unen tanto los mineralocorticoides como los glucocorticoides, mientras que sólo los glucocorticoides se unen al receptor tipo II (De Kloet y Reul, 1987; De Kloet y cols., 1987). La existencia de estos dos receptores en el cerebro es fundamental, ya que aquí los glucocorticoides cumplen dos funciones importantes: a bajas concentraciones regulan el ritmo circadiano, mientras que a altas concentraciones regulan la respuesta al estrés. El receptor tipo I, debido a su alta afinidad por glucocorticoides, responde a bajas concentraciones de hormona circulante, mientras que los receptores de tipo II, que tienen baja afinidad por los glucocorticoides, responden a altos niveles de hormona, como los existentes en procesos de estrés (Brown, 1994).

Algunos autores sugieren que existen receptores de tipo I con alta afinidad por glucocorticoides (y baja afinidad por aldosterona) y receptores tipo I con baja afinidad por glucocorticoides (y alta afinidad por aldosterona; Brown, 1994). Otros estudios sugieren que la afinidad relativa del receptor de tipo I por glucocorticoides y aldosterona está determinada por los niveles circulantes de glucocorticoides y de transcortina (Mc Ewen y cols., 1986; Mc Ewen, 1988). Sin embargo, estudios más recientes proponen que el mecanismo que determina la afinidad en el cerebro de los receptores tipo I por glucocorticoides o aldosterona es la presencia o ausencia del enzima 11- $\beta$ -hidroxiesteroide-deshidrogenasa, que inactiva los glucocorticoides, pero no la aldosterona (Funder y cols., 1988). Se da la circunstancia de que este enzima no está presente en células de hipocampo, por lo que en esta región, tanto los glucocorticoides como la aldosterona pueden unirse a este receptor (Evans y Arriza, 1989;

Funder, 1991).

Los receptores tipo II tienen menor afinidad por los glucocorticoides que los de tipo I y se activan únicamente cuando se produce una gran elevación de los niveles de glucocorticoides en situación de estrés. De esta manera, y por retroalimentación negativa, se inhibe la activación del eje HHA (Mc Ewen y cols., 1986; Mc Ewen, 1988) y los RG protegen al organismo de su propia respuesta frente al estrés (De Kloet y cols., 1987).

Distintos estudios en la rata muestran como tanto los receptores de tipo I como los de tipo II se encuentran regulados a la baja en situación de estrés crónico, en enfermedades como la diabetes mellitus y diabetes insípida, y durante el crecimiento. Los receptores de tipo II están regulados a la baja en respuesta a niveles altos de corticosteroides, mientras que el número de receptores de tipo I puede estar también regulado por ACTH, vasopresina y otros neuropéptidos que tengan actividad en el hipocampo. Además, la densidad de receptores de tipo I es máxima por la tarde (al final del periodo de luz), cuando el eje HHA presenta su pico de máxima actividad (De Kloet y cols., 1987).

#### b) Distribución

Los receptores tipo I se localizan principalmente en hipocampo, septum lateral, giro dentado, tallo cerebral y en algunas áreas de la corteza cerebral, y no se encuentran en hipotálamo e hipófisis, donde sí hay gran abundancia de receptores tipo II (Arriza y cols., 1988). Tanto la aldosterona como los corticoides se unen de igual forma al receptor tipo I, que tiene como funciones la regulación de la secreción de CRF y ACTH, de la actividad locomotora y del ejercicio mental en condiciones normales y de fluctuación de los niveles basales de glucocorticoides (Mc Ewen, 1988). Los RM pueden también modular comportamientos influenciados por el hipocampo y el ritmo circadiano, como el ciclo sueño-vigilia, el apetito y el humor (Funder, 1991).

Los receptores de tipo II se encuentran ampliamente distribuidos en el cerebro, principalmente en hipocampo, septum, amígdala, NPV, corteza y tallo cerebral (Brown, 1994).

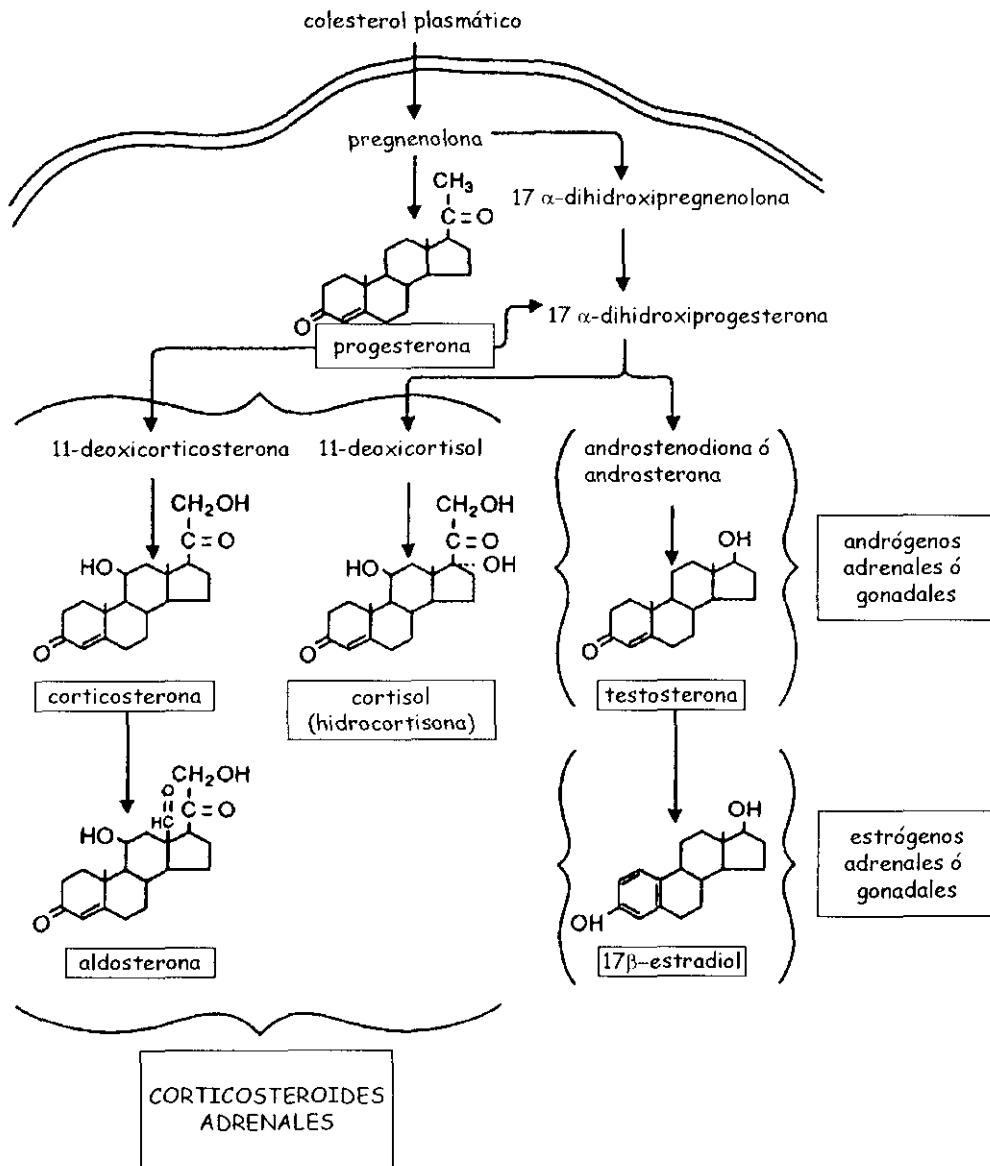
#### 4.3.2. Síntesis

El colesterol es el precursor de todas las hormonas esteroideas. Aunque las glándulas endocrinas productoras de esteroides sintetizan su propio colesterol, la fuente principal de este esteroide la constituye las lipoproteínas plasmáticas sintetizadas en el hígado y transportadas por las células a través del torrente sanguíneo hasta la corteza adrenal.

La corticosterona se sintetiza a partir del colesterol en el retículo endoplásmico liso de las células de la corteza adrenal. Las células productoras de corticosterona obtienen colesterol de la sangre y lo transforman en pregnenolona en la mitocondria del cuerpo celular. La pregnenolona se transforma en progesterona, que puede ser liberada como hormona o utilizarse en la síntesis de otros esteroides adrenales y gonadales a través de tres rutas diferentes, como se muestra en la figura 6.

En la corteza adrenal, la mayor parte de la pregnenolona se transforma en 17- $\alpha$ -hidroxipregnenolona y 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona, mientras que la progesterona se transforma en 11-deoxicorticosterona. Esta última ruta es la responsable de la producción de corticosterona en las células de la zona fasciculata de la corteza adrenal (Feder, 1981).

**FIGURA 6**  
**Síntesis de hormonas esteroideas a partir de colesterol**



#### 4.3.3. Almacenamiento

La corticosterona no se almacena en gránulos secretorios antes de ser liberada al torrente sanguíneo. Debido a que es una molécula altamente liposoluble, una vez que se sintetiza difunde a través de la membrana plasmática de la célula secretora y se incorpora al fluido intersticial y posteriormente al torrente sanguíneo (Brown, 1994).

#### 4.3.4. Liberación

La liberación de corticosterona se controla en función de su síntesis (Martin, 1985) y, al igual que el resto de hormonas esteroideas, no se almacena en las células secretoras de la corteza adrenal, sino que se libera en pulsos a partir de estas células debido a la acción del ACTH (liberado también de forma pulsátil a partir de la adenohipófisis; Brown, 1994).

#### Regulación de la secreción de corticosterona en la corteza adrenal

ACTH induce la síntesis de glucocorticoides en la zona fasciculata y reticularis de la corteza adrenal (Ganong y cols., 1974) al incrementar la disponibilidad de su precursor, el colesterol, ya que aumenta los niveles de ARNm de 3-hidroxi-3 metilglutaril-coA reductasa, enzima limitante de la síntesis de colesterol (Le Houx y cols., 1992). Además, facilita la interacción del colesterol con el citocromo P<sub>450</sub>, lo que constituye el paso fundamental de la síntesis de los glucocorticoides (Baxter y Tyrrell, 1987). Es importante destacar la importancia del ión Ca<sup>2+</sup>, ya que es esencial para garantizar la unión de ACTH a su receptor en las células adrenocorticales (Cheitlin y cols., 1985).

Existen otros agentes que inducen la síntesis y posterior secreción de glucocorticoides. Van Oers y cols. (1992) han observado que CRF induce la formación de corticosterona actuando directamente sobre la glándula adrenal. Además, se han detectado receptores para CRF en la médula adrenal de rata (Dave y cols., 1985) y de perro (Bruhn y cols., 1987). La NA también libera corticosterona actuando sobre la glándula adrenal (Ehrhart-Bornstein y cols., 1991). Por otra parte, se ha descrito que la angiotensina II es capaz de liberar pequeñas cantidades de corticosterona desde la zona glomerulosa de la corteza adrenal (Ganong y cols., 1974).

#### 4.3.5. Transporte

La corticosterona se transporta por el torrente sanguíneo unida de forma reversible a una glucoproteína transportadora específica, sintetizada en el hígado, llamada transcortina. La transcortina facilita el transporte de corticosterona ya que ésta es liposoluble, y por tanto, insoluble en el plasma, y la protege de su degradación, aumentando su vida media. A pesar de que la corticosterona se encuentra en plasma unida mayoritariamente a proteínas transportadoras, existe una pequeña proporción que se encuentra libre. La hormona libre o disuelta en plasma está en equilibrio con la hormona unida a proteína transportadora, según la reacción:

#### Hormona libre+proteína transportadora=Hormona-proteína transportadora

Para que la corticosterona se una a sus receptores en la célula diana, es necesario que se libere de la transcortina. Sólo la fracción libre es activa y susceptible de unirse a su receptor. La fracción de hormona unida a proteína transportadora es inactiva, manteniéndose como reservorio (Brown, 1994). Las proteínas transportadoras ayudan asimismo a regular los niveles de hormona libre en sangre, y protegen al organismo de una estimulación hormonal excesiva (Martin, 1985).

#### 4.3.6. Metabolismo y excreción

La corticosterona se degrada en sangre, hígado y riñón, por acción de distintas enzimas, y sus metabolitos se excretan por orina o heces. Su vida media es mayor (horas o días), debido a que su unión a la transcortina confiere mayor resistencia a ser excretada o a ser metabolizada (Brown, 1994).

## 5. El síndrome de estrés: fisiología y patofisiología

El término estrés generalmente se refiere a cualquier agente físico o estado psicológico que altere la homeostasis del organismo. Los organismos vivos responden a dichos agentes mediante una respuesta de adaptación, que se caracteriza por la inducción de una serie de modificaciones en el organismo de carácter físico y comportamental. Los cambios físicos están dirigidos principalmente hacia la obtención de energía y a la orientación del flujo sanguíneo hacia el SNC y otros órganos diana del estrés. Los cambios comportamentales implican la activación de las funciones de alerta y atención y la supresión del comportamiento alimenticio y sexual. Además se produce un aumento de la presión sanguínea, de las frecuencias cardíaca y respiratoria, de la lipólisis y de la gluconeogénesis. Todos estos cambios están dirigidos a contrarrestar la acción del estrés sobre el organismo (Stratakis y Chrousos, 1995).

### 5.1. Fisiología del estrés

La respuesta neuroendocrina al estrés se origina en el NPV y en el LC. Las neuronas parvocelulares del NPV que contienen CRF y AVP, así como las neuronas CRFérgicas de la médula y las neuronas catecolaminérgicas del LC se encargan de coordinar a nivel central el sistema del estrés, mientras que el eje HHA, y el sistema nervioso autónomo se encargan de coordinar la respuesta al estrés a nivel periférico. Por otro lado existen conexiones neurales entre neuronas CRFérgicas del NPV y neuronas noradrenérgicas del LC (Valentino y cols., 1983), además de un sistema de regulación ultracorto sobre neuronas CRFérgicas ejercido por el propio CRF, y sobre neuronas catecolaminérgicas ejercido por NA. Estas neuronas se estimulan por 5-HT y Ach, y se inhiben por glucocorticoides, GABA, ACTH y péptidos opioides (Aghajanian y Van der Maelen, 1982; Calogero y cols., 1988; Badgy y cols., 1989).

El NPV y las fibras noradrenérgicas del LC activan a su vez regiones del SNC relacionadas con el análisis de la información, la puesta en marcha de respuestas específicas

y el tono emocional. Estos sistemas son:

a) *Los sistemas dopaminérgicos mesocortical y mesolímbico*, que se activan por las fibras noradrenérgicas del LC. El primero inerva la corteza prefrontal, región relacionada con funciones cognitivas. El segundo juega un papel fundamental en los fenómenos de motivación y recompensa (Roth y cols., 1988; Deutch y cols., 1990).

b) *El complejo amígdala/hipocampo*, que se activa principalmente por vías noradrenérgicas procedentes del LC (Loughlin y cols., 1986). Esta activación es importante en la recuperación y el análisis emocional de la información relacionada con el estrés. Por otra parte, el hipocampo parece ejercer un efecto inhibitorio sobre la actividad de la amígdala y las neuronas CRFérgicas del NPV (Herman y cols., 1989).

c) *El ARC*, que se activa por neuronas CRFérgicas del NPV y a su vez emite eferencias al NPV y otras regiones cerebrales para regular la actividad de neuronas de CRF y fibras noradrenérgicas del LC. Es decir, la activación del sistema del estrés estimula la producción de POMC y péptidos sintetizados a partir de POMC en el ARC. Por otra parte, estas conexiones regulan la analgesia inducida por estrés a través de las proyecciones dirigidas desde este núcleo hipotalámico hacia el cerebro medio y la médula espinal (Nikolarakis y cols., 1986; Palkovits y Eskay, 1987).

CRF tiene un papel fundamental en la activación del eje HHA. Regula la actividad trófica de los corticotrofos (Gertz y cols., 1987), la expresión génica de POMC (Autelitano y cols., 1990) y la liberación de ACTH (Antoni, 1986a). Además existen otros factores que liberan ACTH al activarse este eje por un estímulo estresante. Estos secretagogos son AVP, oxitocina, angiotensina II, VIP y catecolaminas, además de citoquinas y mediadores lipídicos de la inflamación (Antoni, 1986a; Holmes y cols., 1986). Sin embargo, la mayoría de estos agentes de señalización dependen de la presencia de CRF para modular la activación del eje HHA.

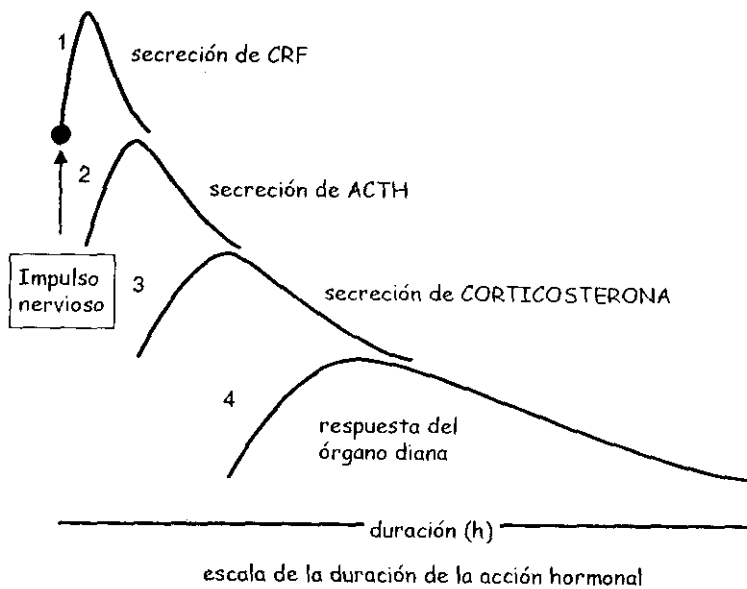
El ACTH circulante es el principal regulador de la secreción de glucocorticoides a nivel de la corteza adrenal en situaciones de estrés, pero existen otros factores sintetizados por la médula adrenal que también participan. Así, la Ach, que es el principal estímulo fisiológico de la secreción de catecolaminas en la médula adrenal, también tiene una función estimuladora de la síntesis de glucocorticoides (Hinson, 1990). Otros factores que intervienen en la regulación de la secreción de glucocorticoides a nivel de la médula adrenal son el propio CRF, NA (Ehrhart-Bornstein y cols., 1991), angiotensina II (Ganong y cols., 1974) y otros neuropéptidos como VIP, met-enk y neuropéptido Y (NPY). Los glucocorticoides son los reguladores finales del eje HHA y participan en el control de la homeostasis corporal y de la respuesta del organismo frente al estrés. Asimismo juegan un papel fundamental en la regulación de la actividad basal del eje HHA y en la finalización de la respuesta al estrés mediante un sistema de retroalimentación negativa, como se describe en el apartado 7.

El sistema nervioso autónomo simpático controla la mayoría de las respuestas rápidas que realiza el organismo frente a un estímulo estresante. De forma periférica, este sistema inerva ampliamente células de músculo liso vascular, así como el riñón, el estómago y la

médula adrenal, además de otros muchos órganos. Además de Ach, NA y adrenalina, tanto el sistema nervioso simpático como el parasimpático liberan una gran variedad de neuropéptidos (neuropéptido Y (NPY), somatostatina, galanina, encefalinas y neurotensina) así como adenosin trifosfato (ATP) y óxido nítrico (NO), durante la respuesta al estrés (Benarroch, 1994).

Al contrario que el sistema nervioso, el sistema endocrino responde de forma lenta a un estímulo externo. Por ello, el eje HHA se activa de forma lenta tras un estímulo estresante. La liberación de CRF y ACTH en respuesta a un impulso nervioso requiere entre 1 y 2 horas, mientras que la liberación de corticosterona requiere más tiempo debido a que es necesario que previamente CRF y ACTH alcancen su máxima concentración en sangre (figura 7). De la misma forma, el descenso de los niveles hormonales debido al sistema de retroalimentación negativa es también un proceso lento (Caminos-Torres y cols., 1977).

**FIGURA 7**  
**Activación del eje HHA en respuesta a un estímulo y duración de la acción hormonal**



## 5.2. Patofisiología del estrés

La respuesta al estrés es normalmente aguda y tiene una duración limitada, pero existen casos en los que esta respuesta es crónica, dando lugar a enfermedades crónicas de distinta etiología, como la anorexia, pérdida de peso, depresión, hipogonadismo, úlceras pépticas e inmunosupresión (Chrousos y Gold, 1992).

La depresión melancólica es un claro ejemplo de alteración de la respuesta al estrés. La excitación que se produce como consecuencia del estrés no es contrarrestada, sino que da lugar a hiperexcitación, ansiedad e insomnio. Por otra parte, la memoria y la atención se centran sobre todo en ideas depresivas, influenciando de esta forma la capacidad del individuo para recordar y resolver los pequeños problemas que ocurren diariamente. Además, la supresión del comportamiento alimenticio y sexual que se observa durante el estrés tampoco se contrarresta, dando lugar a anorexia, hipogonadismo y descenso de la libido, síntomas claros de la depresión melancólica. Asimismo, tanto el sistema nervioso simpático como el eje HHA permanecen activados constantemente en esta enfermedad, y existe una hipersecreción crónica de CRF, que es el principal agente desencadenante de todo el trastorno (Gold y cols., 1988a y b).

Además de la depresión melancólica, existen otros trastornos que pueden asociarse a una hipersecreción de CRF, como es el caso de la anorexia nerviosa (Gold y cols., 1986a; ataques de pánico (Roy-Byrne y cols., 1986), trastorno obsesivo-compulsivo (Insel y cols., 1982), alcoholismo crónico (Wand y cols., 1991), síndrome de abstinencia a alcohol y narcóticos (Mendelson y cols., 1988; Bardeleben y cols., 1989), malnutrición (Malozowski y cols., 1990) y síndrome premenstrual (Rabin y cols., 1990). Por el contrario, la depresión atípica y el síndrome de Cushing, caracterizados por polifagia, ganancia de peso, fatiga y exceso de peso, no están relacionados con una hipersecreción de CRF, sino con una disminución de la liberación de CRF (Gold y cols., 1986b). Asimismo, en los pacientes hipotiroideos, que suelen presentar depresión atípica, se observa un descenso en la secreción de CRF (Kamilaris y cols., 1989). Todos estos datos sugieren que existe otra forma de alteración de la respuesta al estrés, en lugar de la activación sostenida del eje HHA mencionada anteriormente, caracterizada por una reducción crónica de la secreción de CRF, lo que resulta en un descenso de la excitabilidad (Chrousos y Gold, 1992).

## **6. Actividad basal del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

La actividad basal del eje HHA está controlada por un ritmo circadiano generado por el NSQ del hipotálamo y determinado por el ciclo luz/oscuridad. El NSQ recibe aferencias del tracto retinohipotalámico (Moore y Card, 1985) y emite proyecciones hacia el distintos núcleos del hipotálamo, incluido el NPV (Berk y Finkelstein, 1981). Por ello el NSQ representa un punto de conexión entre las señales visuales procedentes del exterior y distintas funciones homeostáticas, incluido el ritmo circadiano del eje HHA.

Los niveles plasmáticos de corticosterona en la rata experimentan variaciones a lo largo del día; permanecen a concentraciones bajas (0-5  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) durante la mayor parte del periodo de luz, y dos o tres horas antes del comienzo del periodo de oscuridad estos niveles aumentan, alcanzando el nivel máximo (20  $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) al comienzo de la fase de oscuridad y disminuyendo posteriormente a lo largo de este periodo. Este ciclo también se da en la especie humana, pero de forma inversa. Las variaciones circadianas de corticosterona se deben a que las células presentan diferente sensibilidad a ACTH durante la fase AM y PM, lo que permite que frente a un mismo estímulo de ACTH exista mayor secreción en una de las fases y menor en las otras

(Dallman y cols., 1987). También existe un ciclo para ACTH, pero es menos constante y de menor amplitud que el de corticosterona (Cascio y cols., 1987). Sin embargo se ha observado una clara correlación entre los niveles de ARNm que codifica para la proteína precursora de CRF en el hipotálamo y los picos de corticosterona (Kwak y cols., 1992).

## **7. Modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en condiciones basales y situación de estrés por los glucocorticoides y receptores de glucocorticoides**

Los glucocorticoides ejercen un control negativo sobre la actividad del eje HHA en situación basal y de estrés (Keller-Wood y Dallman, 1984): así, la secreción de CRF hipotalámico y de ACTH hipofisario se inhibe cuando los niveles plasmáticos de glucocorticoides aumentan.

### **7.1. Sistemas de retroalimentación negativa**

La retroalimentación se define como una situación en la que una hormona regula la secreción de las hormonas que estimularon su liberación. El eje HHA es un sistema de retroalimentación de tercer orden, ya que hay tres glándulas implicadas, el hipotálamo, la hipófisis y la glándula adrenal (Keller-Wood y Dallman, 1984). Existen por tanto tres niveles de retroalimentación en este sistema: largo, corto y ultracorto (*figura 8*).

- a) *Retroalimentación negativa larga*: La corticosterona inhibe la liberación de CRF en el hipotálamo y de ACTH en la hipófisis.
- b) *Retroalimentación negativa corta*: ACTH inhibe la liberación de CRF en el hipotálamo
- c) *Retroalimentación negativa ultracorta*: CRF inhibe su propia liberación en el hipotálamo.

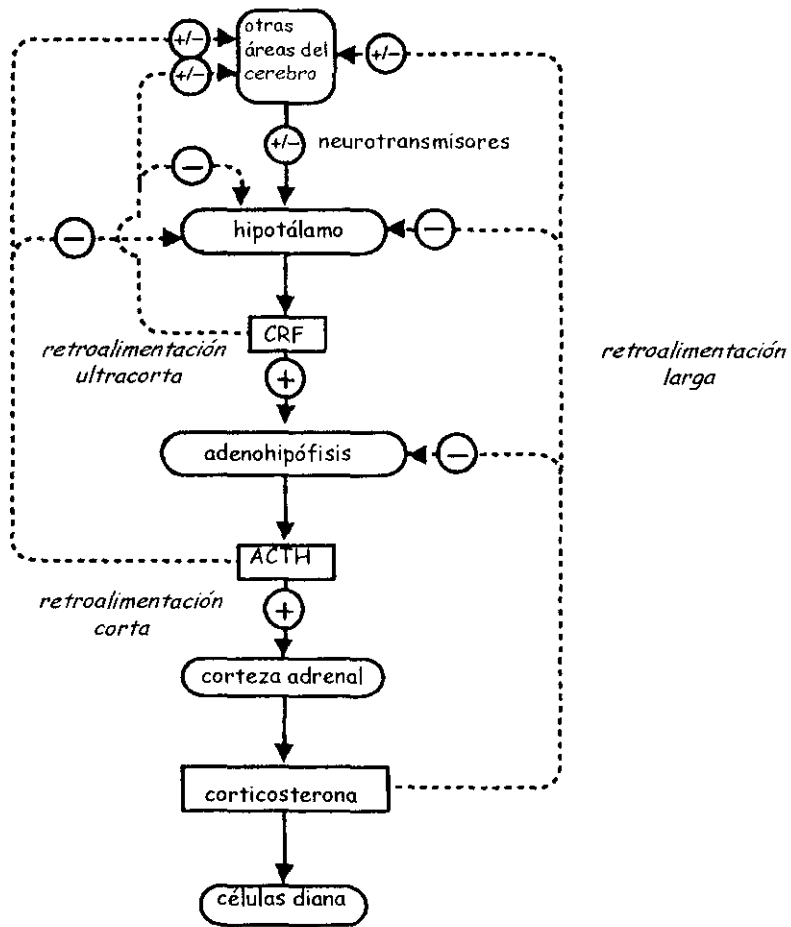
### **7.2. Modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por los glucocorticoides**

La corticosterona ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre el eje HHA tanto en fase de luz como de oscuridad. La secreción de ACTH es más sensible al efecto de retroalimentación negativa de corticosterona durante la fase PM (de máxima actividad) que durante la fase AM (de baja actividad), debido a que en este período los niveles basales de ACTH son más altos (Gaillard y cols., 1984; Bradbury y cols., 1991).

La elevación de los niveles plasmáticos de corticosterona inhibe el eje HHA. Por lo tanto, en un animal tratado con corticosterona y sometido a una situación de estrés no se observa un aumento de ACTH. Sin embargo, cuando la elevación de los niveles de corticosterona se produce por aplicación de un estímulo estresante, estos niveles altos de

corticosterona no bloquean la activación del eje cuando se somete al mismo animal a un segundo estrés entre 1 y 24 h después. Por ello puede decirse que el primer estrés “facilita” la activación del eje HHA que se produce con el segundo estrés, con lo que se contrarresta el efecto inhibitorio de corticosterona. En esto consiste el “fenómeno de facilitación” (Dallman y Jones, 1973; Dallman, 1993).

**FIGURA 8**  
**Sistema de retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**



Dallman (1993) ha expuesto una hipótesis para explicar este fenómeno de facilitación:

- 1) Un estrés agudo activa las neuronas que contienen CRF y AVP en el NPV. Durante el estrés crónico se activan fibras noradrenérgicas del LC. Al parecer, esta activación puede

estar mediada por un aumento de CRF en el LC, que proviene de las eferencias del NPV del hipotálamo.

2) Las neuronas noradrenérgicas del LC a su vez activarían las neuronas parvocelulares del NPV que contienen CRF y AVP, aumentando así la concentración de esta última hormona. Está demostrado que el estrés crónico aumenta la concentración de AVP en estas neuronas (De Goeij y cols., 1992a y b) y en las vesículas que contienen CRF y AVP en la EM (Dallman, 1993).

3) La secreción de ACTH inducida por AVP es menos sensible al control negativo de los glucocorticoides. El incremento de AVP mencionado anteriormente incrementa la relación CRF/AVP liberado a la circulación portal hipofisaria, garantizando la secreción de ACTH durante el estrés crónico, e induciendo así el fenómeno de facilitación.

### **7.3. Modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por los receptores de glucocorticoides**

Los RM regulan la actividad del eje HHA durante el periodo de baja actividad del ciclo circadiano. Durante esta fase, el 80-90% de los receptores están ocupados, mientras que los RG lo están solamente en un 10% (Reul y cols., 1987). Además, en esta fase del ciclo, la administración de un antagonista de los RM (pero no la de un antagonista de los RG) produce una elevación de corticosterona plasmática (Ratka y cols., 1989).

Sin embargo, durante el período de máxima actividad, el eje HHA está regulado tanto por los RM como por los RG. Reul y de Kloet (1985) encontraron un 90% de ocupación de los RM en el pico de esta fase, mientras que los RG se ocupan en un 70%. Tanto la administración de antagonistas de RM (Bradbury y Dallman, 1989) como de antagonistas de RG (Gaillard y cols., 1984) produce un aumento de ACTH en esta fase.

En situación de estrés, los RG son los principales mediadores del efecto de retroalimentación negativa de los glucocorticoides. En esta situación estos receptores están ocupados en una proporción de 75-80% (Meaney y cols., 1988). Sin embargo, Ratka y cols. (1989) demostraron la participación de los RM en procesos de estrés, ya que antagonistas específicos para los RG atenúan el pico de ACTH inducido por estrés.

### **7.4. Lugar de acción de los glucocorticoides en su control sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

#### *a) Adenohipófisis*

En experimentos *in vitro* se ha demostrado que tanto la corticosterona como la dexametasona modulan la secreción de ACTH en hipófisis (Sabol, 1980; Woods y cols., 1992). También se ha demostrado en estudios *in vivo* que los glucocorticoides regulan la secreción de ACTH en la hipófisis (Birnberg y cols., 1983) y que sólo bloquean la secreción de ACTH en adenohipófisis en situaciones de estrés, ya que es necesaria una concentración de

corticosterona de al menos 30 µg/dl, sólo alcanzable en estas situaciones (Levin y cols, 1988).

*b) Hipotálamo*

La dexametasona inhibe la liberación y disminuye el contenido de CRF hipotalámico (Plotsky y Vale, 1984). Asimismo, en cultivos de células hipotalámicas, se ha observado que la corticosterona inhibe la liberación de CRF actuando sobre RM y RG (Hu y cols., 1992).

*c) Estructuras límbicas*

El efecto de retroalimentación negativa de los glucocorticoides sobre la actividad basal del eje HHA sólo se ha podido demostrar de una forma clara a nivel del hipocampo. Lesiones en esta estructura o en el fórnix incrementan los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona (Fischette y cols., 1980). Asimismo, manipulaciones farmacológicas de la actividad de los receptores de glucocorticoides en el hipocampo también modifican los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona (Bradbury y Dallman, 1989).

El hipocampo también está implicado en el efecto inhibitorio de la actividad del eje HHA en situación de estrés. Animales con lesiones en el hipocampo (Sapolsky y cols., 1984) o en el fórnix (Jacobson y Sapolsky, 1991) muestran una mayor elevación de los niveles de corticosterona tras una situación de estrés que los animales no lesionados. En este caso están implicados los dos tipos de receptores de glucocorticoides (Bradbury y Dallman, 1989).

El núcleo central amigdalóide es otro de los centros límbicos relacionados con el efecto inhibitorio de los glucocorticoides (Beaulieu y cols., 1987). Asimismo, la corteza prefrontal (Diorio y cols., 1993) y las neuronas catecolaminérgicas del cerebro medio (Lachuer y cols., 1991) también están relacionadas con este efecto de los glucocorticoides.

## **II. El Factor Liberador de Gastrina (GRP)**

### **1. Descubrimiento y caracterización**

GRP es un péptido de 27 aminoácidos presente en mamíferos cuya estructura es muy similar a la bombesina (BBS), péptido aislado de piel de rana (especie *Bombina bombina*) en 1971 por Anastasi y cols (*figura 9*).

Se han aislado tres familias de péptidos análogos a BBS en anfibios: bombesinas, ranatensinas y fillolitorinas. Todas ellas se caracterizan por tener una secuencia de aminoácidos bastante similar, y en cada familia es característica la presencia de un aminoácido común cerca del extremo carboxilo terminal: Así las bombesinas tienen Leu en penúltima posición; las ranatensinas tienen fenilalanina (Phe) en esta misma posición y en las fillolitorinas es característica la serina (Ser) en antepenúltima posición. En la piel de rana, estos péptidos están localizados en glándulas mioepiteliales venenosas bajo inervación noradrenérgica, pudiendo tener una función de defensa frente a depredadores (Spindel, 1986).

**FIGURA 9**  
**Estructuras de los péptidos análogos a bombesina y ranatensina en mamíferos**

**A. Péptido Liberador de Gastrina**

	1	14	27
<u>GRP humano</u> (27 aa):	Val-Pro-Leu-Pro-Ala-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Thr-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.NH <sub>2</sub>		
<u>GRP porcino</u> (27 aa):	Ala-Pro-Val-Ser-Val-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.NH <sub>2</sub>		
<u>GRP canino</u> (27aa):	Ala-Pro-Val-Pro-Gly-Gly-Gln-Gly-Thr-Val-Leu-Asp-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.NH <sub>2</sub>		
<u>GRP en aves</u> (27aa):	Ala-Pro-Leu-Gln-Pro-Gly-Gly-Ser-Pro-Ala-Leu-Thr-Lys-Ile-Tyr-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.NH <sub>2</sub>		
<u>GRP en rata</u> (29 aa):	Ala-Pro-Val-Ser-Thr-Gly-Ala-Gly-Gly-Gly-Thr-Val-Leu-Ala-Lys-Met-Tyr-Pro-Arg-Gly-Ser-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.NH <sub>2</sub>		
<u>GRP-10</u> (10 aa):			Gly-Asn-His-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.NH <sub>2</sub>
<u>Bombesina</u> (14 aa):		p-Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-Met.NH <sub>2</sub>	

**B. Péptidos análogos a ranatensina**

	1	32
<u>Neuromedina B humana</u> (32 aa):	Ala-Pro-Leu-Ser-Trp-Asp-Leu-Pro-Glu-Pro-Arg-Ser-Arg-Ala-Ser-Lys-Ile-Arg-Val-His-Ser-Arg-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met.NH <sub>2</sub>	
<u>Neuromedina B porcina</u> (32 aa):	Ala-Pro-Leu-Ser-Trp-Asp-Leu-Pro-Glu-Pro-Arg-Ser-Arg-Ala-Gly-Lys-Ile-Arg-Val-His-Pro-Arg-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met.NH <sub>2</sub>	
<u>Neuromedina B en rata</u> (32 aa):	Thr-Pro-Phe-Ser-Trp-Asp-Leu-Pro-Glu-Pro-Arg-Ser-Arg-Ala-Ser-Lys-Ile-Arg-Val-His-Pro-Arg-Gly-Asn-Leu-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met.NH <sub>2</sub>	
<u>Ranatensina C</u> (11 aa):		pGlu-Thr-Pro-Gln-Trp-Ala-Thr-Gly-His-Phe-Met.NH <sub>2</sub>

La estructura de bombesina y ranatensina está escrita debajo de cada grupo como referencia. Los aminoácidos comunes entre los distintos péptidos aparecen marcados en color rojo. Abreviaturas: pGlu: piroglutamato; .NH<sub>2</sub>: residuo carboxilo-terminal amidado.

Los péptidos análogos a BBS son un clásico ejemplo de péptidos descubiertos en primer lugar en un órgano periférico (en este caso piel de rana) y aislados posteriormente en mamíferos. Además de su función como neurotransmisores y hormonas autocrinas, presentan un gran espectro de actividades biológicas y son de gran interés debido a su función como marcadores tumorales y factores de crecimiento celular (Cuttitta y cols., 1985).

GRP fue el primer péptido análogo a BBS aislado en mamíferos, a partir de estómago e intestino porcino (Mc Donald y cols., 1979). Posteriormente se identificó un péptido homólogo a ranatensina en mamíferos, llamado *neuromedina B* (NMB; Minamino y cols, 1983) (figura 10). GRP se denomina así por el bioensayo utilizado para su aislamiento, la liberación de gastrina, aunque éste es sólo uno de sus muchos efectos fisiológicos. BBS y GRP comparten la secuencia C-terminal, concretamente los 7 últimos aminoácidos (figura 9). Esta secuencia es la responsable de la unión al receptor y de su actividad biológica (Walsh y cols., 1979; Moody y cols., 1982). Además, la metionina (Met) C-terminal debe ser amidada para que el péptido pueda tanto ser reconocido por anticuerpos como unirse a su receptor (Knigge y cols., 1984).

GRP (1-27) se ha identificado además en el proventrículo de las aves (Mc Donald y cols., 1980), en el intestino delgado canino (Reeve y cols., 1983) y en tumores humanos pulmonares (Orloff y cols., 1984). La estructura de GRP humano se ha identificado por secuenciación de aminoácidos y por clonaje molecular (Reeve y cols., 1983; Spindel y cols., 1984). Asimismo se ha determinado la estructura de GRP de rata por clonaje molecular (Lebacq-Verheyden y cols., 1987) que difiere de GRP humano en la adición de dos aminoácidos más en el extremo amino terminal, dando lugar así a un péptido de 29 aminoácidos (Spindel, 1986; figura 9).

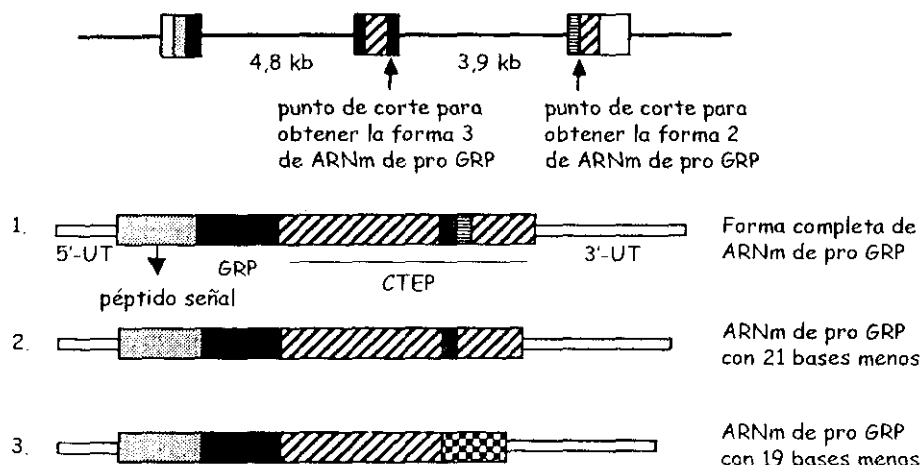
Por otra parte, se ha identificado un péptido de 10 aminoácidos correspondiente al decapeptido C-terminal de GRP (GRP-10, antes llamado *neuromedina C*) en médula espinal porcina (Minamino y cols., 1984), intestino canino pequeño (Reeve y cols., 1983) y en un tumor pulmonar humano (Spindel y cols., 1984). Se piensa que este decapeptido se origina a partir de GRP por fragmentación y se ha sugerido que puede sintetizarse *in vivo*. Tanto GRP (1-27) como GRP-10 tienen actividad biológica similar a BBS, como se deduce de estudios estructura-actividad (Rivier y cols., 1978), que relacionan la actividad biológica de estos péptidos con los 7-10 últimos aminoácidos del extremo C-terminal. Es importante destacar que los anticuerpos frente a BBS no distinguen entre GRP (1-27) y GRP-10 en radioinmunoensayo (RIA) o inmunohistoquímica. Debido a que no se han identificado más péptidos que originen reacción cruzada con anticuerpos frente a BBS, se deduce que la inmunorreactividad frente a BBS en mamíferos se reduce a estas dos formas de GRP.

## 2. Síntesis y procesamiento

El ARNm que codifica para GRP humano (GRPh) fue aislado por Spindel y cols (1984; 1986; 1988) a partir de un tumor pulmonar en el que se encontraron altos niveles de inmunorreactividad a BBS. Este descubrimiento fue confirmado por Sausville y cols. en 1986

en 4 de las 7 líneas celulares tumorales SCLC (Small Cell Lung Carcinoma o tumor pulmonar de células pequeñas) y en dos tumores metastásicos SCLC.

**FIGURA 10**  
**Síntesis y procesamiento de GRP en el hombre**



*GRPh se codifica a partir del ARNm del polipéptido precursor de GRP (ARNm de pro GRP). Este precursor procede de un único gen humano que codifica para GRP, localizado en el cromosoma 18 (Naylor y cols., 1987), cuyo tamaño es de 10 kb con dos intrones de 4,8 y 3,9 k y tres exones. El primer exón codifica para la región 5', el péptido señal y los primeros 23 aminoácidos de GRP; el exón 2 codifica para los 3 aminoácidos restantes de GRP y los primeros 74 aminoácidos de CTEP (carboxi terminal extension peptide o extensión carboxilo terminal del péptido). Por último, el exón 3 codifica para la secuencia restante de CTEP y el extremo 3' (Spindel y cols., 1987). El ARNm de pro GRP codifica para un péptido precursor de GRP (pro-GRP) de 148 aminoácidos, a partir del cual, y mediante procesamiento proteolítico se sintetiza GRP<sub>1-27</sub> (GRP-10) y GRP<sub>1-27</sub> (Spindel y cols., 1984). Este péptido precursor consta de un péptido señal que va seguido inmediatamente de GRP<sub>1-27</sub>, un aminoácido glicina (Gly) donador de la amida del extremo carboxilo terminal, dos residuos de lisina (Lys) que indican el punto de corte para las endopeptidasas y tres formas de CTEP. Las tres formas de CTEP se forman por distintos procesamientos del segundo intrón a partir del ARNm de pro GRP, como se muestra en la figura, dando lugar a la forma completa del ARNm de pro GRP (1), ARNm de pro GRP con 21 bases menos (2), y ARNm de pro GRP con 19 bases menos (3). Hasta el momento se desconoce la función del péptido señal y de CTEP (Spindel y cols., 1986; Sunday y cols., 1988).*

Distintos análisis han mostrado algunas similitudes entre el proceso de transcripción de GRP en humanos (figura 10) y en rata, pero también existen marcadas diferencias, como la existencia de dos formas de ARNm que codifican para el péptido precursor de GRP (pro-GRP), una de 1,1 Kb, bastante similar a la tercera forma de ARNm de pro-GRP en humanos,

y otra de 1,5 kb. La estructura del gen que codifica para GRP en rata tiene 3 exones, al igual que ocurría en el gen humano (Lebacq-Verheyden y cols., 1990), pero no existe procesamiento alternativo en el segundo intrón, que daba lugar a tres formas distintas de CTEP en humanos, por lo que el procesamiento del ARNm de pro-GRP en rata da lugar a un único péptido precursor de 147 aminoácidos (Lebacq-Verheyden y cols., 1988).

### 3. Localización de GRP

GRP se encuentra ampliamente distribuido en el SNC. Su localización en las distintas regiones del cerebro de rata se detalla en la *tabla 4*. Asimismo, se ha detectado inmunorreactividad a GRP (IR-GRP) y a su péptido precursor, pro-GRP, en hipófisis de rata y cobaya (Larsen y cols., 1989a; Steel y cols., 1992), lo que sugiere que GRP se sintetiza en esta glándula endocrina. Esta inmunorreactividad se localiza principalmente en corticotrofos y lactotrofos, y en menor medida en gonadotrofos, tirotrofos y somatotrofos, así como en la línea celular tumoral hipofisaria secretora de ACTH AtT20 y en la línea celular tumoral hipofisaria secretora de PRL y GH GH3 (Houben y Deneff, 1991a). GRP también está presente en la médula espinal de la rata (Moody y cols., 1981). Además, estudios realizados por Larsen y cols. (1989a) han demostrado la presencia de IR-GRP en células de la hipófisis anterior de cobaya en contacto con capilares hipofisarios, lo que sugiere que GRP puede ser liberado al torrente sanguíneo.

Es importante destacar la presencia de IR-GRP en terminaciones nerviosas de la zona externa de la EM bovina cercanas a capilares sanguíneos, pero no en la zona interna de la EM. En estas terminaciones nerviosas, GRP colocaliza con CRF, lo que refuerza la hipótesis de que GRP pueda ser liberado a la circulación portal hipofisaria (Giraud y cols., 1987a). Además, existe IR-GRP en la médula espinal de rata (Panula y cols., 1987), donde el contenido en GRP parece estar influenciado por los glucocorticoides, ya que en estudios recientes se ha observado un aumento en el contenido de péptidos análogos a BBS en la médula espinal de ratas adrenalectomizadas y tratadas posteriormente con dexametasona (Westermarck y cols., 1999a y b).

En la especie humana, GRP se encuentra principalmente en hipotálamo, ACC, globo pálido, amígdala, SGP y sustancia nigra (Ghatei y cols., 1984). Asimismo, se ha detectado IR-GRP en la médula espinal, en el líquido cefalorraquídeo (Yamada y cols., 1981) y en la hipófisis, concretamente en los lóbulos anterior e intermedio (Chung y cols., 1989; Steel y cols., 1992).

GRP también está presente en la médula adrenal. Lemaire y cols. (1986) detectaron la presencia de IR-GRP en médula adrenal bovina, concretamente en células noradrenérgicas. A nivel subcelular, esta inmunorreactividad se localiza en los gránulos secretores junto con catecolaminas, y en la fracción microsomal, en concreto en el aparato de Golgi, hecho que sugiere que GRP permanece en esta fracción como precursor y reserva para un posterior procesamiento. El hecho de que GRP coexista con NA en células adrenomedulares sugiere que este péptido puede ser liberado tras una estimulación del nervio esplénico junto con NA y

modular la secreción hormonal de esta glándula.

A nivel periférico se han detectado células endocrinas con IR-GRP en el tracto gastrointestinal y en páncreas humano (Polak y cols., 1976; Price y cols., 1984; Shimosegawa y cols., 1993). Asimismo, son muchos los mamíferos, entre ellos la rata, en los que se han encontrado cuerpos celulares y fibras nerviosas con IR-GRP en esta región (Buffa y cols., 1982; Moghimzadeh y cols., 1983; Costa y cols., 1984). GRP también está presente en pulmón en mamíferos adultos (Wharton y cols., 1978), aunque las mayores concentraciones en pulmón humano se han encontrado en fetos y recién nacidos (Cutz y cols., 1981), lo que sugiere la implicación de GRP en el desarrollo pulmonar y su posible función como factor de crecimiento celular tanto en células normales como tumorales (Cuttitta y cols., 1985). También se ha localizado GRP en la glándula tiroides de recién nacidos, leche materna tanto humana como de vaca, en el tracto reproductor femenino de la rata y en vejiga urinaria humana (Sunday y cols., 1988)

**TABLA 4**  
**Distribución de GRP y su ARNm en cerebro de rata**

Región	Inmunorreactividad a GRP	ARNm GRP
<i>A. Cerebro anterior</i>		
Corteza	+	+ / ++
Regiones olfatorias: tubérculo olfatorio	+	-
Hipocampo	+	++ / +++
Amígdala	++	++ / +++
Ganglios basales: núcleo accumbens	+	-
Tálamo	++	+ / -
Hipotálamo		
⇒ núcleo medial preóptico	++	++
⇒ núcleo periventricular	++	+
⇒ núcleo supraquíasmático	?	+
⇒ núcleo supraóptico	?	++
⇒ núcleo paraventricular	++	+
⇒ núcleo arqueado	+++	-
⇒ núcleo dorsomedial	++	+
⇒ eminencia media	+	?

Región	Inmunorreactividad a GRP	ARNm GRP
<i>B. Tallo cerebral</i>		
Cerebro medio: sustancia gris periacueductal	++	+
Cerebro posterior: núcleo del tracto solitario	+++	++

Datos de IR-GRP obtenidos por RIA (Moody y cols., 1981); distribución de ARNm de GRP según Wada y cols., 1990 medida por hibridación *in situ*. +++, niveles muy elevados; ++, niveles moderadamente elevados; +, niveles bajos; -, niveles indetectables; ?, datos desconocidos.

#### 4. Distribución de ARNm de GRP

Como se muestra en la *tabla 5*, se conoce la distribución en cerebro de rata de los dos transcritos que codifican para el péptido precursor de GRP en cerebro de rata. Este estudio, realizado por Zoeller y cols. en 1989, se llevó a cabo mediante hibridación *in situ*, utilizando ribosondas complementarias al transcrito de 1,5 kb y a los dos transcritos (1,5 y 1,1 kb), de modo que puede observarse la diferente distribución de los dos ARNm. Asimismo, estudios de hibridación *in situ* con ribosondas y oligonucleótidos específicos para ARNm de GRP muestran una distribución cerebral bastante similar (Wada y cols., 1990; Gundlach y Knobe, 1992; *tabla 4*). Aun así, la señal de hibridación es débil comparada con la de otros neuropéptidos, lo que indica que en general GRP se expresa en poca proporción en cerebro. Como se detalla en la *tabla 4*, a pesar de que existen áreas cerebrales que contienen ARNm de pro-GRP y no contienen inmunorreactividad, y al contrario, existe una cierta correlación entre la localización de ARNm de pro-GRP y la distribución de su inmunorreactividad. Esto puede indicar varias cosas: que para algunas poblaciones neuronales no hay traslado de ARNm de pro-GRP o se traslada en muy baja proporción; o que se utiliza o se degrada de forma muy rápida. Es importante destacar que muchas de las áreas con presencia de ARNm de pro-GRP contienen también receptores para GRP. Asimismo, se han detectado niveles bajos de ARNm de GRP en hipófisis de rata (Houben y cols., 1993).

Fuera del SNC se ha detectado expresión moderada de ARNm de GRP en estómago y células aisladas del tracto gastrointestinal de rata, pero no en otros órganos como el hígado y el riñón (Wada y cols., 1990; Dimaline y cols., 1992).

En humanos se ha detectado ARNm de GRP en distintos tejidos y sistemas como pulmón, tiroides y tracto gastrointestinal, pero no en ciertas glándulas, como hipófisis y adrenal (Sunday y cols., 1988).

**TABLA 5**  
**Localización cerebral del ARNm del péptido precursor de GRP en la rata**

Región cerebral	Transcrito 1,5 kb	Transcrito 1,1 kb
<i>A. Telencéfalo</i>		
Corteza cingulada	+	+
Corteza frontal, frontoparietal y estriado	-	+
Hipocampo	+	+
Amígdala	+	+
<i>B. Diencéfalo</i>		
Pálido ventral	-	+
Septum medial	-	+
Área preóptica medial y mediana	-	+
Núcleo supraquiasmático	-	+
Zona incerta	-	+
<i>C. Rombencéfalo</i>		
Acueducto dorsal y lateral	-	+
Núcleo interpeduncular	-	+
Núcleo medial geniculado	-	+
Núcleo parabigeminal	-	+
Núcleo del Rafe pontino	-	+
Núcleo dorsal parabraquial	-	+
Núcleo del tracto solitario	-	+

+ : presencia de ARNm; - : no hay presencia de ARNm.  
 (Tomado de Zoeller y cols., 1989)

## 5. Receptores de GRP

Hasta la fecha se han caracterizado cuatro tipos de receptores para péptidos análogos a BBS en mamíferos: el receptor de GRP (GRP-preferring receptor, GRP-R o BB2) que fue clonado por Spindel y cols. (1990) y Battey y cols. (1991); el receptor de Neuromedina B (NMB-preferring receptor, NMB-R o BB1) que fue clonado por Wada y cols. (1991); el tercer subtipo de receptor es el llamado BRS-3 o BB3 y fue clonado por Gorbulev y cols. (1992) y Fathi y cols. (1993). Estudios recientes han demostrado que su gen se expresa en hipófisis de oveja e hipotálamo de oveja y ratón (Whitley y cols., 1999; Yamada y cols., 1999), aunque su función fisiológica y su ligando endógeno todavía no se ha descubierto. Por último, en 1995, Nagalla y cols. identificaron un cuarto subtipo de receptor llamado BB4, y del que se conoce relativamente poco (Katsuno y cols., 1999).

**TABLA 6**  
**Unión de distintos ligandos al receptor de GRP y de NMB en distintos cultivos celulares**

<b>Receptor de GRP en mamíferos</b>					
<b>Ki (nM)</b>					
<i>Ligando</i>	<i>*Receptor humano transfectado</i>	<i>Células pancreáticas de cobaya</i>	<i>Células Swiss 3T3</i>	<i>Células pancreáticas de ratón</i>	<i>*Receptor de ratón transfectado</i>
BBS	1,4 ± 0,2	3,6 ± 0,5	1,3 ± 0,2	6,8 ± 1,3	0,9 ± 0,3
GRP	6,2 ± 1,3	11 ± 1,5	1,6 ± 0,2	6 ± 2	3,1 ± 1,4
NMB	437 ± 30	1500 ± 150	41,8 ± 4,8	230 ± 80	174 ± 44

<b>Receptor de NMB en mamíferos</b>			
<b>Ki (nM)</b>			
<i>Ligando</i>	<i>*Receptor humano transfectado</i>	<i>Glioblastomas de rata</i>	<i>*Receptor de rata transfectado</i>
BBS	32 ± 3	21 ± 7	34 ± 2
GRP	5080 ± 770	403 ± 58	439 ± 66
NMB	8,1 ± 5,2	3,3 ± 0,8	4,2 ± 0,6

\* Se refiere al receptor de humano, de ratón y de rata transfectado en fibroblastos de ratón Balb 3T3 (Tomado de Kroog y cols., 1995b)

La potencia relativa de los distintos agonistas de estos receptores sobre cada subtipo de receptor es la siguiente (Nagalla y cols., 1995; Betancur y cols., 1997):

*Receptor de NMB o BB1: NMB > BBS > GRP*

*Receptor de GRP o BB2: GRP > [Leu<sup>13</sup>] bombesina > [Phe<sup>13</sup>] bombesina >> NMB*

*Receptor BB3: BBS >> GRP = NMB*

*Receptor BB4: [Leu<sup>13</sup>] bombesina>[Phe<sup>13</sup>] bombesina>GRP>NMB*

Todos estos receptores están acoplados a proteína G, tienen 7 dominios transmembrana y su mecanismo de transducción es vía fosfolipasa C (PLC) para producir un aumento de IP<sub>3</sub>, diacilglicerol (DAG) y Ca<sup>2+</sup> intracelular.

Dado que GRP se une preferentemente al receptor BB2 o receptor de GRP, en esta memoria sólo nos referiremos a este subtipo de receptor.

### **5.1. Receptor de GRP: Identificación, clonaje y mecanismo de transducción**

En 1978, Moody y cols. y Jensen y cols. identificaron un receptor específico, saturable y reversible para GRP en células pancreáticas acinares de cobaya y en membranas cerebrales de rata. Posteriormente se identificó este receptor en la línea celular hipofisaria de rata secretora de GH y PRL GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub>, en células Swiss 3T3 de ratón y en células SCLC (Westendorf y Schonbrunn, 1983; Zachary y Rozengurt, 1985; Moody y cols., 1985). También se conoce la estructura del receptor de GRP humano, caracterizada por Corjay y cols. (1991) y Benya y cols. (1995a), cuyo gen está localizado en el cromosoma X (Feldman y cols., 1990).

El receptor de GRP es una proteína de 384 aminoácidos con un peso molecular de 43 kD y se encuentra situado en la membrana celular. En este receptor pueden distinguirse tres regiones: 1) el dominio extracelular de unión al ligando, que es la región a la cual se une GRP, 2) 7 dominios hidrofóbicos que corresponden a los siete dominios transmembrana característicos de los receptores acoplados a proteína G, que atraviesan la bicapa lipídica de la membrana celular, y 3) el dominio intracelular, encargado de activar el sistema de segundos mensajeros. Es importante destacar en la estructura de los siete dominios transmembrana los tres sitios de fosforilación para PKC, uno en el tercer dominio transmembrana y dos en el cuarto, además de la secuencia cisteína-cisteína (Cys-Cys) en este último dominio, responsable del anclaje del receptor a la membrana celular (Kroog y cols., 1995a y b).

El receptor de GRP está acoplado a proteína G. Estas proteínas tienen 3 subunidades,  $\alpha$ ,  $\beta$  y  $\gamma$ , que se disocian en dos subunidades, G <sub>$\alpha$</sub>  (de la que se conocen al menos 20 tipos distintos) y G <sub>$\beta\gamma$</sub> , para activar las enzimas necesarias para la síntesis de segundos mensajeros (Johnson y Dhanasekaran, 1989). El receptor de GRP induce la cascada de segundos mensajeros a través de proteína G <sub>$\alpha q/11$</sub> , cuya función es transmitir la señal desde el dominio extracelular de unión al ligando hasta el sistema de segundos mensajeros intracelular, produciendo la hidrólisis de fosfatidil inositol fosfato (PIP<sub>2</sub>; Hellmich y cols, 1997).

El receptor de GRP, como se verá posteriormente, se encuentra ampliamente distribuido en SNC y tejidos periféricos, y parece actuar casi exclusivamente a través de mecanismos mediados por PKC (Bjoro y cols., 1987; Muir y Murray, 1987). Sin embargo, en algunos tipos de células este receptor incrementa los niveles de AMPc (Benya y cols., 1994a), e incluso puede actuar a través de los dos mecanismos (Benya y cols., 1994b). El sistema de segundos mensajeros acoplado al receptor de GRP activa mayoritariamente PLC: así se ha observado que a través de esta vía, BBS estimula la secreción de PRL y ACTH en la línea

celular GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> y en disociados de adenohipófisis respectivamente (Bjoro y cols., 1987; Au y cols., 1997), además de potenciar la secreción de ACTH inducida por CRF (Au y cols., 1997).

Por último, cabe destacar que la regulación del número de receptores de GRP se lleva a cabo por fosforilación, internalización (es decir, el complejo GRP-receptor se introduce en el citoplasma por endocitosis) y regulación a la baja. El receptor de GRP, al igual que otros receptores acoplados a proteína G, es fosforilado como consecuencia de la unión del agonista, lo que a su vez produce aumento de la concentración intracelular de Ca<sup>2+</sup> (Hellmich y cols., 1999). Esta fosforilación se produce mayoritariamente por PKC (Brown y cols., 1987; Muir y Murray, 1987; Hellmich y cols., 1999), aunque estudios recientes sugieren la implicación de otras quinasas en este proceso de fosforilación (Benya y cols., 1994b; Kroog y cols., 1995b; Hellmich y cols., 1999). La misión de estos tres procesos en conjunto es finalizar la respuesta y evitar una posterior activación del receptor en presencia de un agonista, fenómeno llamado desensibilización (Benya y cols., 1994a; 1994b y 1995b).

## 5.2. Distribución del receptor de GRP

La distribución cerebral del receptor de GRP en rata se detalla en la *tabla 7*. En líneas generales, puede decirse que coincide con la distribución de terminaciones nerviosas de GRP en cerebro adulto, con la excepción del hipocampo y de la corteza cerebral (Panula y cols., 1982).

El receptor de GRP también se encuentra en hipófisis. Houben y cols. (1994) demostraron por técnicas autorradiográficas la existencia de sitios de unión para péptidos análogos a BBS en hipófisis anterior, principalmente en lactotrofos y somatotrofos. Además se han encontrado receptores para GRP en la línea celular GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> (Westendorf y Schonbrunn, 1983).

A pesar de la amplia distribución de receptores en el SNC, la mayor densidad de *receptores de GRP en distintos mamíferos se ha encontrado en el tracto gastrointestinal* (Vigna y cols., 1987; Moran y cols., 1988). También se han localizado receptores de GRP en la vejiga urinaria, útero y vesícula seminal (Sunday y cols., 1988).

La distribución del ARNm del receptor de GRP en cerebro de rata se detalla en la *tabla 7* y coincide en líneas generales con la distribución de su receptor. Asimismo se han detectado bajos niveles de ARNm del receptor de GRP en hipófisis (Houben y cols., 1993).

**TABLA 7**  
**Distribución del receptor de GRP y su ARNm en cerebro de rata**

Tejido	Receptor de GRP	ARNm del receptor de GRP
<i>A. Cerebro anterior</i>		
Isocorteza		
⇒ Lámina II	+	++
⇒ Lámina III	+	+
⇒ Lámina V	++	-
⇒ Lámina VI	++	-
Hipocampo	++	++
Amígdala: núcleo lateral del tracto olfatorio	+++	+++
Ganglios basales: núcleo accumbens	+++	+
Tálamo	-	-
Hipotálamo		
⇒ núcleo supraquiasmático	+++	+++
⇒ núcleo supraóptico	+++	++
⇒ núcleo paraventricular	+++	++
⇒ núcleo arqueado	+++	++
⇒ núcleo mamilar lateral	++	+++
⇒ núcleo medial preóptico	++	++
⇒ Eminencia media	+++	?
<i>B. Tallo cerebral</i>		
Cerebro medio: sustancia gris periacueductal	?	+
Cerebro posterior		
⇒ núcleo del tracto solitario	?	+
⇒ núcleo ambiguo	++	++

*Distribución del receptor de GRP por medida por autorradiografía (Ladenheim y cols. 1992); distribución de ARNm del receptor de GRP por medida por northern blot (Wada y cols. 1991). +++ , niveles muy elevados; ++ , niveles moderadamente elevados; + , niveles bajos; - , niveles indetectables; ? , datos desconocidos.*

## **6. Circuitos neuronales y colocación de GRP con otros neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema nervioso central**

La mayoría de los estudios sobre circuitos neuronales de GRP han sido realizados en *rata*. Así se ha demostrado que la mayor parte de cuerpos celulares GRPérgicos se encuentran en el NSQ, NPV y NTS (Roth y cols., 1982; Panula y cols., 1984; Larsen y cols., 1989b), mientras que las terminaciones nerviosas con IR-GRP se han localizado principalmente en el ARC (Panula y cols., 1984) y en otras regiones cerebrales como el *pálido ventral*, el *núcleo interpeduncular* y la *sustancia nigra pars reticulata* (Larsen y cols., 1989b). GRP se encuentra en axones que contactan con neuronas del NSQ, lo que sugiere la posible función neurotransmisora de GRP en esta región hipotalámica (Van den Pol, 1986), además de su implicación en el control del ritmo circadiano, como se explicará posteriormente. De hecho, la administración de GRP estimula la actividad neuronal del NSQ y del ARC, (Lin y Pan, 1993; Tang y Pan, 1993) y la luz induce la expresión de proteínas Fos en neuronas GRPérgicas del NSQ (Earnest y cols., 1993).

Los cuerpos celulares GRPérgicos del NTS, núcleo parabraquial y el NPV del hipotálamo proyectan hacia el núcleo motor dorsal del vago (DMV) (Riche y cols., 1990; Costello y cols., 1991; Lynn y cols., 1997). Además, los cuerpos celulares del núcleo dorsal geniculado y del LC proyectan hacia la zona incerta (Lechner y cols., 1993). Por otra parte, neuronas GRPérgicas situadas en otras regiones hipotalámicas, en el núcleo de la *estria terminalis* o en la *amígdala* no se proyectan aparentemente hacia el DMV. La función específica de estas vías GRPérgicas todavía no se ha determinado, aunque todo parece indicar que los efectos centrales producidos tanto por GRP como por BBS podrían estar mediados por la proyección existente entre el NPV y el DMV (Costello y cols., 1991) y que GRP podría actuar como neurotransmisor/neuromodulador en el complejo NTS/DMV (Lynn y cols., 1997). Además, GRP coexiste con el enzima *tirosina hidroxilasa*, paso limitante de la síntesis de catecolaminas, en neuronas del NTS, por lo que la coexistencia de catecolaminas y GRP en esta región cerebral podría regular, al menos en parte, los efectos cardiovasculares de GRP y BBS (Lynn y cols., 1996).

También se han encontrado cuerpos neuronales de GRP en otras áreas cerebrales de *rata*, como la *médula ventrolateral* y el *núcleo medial geniculado* (Lynn y cols., 1996), y terminaciones nerviosas en la *médula espinal* (Chung y cols., 1989). Por otra parte, en humanos, la distribución de fibras y terminaciones nerviosas del NTS y del DMV coincide con la descrita para la *rata* (Lynn y cols., 1996).

Por último, se ha observado que tanto GRP como BBS producen estimulación de neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe, actuando probablemente sobre receptores postsinápticos acoplados a canales de potasio (Pinnock y Woodruff, 1991).

Además, GRP colocaliza en numerosas regiones cerebrales con otros neurotransmisores y neuropéptidos en la *rata*, como se describe en la *tabla 8*. Estos estudios, realizados mediante técnicas inmunocitoquímicas, han demostrado, entre otros hallazgos, que GRP colocaliza con AVP y somatostatina tanto en axones como en cuerpos celulares del NSQ, pudiendo funcionar

como neurotransmisor en esta región hipotalámica (Van den Pol, 1986). Por otra parte, el hecho de que GRP colocalice con catecolaminas en el NTS puede estar relacionado en parte con los efectos cardiovasculares de BBS (Lynn y cols., 1996). Asimismo, es importante destacar la presencia de IR-GRP en terminaciones nerviosas de la zona externa de la EM bovina cercanas a capilares sanguíneos, en donde GRP colocaliza con CRF, lo que refuerza la hipótesis de que GRP pueda ser liberado a la circulación portal hipofisaria (Giraud y cols., 1987a).

**TABLA 8**  
**Principales colocalizaciones de GRP con otros neurotransmisores y neuropéptidos en el sistema nervioso central en rata**

neurotransmisor/ neuropéptido	Región cerebral	Referencias
Somatostatina hipotalámica	NSQ	Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Van den Pol, 1986; Kawata y cols., 1987
serotonina	NSQ	Van den Pol, 1986; Kawata y cols., 1987
CRF	NPV	Moody y cols., 1981; Piekut y Joseph, 1986
arginina-vasopresina	NPV	Moody y cols., 1981; Piekut y Joseph, 1986
	NSQ	Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Van den Pol, 1986
péptido intestinal vasoactivo	NSQ	Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Kawata y cols., 1987
	Núcleo trigeminal mesencefálico	Copray y cols., 1990
neuropéptido Y	NSQ	Kawata y cols., 1987
	Núcleo trigeminal mesencefálico	Copray y cols., 1990
péptido histidina- isoleucina	NSQ	Romijn y cols., 1996
Catecolaminas	DMV	Riche y cols., 1990
	NTS	Lynn y cols., 1996
Sustancia P	Núcleo trigeminal mesencefálico	Copray y cols., 1990

neurotransmisor/ neuropéptido	Región cerebral	Referencias
colecistoquinina	NPV	Moody y cols., 1981
	Núcleo trigeminal mesencefálico	Copray y cols., 1990
leucina-encefalina (leu-enk)	NPV	Kiss y cols., 1984;
	Núcleo trigeminal mesencefálico	Copray y cols., 1990
GABA	NSQ	Van den Pol y Tsujimoto, 1985; Van den Pol, 1986
Neurofisina	NSQ	Van den Pol y Tsujimoto, 1985

## 7. Efectos fisiológicos y farmacológicos de GRP

### 7.1. Efecto de GRP/bombesina sobre la actividad locomotora

La administración icv de BBS en ratas aumenta la actividad locomotora (Pert y cols., 1980). Este aumento de actividad locomotora se ve disminuido si previamente a la administración de BBS, los animales son tratados con neurolepticos como haloperidol o flufenazina (Merali y cols., 1983), lo que sugiere que la DA podría actuar como mediador de la respuesta locomotora de BBS.

Existen estudios más recientes en los que se ha caracterizado el subtipo de receptor dopaminérgico implicado en el aumento de actividad locomotora inducido por BBS. La combinación de dos antagonistas dopaminérgicos, SCH 23390 (antagonista del receptor D<sub>1</sub>) y eticloprida (ETIC), antagonista del receptor D<sub>2</sub>, inhibe de forma marcada el aumento de actividad locomotora inducido por BBS. Sin embargo, este bloqueo es mayor (>70%) cuando se combina una dosis baja del SCH 23390 con dosis crecientes de ETIC, lo que sugiere una mayor participación del receptor D<sub>2</sub> en el aumento de actividad locomotora inducido por BBS. No obstante la activación de ambos receptores es necesaria para que BBS aumente la actividad locomotora (Piggins y Merali, 1989).

### 7.2. Efecto de GRP/bombesina sobre la conducta de acicalamiento

En 1985, Merali y cols. observaron que la administración icv de BBS incrementa el comportamiento de acicalamiento en rata. Este tipo de respuesta consiste en que la rata se rasca frecuentemente la cabeza y el cuello con las patas traseras; además, los animales se lamen las patas antes de rascarse. Es más, la BBS aumenta la frecuencia con la que las ratas se acicalan la cara (con las patas delanteras) y se lavan el cuerpo ayudándose de la lengua y los dientes. Por último, puede aparecer otro tipo de comportamiento como temblor en las patas delanteras, estiramientos y sacudidas de cabeza. Este efecto central de la BBS sobre el

comportamiento no ocurre exclusivamente en la rata, sino que también se ha observado en ratón, cobaya, conejo y mono (Cowan y cols., 1985). Por otra parte, parece ser que en ratón y en rata, la BBS aumenta el comportamiento de acicalamiento actuando tanto a nivel espinal como supraespinal, ya que se ha observado este efecto tanto tras administración intratecal como icv (Gmerek y Cowan, 1984).

Estudios posteriores (Piggins y Merali, 1989) sugieren la implicación de la DA en el incremento de la conducta de acicalamiento inducida por BBS. La administración tanto de un antagonista  $D_1$  (SCH 23390) como de un antagonista  $D_2$  (ETIC) inhibe de forma significativa este comportamiento. Sin embargo, cuando se combina una dosis fija de ETIC con dosis crecientes de SCH 23390, se obtiene una mayor inhibición, lo que sugiere que aunque ambos receptores son fundamentales para la totalidad de la respuesta, el receptor  $D_1$  está más implicado en la mediación de este tipo de comportamiento que el receptor  $D_2$ .

### **7.3. Efecto de GRP/bombesina sobre la percepción del dolor**

Pert y cols., (1980) demostraron que la administración de BBS en la SGP de la rata tiene un efecto antinociceptivo, en los tests de la placa caliente y de retirada de la cola; este efecto no parece estar mediado por receptores  $\mu$  opiodes, ya que no se bloqueó con naloxona. Estudios posteriores demuestran que la BBS también posee propiedades antinociceptivas en ratón, en el test de estiramiento por administración de ácido acético. Dado que los agonistas  $\kappa$ -opioides atenúan de forma selectiva el aumento del comportamiento de rascado inducido por BBS, es posible que la BBS esté relacionada con las propiedades antinociceptivas de estos agonistas (Cowan, 1988).

### **7.4. Efecto de GRP/bombesina sobre la conducta alimentaria**

La administración intraperitoneal (ip) de GRP o BBS reduce de forma potente y dosis-dependiente la ingestión de comida y agua en ratas (Gibbs y cols., 1981; Gibbs, 1985). Efectos similares se han observado tras la inyección ip de ambos péptidos en ratón o tras administración iv en monos y humanos (Gibbs, 1985). Asimismo, la administración tanto central como periférica de BBS es capaz de suprimir el aumento de apetito producido por estrés (Morley y Levine, 1981; Morley y cols., 1982). Han sido muchos los estudios que se han hecho para aclarar el mecanismo por el cual ambos péptidos inducen saciedad. Distintas lesiones, como adrenalectomía, vagotomía, hipofisectomía, resección del ganglio celiaco o de la médula espinal a nivel de la sexta vértebra torácica, así como lesiones en el área postrema o en el NVM no consiguieron revertir el efecto anorexígeno inducido por BBS. Por otra parte, la administración icv de BBS también induce saciedad, pero de forma menos marcada que la administración ip, hecho que sugiere que la BBS no actúa exclusivamente a nivel central para producir este efecto (Gibbs, 1985).

En 1993, Motamedi y cols. investigaron con más profundidad el mecanismo por el cual la BBS induce anorexia. Para ello, y dado que tanto el sistema dopaminérgico como el adrenérgico y el serotoninérgico están implicados en la conducta alimentaria, se estudió el efecto de la administración de distintos antagonistas sobre el efecto anorexígeno inducida por

BBS. La administración subcutánea (sc) del antagonista  $D_1$  SCH 23390, e ip de los antagonistas  $D_2$  pimozida y sulpiride no revirtió el efecto anorexígeno inducido por BBS. Lo mismo ocurrió tras la administración ip de fenoxibenzamina y propanolol, bloqueantes de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos respectivamente, y del antagonista de los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> metergolina. Finalmente, la administración ip del antagonista del receptor de GRP BW 2258U89 consiguió revertir el efecto anorexígeno producido por la administración periférica tanto de GRP como de BBS, pero no el mismo efecto producido tras la administración de colecistoquinina (CCK); este hecho demuestra que la supresión del apetito producida por péptidos análogos a BBS está mediada a través del receptor de GRP (Kirkham y cols., 1994). Es más, la administración icv del antagonista del receptor de GRP [Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina consiguió revertir completamente este efecto, por lo que el efecto anorexígeno producido tras la administración ip de BBS puede ser debido a la interacción con receptores centrales de GRP. Esta hipótesis parece confirmada por un estudio reciente de Ladenheim y cols. (1996), en el cual la administración en el cuarto ventrículo de un antagonista del receptor de GRP suprime el efecto anorexígeno producido por la administración periférica de GRP, lo que sugiere que distintas estructuras cerebrales, entre ellas el NTS (Johnston y Merali, 1988) y la amígdala central y basolateral (Vigh y cols., 1999a y b), pueden estar implicadas en la supresión del apetito producida por BBS y/o GRP. Además, Hostetler y cols. (1989) observaron que la supresión del apetito inducida por BBS no está mediada por mecanismos gástricos inhibitorios o a través de un lugar de acción a nivel del tracto gastrointestinal.

Por otra parte, existen otros sistemas de neurotransmisión implicados en la acción anorexígena de péptidos análogos a BBS, como son el sistema histaminérgico y el CRFérgico, ya que agonistas del receptor H<sub>3</sub> de histamina y antagonistas del receptor de CRF son capaces de revertir el efecto anorexígeno producido por la administración de BBS en rata (Merali y Banks, 1994; Plamondon y Merali, 1997).

Es importante destacar la función que tiene el receptor de GRP y el receptor de bombesina BB3 en el comportamiento anorexígeno inducido por BBS. Se ha observado que la administración periférica de BBS a ratones normales suprime de forma dosis-dependiente la ingestión de glucosa, mientras que en ratones transgénicos que carecen del receptor de GRP no se observa ninguna variación. Estos datos sugieren que agonistas de este receptor pueden ser útiles para producir saciedad (Hampton y cols., 1998). Por otra parte, ratones transgénicos que carecen del receptor BB3 desarrollan obesidad asociada a hipertensión y deterioro del metabolismo de glucosa. Además, estos animales presentan una tasa metabólica reducida y mayor apetito (Ohki-Hamazaki y cols., 1997).

Por último, cabe añadir que se han observado modificaciones en los niveles endógenos de péptidos análogos a BBS en relación a la ingestión de comida, ya que estos niveles son más altos antes y después de la ingestión de comida, disminuyendo durante la comida (Plamondon y Merali, 1994).

### **7.5. Efecto de GRP/bombesina sobre la regulación de la temperatura**

La administración de GRP o de BBS en el ventrículo lateral cerebral o en la cisterna

magna de ratas que se encuentran en un entorno cuya temperatura oscila entre 4 y 24°C produce una marcada hipotermia. Sin embargo, estos péptidos no tienen efecto cuando las ratas se mantienen a temperatura ambiente, y se ha observado que inducen hipertermia cuando los animales se encuentran a temperaturas mayores de 35°C. Esta hipertermia se convierte en hipotermia cuando los animales se trasladan a un entorno a bajas temperaturas. Puede decirse que la hipotermia inducida por BBS tiene un comienzo rápido, y es duradera, reversible y dosis-dependiente (Taché y Brown, 1982).

Es importante destacar que la hipotermia producida por BBS es más pronunciada que la inducida por otros neuropéptidos como neurotensina o sustancia P. Además, las dosis requeridas para producirla son muy bajas -100 ng-, con lo que puede concluirse que la BBS es una de las sustancias más potentes implicada en el control de la temperatura entre las conocidas hasta la fecha (Brown y cols., 1977).

La BBS interviene en el control de la temperatura del organismo actuando sobre el hipotálamo, concretamente en la región preóptica; la inyección de este péptido en otras regiones del cerebro anterior o medio o por vía iv no produjo ningún efecto sobre la temperatura corporal. Por otra parte, la hipotermia producida por BBS no parece estar mediada por sistemas dopaminérgicos, catecolaminérgicos o colinérgicos, ya que antagonistas de estos sistemas, que son capaces de bloquear la hipotermia producida por los correspondientes agonistas, fueron inefectivos a la hora de bloquear la hipotermia inducida por BBS. Es más, la administración central de DA, NA, carbacol o apomorfina produjo un efecto hipotérmico 1000 veces menor que el inducido por BBS. Sin embargo, algunos neuropéptidos como TRH o somatostatina, ó antagonistas opiáceos como naloxona sí previenen la acción hipotérmica de BBS, lo que sugiere una posible interacción entre BBS y estos neuropéptidos (Taché y Brown, 1982).

#### **7.6. Efecto de GRP/bombesina sobre la regulación del ritmo circadiano**

El NSQ, cuya función principal es la regulación del ritmo circadiano, contiene distintas subpoblaciones de neuronas peptidérgicas, entre las que se encuentran neuronas GRPérgicas, además de neuronas que contienen VIP y PHI. La administración conjunta de los tres neuropéptidos en hamsters activa además de observarse una activación de estas neuronas en registros de actividad eléctrica *in vitro*, lo que sugiere la implicación de GRP en el control del ritmo circadiano (Albers y cols., 1991). Por otra parte, el hecho de que la IR-GRP aumente en el NSQ durante el crecimiento de la rata, unida a la elevación de estos niveles durante el periodo nocturno en crías de 4 a 20 días demuestra que existen variaciones en el contenido de GRP en el NSQ debidas al ciclo día/noche (Isobe y Muramatsu, 1995).

Además, existe una variación de los niveles de GRP endógeno a lo largo del día, siendo éstos más bajos durante la mañana, y aumentando a partir de las 7 de la tarde (Nicholson y cols., 1983).

### **7.7. Efecto de GRP/bombesina sobre la regulación de la glucemia**

En 1979, Brown y cols. observaron por primera vez que la administración en la cisterna magna de BBS en rata producía un marcado efecto hiperglucémico. Asimismo se ha observado que la acción hiperglucémica de BBS es potente y prolongada en el tiempo, y que se produce mediante un aumento de la secreción adrenomedular de catecolaminas, y no por estimulación pancreática directa que aumente la secreción de glucagón (Brown y cols., 1979; Gotoh y cols., 198).

Por otra parte, el eje HHA no parece estar implicado en la hiperglucemia inducida por BBS, ya que la administración de este neuropéptido a animales a los cuales se les ha practicado una resección de hipófisis no modifica los niveles de glucemia normales. Es más, la administración en la cisterna magna de BBS no eleva los niveles plasmáticos de corticosterona en animales en los que se ha observado una elevación de los niveles plasmáticos de glucosa y glucagón. Sin embargo, la administración icv de BBS sí modificó los niveles plasmáticos de adrenalina, además de aumentar la glucemia, confirmándose la hipótesis anterior. El mecanismo de acción más probable sería el siguiente: la adrenalina podría producir una disminución de insulina y una elevación de glucagón plasmático, lo que da lugar a una señal que llega al hígado, desencadenándose la hiperglucemia (Brown y cols., 1979).

Sin embargo, el NPV parece ser en parte responsable del efecto hiperglucémico inducido por BBS, ya que la inyección de este neuropéptido en rata en esta región cerebral aumenta los niveles de glucosa plasmáticos, mientras que su administración en otras regiones, como el hipotálamo lateral o el caudado-putamen no produjo ningún efecto (Gunion y cols., 1989). El NVM también parece estar implicado en la hiperglucemia producida por péptidos análogos a BBS, ya que la inyección de BBS en este núcleo hipotalámico aumentó los niveles plasmáticos de glucosa en la vena hepática (Iguchi y cols., 1984).

Por último, se ha observado que ratones transgénicos que carecen del receptor BB3 presentan un deterioro del metabolismo de glucosa (Ohki-Hamazaki y cols., 1997).

### **7.8. Efecto de GRP/bombesina sobre la contracción del músculo liso**

Se ha encontrado inmunorreactividad y receptores de GRP en el útero de rata (Stjernquist y cols., 1986; Amiot y cols., 1993). Esto sugiere la posible implicación de GRP en la contracción del músculo liso uterino. En efecto, tanto BBS como GRP son capaces de contraer el músculo liso de útero y cérvix de rata (Amiot y cols., 1993), y esta contracción se ve aumentada en animales que han sido tratados con estrógenos (Stjernquist y cols., 1986). Además, GRP y BBS contraen la vejiga urinaria tanto en humanos (Delle Fave y cols., 1985; Hildebrand y cols., 1991), como en otras especies animales como el cobaya, por un mecanismo aparentemente directo, mediado a través del receptor de GRP (Rouissi y cols., 1991; Liu y cols., 1995).

Tanto GRP como BBS inducen broncoconstricción por acción directa sobre los

receptores de GRP presentes en músculo liso bronquial, y por un mecanismo independiente de receptores adrenérgicos, colinérgicos o dopaminérgicos (Lach y cols., 1993).

Asimismo, la administración central de BBS incrementa las contracciones duodenales en rata (Porreca y cols., 1988), y su administración periférica produce un efecto espasmogénico directo sobre el estómago y el esfínter pilórico (Bertaccini e Impicciatore, 1975). Este efecto espasmódico se bloquea por la administración de antiinflamatorios no esteroidicos y de antagonistas del receptor de GRP, lo que sugiere la implicación de las prostaglandinas y de los receptores de GRP presentes en el estómago en el efecto espasmogénico inducido por BBS (Impicciatore y cols., 1981; Ladenheim y cols., 1997). Por otra parte, GRP es capaz de contraer el músculo liso del colon, efecto bloqueado por un oligonucleótido antisentido de GRP y mediado por el receptor de GRP localizado en esta región intestinal (Bitar y Zhu, 1993).

### **7.9. Efecto de GRP/bombesina sobre la motilidad gastrointestinal**

La administración central de BBS reduce el vaciado gástrico y el tránsito gastrointestinal en rata (Porreca cols., 1988), efecto que parece estar mediado por la activación del receptor de CCK-A (Ladenheim y cols., 1999). En ratón, la administración central, tanto icv como intratecal, pero no la administración periférica, produce un retraso del tránsito gastrointestinal a nivel del colon. La transección medular a nivel de la segunda vértebra torácica revierte los efectos anteriormente mencionados producidos por administración intratecal, pero no por la administración icv, hecho que sugiere que los péptidos análogos a BBS pueden afectar la función motora intestinal actuando a nivel cerebral o de la médula espinal en ratas y ratones. Por otra parte, la actividad de estos péptidos cuando se administran a nivel supraespinal depende de la integridad del nervio vago y del eje HHA, mientras que el efecto de estos péptidos cuando se administran a nivel espinal depende de la integridad de las vías ascendentes supraespinales (Porreca y cols., 1988).

Los péptidos análogos a BBS también aumentan la presión del esfínter esofágico inferior y retrasan el vaciado gástrico en humanos (Delle Fave y cols., 1985).

### **7.10. Efecto de GRP/bombesina sobre la secreción gástrica y pancreática**

#### *7.10.1. Secreción gástrica*

En la rata, GRP aumenta la liberación de gastrina e inhibe la secreción ácida gástrica (volumen y pH) sólo tras administración central, lo que sugiere que GRP actúa a nivel central para inhibir la secreción ácida gástrica y que este efecto es independiente de un descenso en la liberación de gastrina (Taché y cols., 1981a y b). Además, la administración de un antagonista del receptor de GRP reduce pero no es capaz de bloquear la liberación de gastrina producida por estimulación vagal (Weigert y cols., 1996). Sin embargo, en humanos, GRP eleva la secreción de gastrina, y pocos minutos después, la secreción ácida gástrica, lo que lleva a pensar que el aumento en la liberación de gastrina producido tras la administración de GRP parece ser el responsable del aumento de la secreción ácida gástrica (Knigge y cols., 1984).

La BBS inhibe la secreción ácida gástrica por un mecanismo independiente de los sistemas de neurotransmisión serotoninérgicos o catecolaminérgicos, y de hormonas hipofisarias; sin embargo, la administración periférica de indometacina, un bloqueante de la síntesis de prostaglandinas, es capaz de atenuar la secreción ácida gástrica inducida por la administración *icv* de BBS, por lo que este efecto podría estar mediado a nivel central por la síntesis de uno o más productos de la cascada del ácido araquidónico (Guglietta y cols., 1987).

Además, la administración *iv* de un anticuerpo monoclonal de BBS es capaz de revertir la inhibición de la secreción ácida gástrica producida tras la administración *iv* de BBS. Por otra parte, el núcleo ambiguo, situado en el cerebro posterior, parece ser el lugar de acción más probable en el que los péptidos análogos a BBS ejercen su efecto supresor de la secreción ácida gástrica (Taché y cols., 1988).

Asimismo, tanto GRP como BBS estimulan la liberación de pepsinógeno por mecanismos mediados a través de su receptor que conllevan la movilización de  $Ca^{2+}$  intracelular. (Fiorucci y Mc Arthur, 1990).

#### 7.10.2. Secreción pancreática exocrina

La administración exógena de péptidos análogos a BBS en rata, además de aumentar el peso y tamaño del páncreas (Hajri y cols., 1989), eleva la liberación de amilasa pancreática, tanto *in vivo*, mediante estimulación vagal (Knuhtsen y cols., 1985), como *in vitro* (Jensen y cols., 1978; Scarpignato y cols., 1989).

Por otra parte, GRP aumenta la secreción de proteínas, jugo pancreático y bicarbonato a partir del páncreas, efecto mediado en parte por Ach (Holst y cols., 1987), y CCK endógeno (Hosotani y cols., 1989). Además, la secretina parece regular la liberación de bicarbonato pancreático inducida por GRP, pero no en la liberación de proteínas pancreáticas (Glad y cols., 1994).

### 7.11. Efecto de GRP/bombesina sobre la secreción hormonal

#### 7.11.1. Secreción hormonal hipofisaria

##### a) Prolactina y hormona de crecimiento

En 1978, Rivier y cols. describieron por primera vez el efecto de BBS sobre la secreción de PRL y GH, encontrando que este péptido estimula la liberación de las dos hormonas *in vivo*. Dado que los péptidos opioides están implicados en la liberación de PRL, se estudió el efecto de la administración de naloxona sobre la estimulación de GH inducida por BBS, encontrándose que este antagonista de receptores opioides revierte el efecto, lo que sugiere un mecanismo de acción mediado por péptidos opioides. Sin embargo, estudios posteriores muestran resultados muy distintos, ya que en ellos se observa cómo la administración de GRP en el ventrículo lateral y en el tercer ventrículo no modifica los niveles plasmáticos de PRL en ratas macho (Matsushita y cols., 1983) y sin embargo sí disminuye la concentración

plasmática de GH en ratas hembras ovariectomizadas (Kentroti y Mc Cann, 1985) en condiciones basales.

Posteriormente, Kentroti y cols. (1988a) encontraron indicios de la posible función de GRP como regulador endógeno de la secreción de ambas hormonas *in vivo*, ya que la administración en el tercer ventrículo de un anticuerpo anti-GRP en ratas hembras ovariectomizadas produce un aumento en los niveles plasmáticos de PRL y GH. Sin embargo, estos resultados no se reproducen en experimentos realizados *in vitro*, ya que antagonistas de GRP no son capaces de modificar los niveles basales de ambas hormonas en disociados de adenohipófisis (Houben y Deneff, 1991a).

En cuanto al mecanismo de acción de estos dos efectos, cabe destacar que la administración icv, pero no iv de GRP disminuye el aumento de PRL inducido por el análogo de met-enk FK33-824, y por el agonista dopaminérgico domperidona (Matsushita y cols., 1983). Más recientemente, Manzanares y cols. (1991) demostraron que la administración de GRP y/o BBS produce un aumento de la actividad dopaminérgica en la EM y en el lóbulo neural de la hipófisis, hecho que va acompañado de una disminución de PRL plasmática. Estos estudios sugieren un efecto inhibitorio de GRP sobre la liberación de PRL a nivel del SNC actuando sobre receptores opioides y estimulando la liberación de DA. Asimismo, la administración central de BBS en ratas ovariectomizadas inhibe los niveles plasmáticos de PRL al tiempo que aumenta la actividad del enzima tirosina-hidroxilasa (Babu y Vijayan, 1983). Por otra parte, la administración icv y en el tercer ventrículo de GRP o BBS, además de inhibir la secreción de GH en condiciones basales, como se ha mencionado anteriormente, es capaz de inhibir el aumento de GH producido por GH-RH (Kentroti y Mc Cann, 1985; Wakabayashi y cols., 1985). Por tanto, y dado que la administración de un antagonista dopaminérgico revierte el efecto inhibitorio de GRP sobre la secreción de ambas hormonas, el mecanismo por el que este neuropéptido inhibe la liberación de PRL y GH es el siguiente: GRP podría estimular la liberación de DA a partir de neuronas tuberoinfundibulares, lo que 1) estimularía la liberación de somatostatina hipotalámica, que a su vez inhibe la liberación de GH tanto basal como inducida por GH-RH, y 2) alcanza la hipófisis a través del sistema portal hipofisario, inhibiendo así la liberación de PRL a partir de los lactotrofos hipofisarios (Abe y cols., 1981; Kabayama y cols., 1984; Kentroti y Mc Cann, 1985; Kentroti y cols., 1988b; Manzanares y cols., 1991; Kentroti y Mc Cann, 1996).

Por otra parte, la administración central de BBS previamente a la exposición de los animales a una situación de estrés inhibe de forma muy potente la liberación de PRL por un mecanismo no mediado por receptores opiáceos, mientras que los niveles plasmáticos de GH no se modifican (Taché y cols., 1979).

Por último, GRP y BBS parecen aumentar la liberación de GH en células adenohipofisarias de rata (Kentroti y Mc Cann, 1985), bovinas (Bicknell y Chapman, 1983) y en células GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> (Westendorf y Schonbrunn, 1982; Bjoro y cols., 1987) y GH<sub>3</sub>. Este efecto está potenciado por estradiol, 5  $\alpha$ -dihidrotestosterona y dexametasona (Houben y Deneff, 1990). Sin embargo, los resultados obtenidos en experimentos *in vitro* sobre la secreción de PRL son contradictorios, ya que en algunos casos no se observan modificaciones (Matsushita

y cols., 1983), mientras que otros estudios muestran un efecto estimulador de GRP sobre la liberación de esta hormona, que es potenciado por 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona y estradiol e inhibido por dexametasona (Houben y Deneff, 1990). Sin embargo, el hecho de que BBS apenas tengan efecto sobre GH y PRL cuando es administrada por vía iv en humanos y en ratas (Morley y cols., 1980; Pontiroli y col., 1980; Gullner y Yajima, 1983), y que GRP se encuentre localizado en áreas cerebrales ricas en neuronas somatostatinérgicas, además de estimular la liberación de somatostatina a partir de la EM hipotalámica (Kentroti y cols., 1988b) sugiere que ambos péptidos ejercen su acción principalmente a nivel hipotalámico y por el mecanismo antes mencionado. A pesar de ello, existen estudios donde se ha encontrado que la administración periférica de BBS es capaz de inhibir el aumento de GH inducido por GH-RH, y de aumentar la secreción de BBS en ratas macho tratadas con estrógenos (Benitez y cols., 1990).

#### b) ACTH

El efecto de BBS y GRP sobre la secreción de ACTH se ha estudiado tanto *in vivo* como *in vitro*, y se detalla en el apartado 9.1.

#### c) Gonadotropinas

La administración en el tercer ventrículo de BBS en ratas hembras ovariectomizadas no produjo modificaciones en los niveles plasmáticos de gonadotropinas (Babu y Vijayan, 1983). Sin embargo, estudios posteriores en ratas macho sí detectaron alguna modificación en los niveles plasmáticos de estas hormonas, como se describe a continuación.

#### Hormona luteinizante

La administración icv del antagonista de GRP [D-Tpi<sup>6</sup>-Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina en ratas macho castradas disminuye los niveles plasmáticos de LH. Dado que una posterior inyección central de GRP revierte este efecto, y que la administración de ambos compuestos por vía iv no modifica la concentración plasmática de LH, puede sugerirse que el mecanismo por el cual GRP afecta la secreción plasmática de LH está mediada a través de su receptor a nivel central (Pinsky y cols., 1992a). Por el contrario, estos mismos autores no observaron ningún efecto tras la administración iv tanto de GRP como de su antagonista [D-Tpi<sup>6</sup>-Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina. Este último resultado está de acuerdo con estudios anteriores realizados en humanos donde no se observan variaciones de LH en respuesta a infusiones de BBS (Morley y cols., 1980; Pontiroli y cols., 1980; Pontiroli y Scarpignato, 1986). Aunque infusiones de BBS en humanos aumentan los niveles de LH en respuesta a LH-RH (Pontiroli y Scarpignato, 1986); sin embargo, la administración iv del antagonista de GRP [D-Tpi<sup>6</sup>-Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina en ratas no modifica la liberación de LH inducida por LH-RH (Pinsky y cols., 1992a). Estos resultados, aparentemente contradictorios, pueden explicarse teniendo en cuenta que los experimentos se han realizado en especies diferentes y porque las dosis utilizadas de antagonistas no son lo suficientemente altas como para afectar la función hipofisaria.

Por último, cabe destacar que la administración central de BBS previamente a la exposición de los animales a una situación de estrés no modifica la liberación de LH (Taché y cols., 1979).

#### Hormona estimulante del folículo

La administración iv de BBS en humanos no tiene efecto sobre los niveles plasmáticos de FSH (Morley y cols., 1980), pero si es capaz de aumentar la liberación de FSH en respuesta a LH-RH (Pontiroli y Scarpignato, 1986). Sin embargo, en ratas, la administración iv del antagonista del receptor de GRP [D-Tpi<sup>6</sup>-Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina en ratas no modifica la respuesta de FSH a LH-RH, y la administración tanto icv como iv de GRP o de su antagonista no modifica los niveles plasmáticos de FSH (Gullner y Yajima, 1983; Pinski y cols., 1992a). Estos resultados no son contradictorios, teniendo en cuenta que los experimentos se han realizado en especies diferentes.

#### d) Oxitocina y arginina-vasopresina

Estudios en rata muestran como la administración de BBS, incluso a dosis elevadas, no modifican los niveles plasmáticos de oxitocina. Sin embargo, la administración de este neuropéptido en monos si parece elevar la secreción neurohipofisaria de AVP (Verbalis y cols., 1988).

#### e) Tirotropina o TSH

La administración iv de BBS no modifica los niveles plasmáticos de TSH en humanos (Morley y cols., 1980), pero si los disminuye en respuesta a TRH (Pontiroli y Scarpignato, 1986); sin embargo, la administración iv, pero no icv, de GRP en rata inhibe la liberación de TSH (Mitsuma y cols., 1985; Krowicki y Sadowska-Krowicka, 1989). Este efecto inhibitorio de GRP sobre la secreción de TSH se ha observado también en estudios *in vitro* (Moura y cols., 1999). Por otra parte, GRP inhibe la liberación de TSH inducida por TRH *in vivo* (Krowicki y Sadowska-Krowicka, 1989) e *in vitro*, efecto que se revierte tras la administración de un antagonista de GRP, lo que sugiere la posible función de GRP sobre la regulación hormonal tiroidea (Santos y cols., 1995).

### 7.11.2. Otras hormonas

#### a) Hormonas hipotalámicas

La administración icv de BBS en rata induce la liberación de somatostatina hipotalámica a la circulación portal hipofisaria, la cual, a su vez, inhibe la liberación de GH a nivel de la hipófisis (Abe y cols., 1981).

#### b) Hormonas gastrointestinales

GRP juega un papel importante en la regulación hormonal gástrica, intestinal y

pancreática, debido a su liberación de forma endógena por distintos mecanismos, entre ellos la estimulación vagal y colinérgica (Nishi y cols., 1985). Concretamente, GRP regula la liberación tanto de gastrina, secretada por el estómago, como de CCK y secretina, liberadas a nivel intestinal, además de mediar la secreción pancreática exocrina y endocrina.

### Gastrina

La administración iv de GRP en humanos y en perros eleva las concentraciones plasmáticas de gastrina (Mc Donald y cols., 1981; Inoue y cols., 1983; Wood y cols., 1983). Además, GRP eleva la liberación de gastrina en otras especies animales como el gato (Vagne y cols., 1987) y la rata, tanto tras administración central como periférica (Taché y cols., 1981a y b). Es posible que este efecto se produzca por la acción directa de GRP sobre células G, ya que se ha demostrado que la BBS es capaz de aumentar la liberación de gastrina actuando directamente sobre células antrales G humanas (Squires y cols., 1999).

Los péptidos análogos a BBS estimulan la secreción de gastrina por un mecanismo mediado a través del nervio vago, ya que la administración de un antagonista del receptor de GRP redujo la liberación de gastrina producida por estimulación vagal en ratas (Weigert y cols., 1996). Además, el efecto de GRP sobre la secreción de gastrina parece ser sensible al bloqueo por antagonistas colinérgicos, como se ha demostrado en humanos (Fletcher y cols., 1983).

Por último, cabe destacar que GRP parece ser uno de los reguladores endógenos de la liberación de gastrina, ya que la administración de anticuerpo anti-GRP o de un antagonista del receptor de GRP es capaz de bloquear el efecto liberador de gastrina inducido por la administración exógena de GRP, así como la liberación de gastrina producida tras estimulación vagal (Takagi y cols., 1987; Weigert y cols., 1996).

### Colecistoquinina

La administración iv de GRP en humanos, perros y ratas eleva las concentraciones plasmáticas de CCK (Mc Donald y cols., 1981; Inoue y cols., 1983; Wood y cols., 1983; Lewis y Williams, 1990), presumiblemente actuando sobre el intestino delgado, entre el duodeno y el yeyuno, e independientemente de la inervación vagal del intestino delgado (Lundell y cols., 1991). El aumento de CCK inducido por GRP también se ha observado *in vitro*, en perfusión de duodeno de rata (Nakano y cols., 1988).

### Secretina y péptido intestinal vasoactivo

La administración iv de GRP en cerdos anestesiados aumenta la liberación de secretina (Glad y cols., 1996). Además, GRP es capaz de estimular directamente la secreción de esta hormona a partir de células productoras de secretina (Chang y cols., 1998). Asimismo, GRP y BBS son capaces de elevar las concentraciones plasmáticas de otros péptidos gastrointestinales, como VIP en humanos (Ghatei y cols., 1982).

c) Secreción pancreática endocrina

Insulina y glucagón

La administración iv de GRP y BBS en humanos eleva los niveles de insulina y glucagón (Knigge y cols., 1984). Estos resultados contrastan con los encontrados por Scarpignato y cols. (1987 y 1988), quienes no observaron modificaciones en los niveles plasmáticos de insulina tras la administración de BBS en humanos por la misma vía, aunque sí encontraron que este péptido potencia la acción de la insulina tras la administración de glucosa. Por otra parte, estudios *in vivo* revelan que la administración iv del decapeptido terminal de GRP aumenta la secreción de insulina y glucagón en perro (Mc Donald y cols., 1981; Kawai y cols., 1988). Lo mismo ocurre tras la administración iv de GRP en oveja (Mc Donald y cols., 1988) y en rata y en ratón, donde, al igual que en humanos, se ha observado que GRP potencia la respuesta de la insulina sobre la liberación de glucosa (Pettersson y Ahren, 1987 y 1988). El efecto insulínico de GRP también se ha observado en monos (Figlewicz y cols., 1985).

Estudios *in vitro* revelan, al igual que los estudios *in vivo*, que GRP aumenta la secreción de insulina y potencia la respuesta de la insulina sobre la liberación de glucosa (Knuhtsen y cols., 1987; Gregensen y Ahren, 1996). Este efecto de potenciación, así como el mecanismo de acción intracelular por el que se produce, se ha demostrado *in vitro* (Gregensen y Ahren, 1996). Sin embargo, estudios realizados *in vitro* en los resultados han demostrado que en páncreas aislado de perro GRP estimula la liberación de insulina, pero no de glucagón (Hermansen y Ahren, 1990).

Por último, cabe destacar que el aumento de insulina producido por péptidos análogos a BBS parece tener su lugar de acción a nivel central, ya que la administración de BBS en el NVM o en el hipotálamo lateral aumentó los niveles plasmáticos de insulina y glucagón en la vena hepática (Iguchi y cols., 1984).

Polipéptido pancreático (PP)

La administración iv de GRP aumenta los niveles plasmáticos de PP en perro, oveja y gato (Mc Donald y cols., 1981; Inoue y cols., 1983; Vagne y cols., 1987; Mc Donald y cols., 1988). Este efecto parece estar mediado, al menos en parte, por CCK, ya que la administración iv del antagonista de CCK L-364,718 en perros fue capaz de inhibir la secreción de PP inducida por GRP (Hosotani y cols., 1989).

Somatostatina pancreática

Estudios *in vivo* e *in vitro* realizados en perro muestran como GRP, o su decapeptido terminal -GRP-10- no modifican la secreción de somatostatina (Kawai y cols., 1988; Hermansen y Ahren, 1990). Sin embargo, en estudios más recientes realizados en preparaciones de mucosa gástrica, se ha observado que tanto BBS como GRP estimulan la liberación de somatostatina actuando directamente sobre células somatostatinérgicas del

fundus, concretamente sobre células fúndicas D (Schubert y cols., 1991; Schaffer y cols., 1997) y sobre el antrum, activando de forma indirecta células somatostatinérgicas por estimulación de gastrina y activación de neuronas inhibitorias colinérgicas (Schubert y cols., 1991). Esta estimulación también se ha observado en el hombre, y su mecanismo de acción parece ser independiente de inervación vagal o colinérgica (Sjovall y cols., 1990). Sin embargo, en el cerdo, la estimulación de somatostatina inducida por GRP parece estar mediada por el nervio vago, ya que la administración de un antagonista de GRP bloquea la liberación vagal de somatostatina (Holst y cols., 1987).

Asimismo, BBS parece regular el sistema efector del receptor pancreático de somatostatina, tanto *in vivo* como *in vitro* (Alvaro-Alonso y cols., 1999).

d) Hormonas gonadales: testosterona

El hecho de que exista IR-GRP en células neuroendocrinas de la próstata humana (Di Sant'Agnese, 1986), en el tracto genital femenino de ratas hembras (Ghatei y cols, 1985) y en semen humano (Gnessi y cols., 1989), sugiere la posible función fisiológica de GRP en el sistema reproductor.

Así, Pinski y cols. (1992a) observaron una disminución de peso de la próstata de animales tratados con el antagonista de GRP [D-Tpi<sup>6</sup>-Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina; sin embargo, los niveles plasmáticos de testosterona no se modificaron tras la administración iv tanto de GRP como de su antagonista.

e) Hormonas tiroideas: triyodotironina (T3) y tiroxina (T4)

La presencia de GRP en células C tiroideas (Sunday y cols., 1988) sugieren su posible función en la regulación de la secreción hormonal tiroidea; así, la administración sc de BBS de forma crónica en rata durante 7 días produjo una elevación de peso de la glándula tiroidea, además de elevar la secreción de T3 y T4, lo que implica a los péptidos análogos a BBS en la regulación de la función tiroidea (Malendowicz y Miskowiak, 1990). La elevación de T4 también se observa en ratón, donde, además, se aprecia un efecto aditivo de GRP y TSH sobre la elevación de T4 (Ahren, 1989).

f) Parathormona

El efecto de la administración exógena de BBS sobre los niveles plasmáticos de hormona paratiroidea se ha estudiado en humanos, y los resultados son contradictorios. Mientras Pontiroli y cols. (1980) no observaron variaciones de dicha hormona tras la administración iv de BBS, un estudio posterior (Ghatei y cols., 1982) demuestra un marcado descenso en los niveles plasmáticos de hormona paratiroidea tras la administración de este neuropéptido.

g) Hormonas adrenales

El efecto de BBS y GRP sobre la secreción de cortisol y corticosterona se detalla en el apartado 9.1.

**7.12. Efecto de GRP/bombesina sobre la función cardíaca**

El efecto de BBS sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca depende en gran medida de la vía de administración y de la especie animal utilizada. Así, la administración local de BBS en el NTS disminuye la frecuencia cardíaca y no altera la presión arterial en rata (Carver-Moore y cols., 1991). En cambio, la administración de BBS en la amígdala aumenta la presión arterial pero no altera la frecuencia cardíaca en rata (Brown y Gray, 1988), y la disminuye cuando se administra icv (Fisher y cols., 1985). Estos mismos autores proponen que el aumento de la presión arterial inducido por BBS se lleva a cabo a través de un mecanismo  $\alpha$ -adrenérgico, probablemente a nivel de la médula adrenal, ya que la adrenalectomía previene este efecto, mientras que el descenso de la frecuencia cardíaca se produce, en parte, por un descenso de la inervación simpática y por aumento de la inervación parasimpática colinérgica del corazón, además de por estimulación vagal cardíaca (Fisher y Brown, 1984; Fisher y cols., 1985). Por otra parte, en un modelo experimental de shock hipovolémico en rata, la administración iv de BBS consiguió, de forma dosis-dependiente, restaurar la presión arterial, el pulso y la frecuencia cardíacas (Guarini y cols., 1989).

Además, se ha observado que ratones transgénicos que carecen del receptor BB3 desarrollan hipertensión (Ohki-Hamazaki y cols, 1997). Asimismo, se ha demostrado la posible relación existente entre GRP y enfermedades cardíacas crónicas, ya que se ha observado que individuos con fallo cardíaco crónico presentan niveles circulantes de GRP más bajos que individuos sanos (Nicholls y cols., 1992).

**7.13. Efecto de GRP/bombesina en procesos de aprendizaje**

Flood y cols. demostraron en 1987 que la alimentación justo después del aprendizaje incrementa la memoria en un proceso de entrenamiento por evitación de la sacudida de las patas en ratón. Algunos péptidos gastrointestinales, como CCK, aumentan la memoria en este tipo de entrenamiento pero su efecto se bloquea por vagotomía. Sin embargo, el efecto de la alimentación sobre la memoria no se bloquea por resección del nervio vago. Por ello se pensó que debían existir otros péptidos gastrointestinales que incrementasen el aprendizaje por un mecanismo independiente del nervio vago. Así se observó que en ratones entrenados en este tipo de test, la administración ip BBS o GRP aumentó el aprendizaje. En el caso de la administración icv fueron necesarias dosis mayores que las empleadas por vía ip, lo que sugiere que tanto GRP como BBS actúan en este caso a través de un mecanismo periférico. Además, estos dos péptidos son capaces de revertir la amnesia inducida por escopolamina. Por otra parte, el efecto inducido por GRP y BBS es tiempo dependiente, es decir, su efecto disminuye a medida que transcurre más tiempo desde el entrenamiento (Flood y Morley, 1987 y 1988).

**TABLA 9**  
**Efectos producidos por la administración exógena de péptidos análogos a bombesina**

<b>Efecto de la administración exógena de GRP o bombesina</b>	<b>Localización de inmunorreactividad a bombesina/GRP</b>	<b>Localización de receptores de GRP</b>
Inhibición de la secreción ácida gástrica (efecto ejercido vía SNC; Taché y cols., 1988)	Tejido gástrico (Gibbs y Smith, 1988) Cerebro (Moody y cols., 1981)	Cerebro (Ladenheim y cols., 1992)
Comportamiento (efecto ejercido vía SNC y sistema nervioso periférico (SNP): Incremento en sus hábitos de rascarse y acicalarse; Gmerek y Cowan, 1984)	Médula espinal (Panula y cols., 1988) Cerebro (Moody y cols., 1981)	Cerebro (Ladenheim y cols., 1992)
Descenso de temperatura corporal (efecto ejercido vía SNC; Brown y cols., 1977)	Cerebro (Moody y cols., 1981)	Cerebro (Ladenheim y cols., 1992)
Disminución de la motilidad gastrointestinal (efecto ejercido vía SNC y SNP; Porreca y cols., 1988)	Células nerviosas y fibras del tracto gastrointestinal (Furnes y cols., 1988; Porreca y cols., 1988)	Células musculares del tracto gastrointestinal (Moran y cols., 1988)
Disminución de la ingestión de alimentos (efecto ejercido vía SNC y SNP; Gibbs y Smith, 1988)	Tejido gástrico (Gibbs y Smith, 1988) Cerebro (Moody y cols., 1981)	Cerebro (Ladenheim y cols., 1992)
Aumento de la liberación de gastrina y estimulación del vaciamiento gástrico (efecto ejercido vía SNC y SNP; Walsh y cols., 1988; Makhoulf y Shubert, 1988)	Nervios estomacales próximos a las células G (Walsh y cols., 1988; Makhoulf y Schubert., 1988)	Células G (Vigna y cols., 1988)
Estimulación de la secreción exocrina pancreática (Holst y cols., 1988)	Nervios pancreáticos (Holst y cols., 1988; Mc Donald y cols., 1988)	Acinis pancreáticos (Jensen y cols., 1988a)
Estimulación de la secreción endocrina pancreática (efecto ejercido vía SNC y SNP; Mc Donald y cols., 1988)	"	"

## Introducción

<b>Efecto de la administración exógena de GRP o bombesina</b>	<b>Localización de inmunorreactividad a bombesina/GRP</b>	<b>Localización de receptores de GRP</b>
Aumento de la liberación de hormonas gastrointestinales (Jensen y cols., 1988b)	Nervios estomacales próximos a las células G (Walsh y cols., 1988; Makhlouf y Schubert., 1988)	Células G (Vigna y cols., 1988)
Liberación de hormonas hipofisarias	Hipófisis	Hipófisis y líneas celulares hipofisarias
⇒ Inhibición de GH y PRL <i>in vivo</i> (Kentroti y Mc Cann, 1985; Kentroti y cols., 1988a y b; Manzanares y cols., 1991)	(Larsen y cols., 1989a; Steel y cols., 1992)	(Westendorf y Schonbrunn, 1983; Houben y cols., 1994))
⇒ Aumento PRL y GH <i>in vitro</i> (Westendorf y Schonbrunn, 1982; Bjoro y cols., 1987; Houben y Deneff, 1990)		
⇒ Aumento ACTH <i>in vivo</i> (Olsen y cols., 1992) e <i>in vitro</i> (Hale y cols., 1984; Au y cols., 1997)		
Aumento de la liberación de cortisol y corticosterona (Thomas y Sander, 1985; Sander y Porter, 1988; Gunion y cols., 1989; Sander y Thomas, 1991)	Médula adrenal (Lemaire y cols., 1986)	?
Contracción de músculo liso (Porreca y cols., 1988)	-	Músculo liso (Sunday y cols., 1988)
Aumento de la liberación de hormonas tiroideas (Ahren, 1989)	Células C de tiroides (Sunday y cols., 1988)	-

*Resumen de los efectos producidos por la administración exógena de GRP y/o BBS y su relación con la presencia endógena de péptidos análogos a BBS y sus receptores en los tejidos afectados y en el lugar de acción.*

*-: no se ha detectado presencia de inmunorreactividad a GRP y/o receptores. ?: dato desconocido.*

## 8. Antagonistas del receptor de GRP y sus efectos farmacológicos

Existen dos clases de antagonistas de GRP, peptídicos y no peptídicos.

Los primeros en desarrollarse fueron los antagonistas peptídicos, obtenidos por modificación de la estructura de GRP o BBS (a excepción de los análogos de sustancia P, que se obtuvieron por modificaciones de este neuropéptido). Esta modificación estructural se realizó teniendo en cuenta que el heptapéptido C-terminal de BBS o GRP es el mínimo fragmento que interactúa con el receptor de GRP y produce actividad biológica (Broccardo y cols., 1976; Heimbrock y cols., 1988). A pesar de que se han obtenido antagonistas peptídicos competitivos y con gran afinidad por el receptor de GRP, éstos presentan inconvenientes importantes: en primer lugar, son poco estables, ya que se degradan fácilmente por peptidasas presentes en el tracto gastrointestinal, en la sangre, y en otros tejidos. Esto implica que la duración de su acción sea corta. Este inconveniente, unido a que el transporte de estos análogos desde el tracto gastrointestinal hacia la sangre es bastante pobre, hace que sean poco activos por vía oral, por lo que en la mayoría de los casos la forma de administración más recomendable es vía iv; además, son hidrosolubles, lo que impide su paso a través de la barrera hematoencefálica, y se excretan de forma rápida por el hígado y el riñón (Veber y Freidinger, 1985). Por último, estos análogos frecuentemente presentan propiedades agonistas, lo que limita su uso terapéutico y en investigación.

Por ello, en los últimos años el desarrollo de nuevos antagonistas se ha centrado en la síntesis de análogos no peptídicos, metabólicamente estables, activos por vía oral y capaces de atravesar la barrera hematoencefálica. Estos análogos se han desarrollado siguiendo dos líneas de investigación: en primer lugar, se han obtenido gracias a estrategias de diseño racional de fármacos. En segundo lugar, se ha procedido al ensayo de un gran número de compuestos mediante diferentes ensayos biológicos, entre ellos el procedimiento de unión de radioligandos (Betancur y cols., 1997).

### 8.1. Antagonistas peptídicos

Existen principalmente tres clases de antagonistas peptídicos del receptor de GRP (Jensen y Coy, 1991):

#### 8.1.1. Antagonistas peptídicos de clase I

Está formada por análogos de la sustancia P sustituidos por D-aminoácidos y su acción fue descrita por primera vez por Jensen y cols. (1984a), al observar que un antagonista de sustancia P era capaz de inhibir la secreción enzimática inducida por BBS en células acinares pancreáticas de cobaya. Posteriormente se observó que estos derivados eran capaces de bloquear distintas respuestas producidas por péptidos análogos a BBS, como se describe en la *tabla 10*, además de inhibir la unión de ligandos radiactivos de BBS al receptor de GRP (Houben y Deneff, 1991b; Jensen y Coy, 1991).

Los principales antagonistas de este grupo y más utilizados en investigación son [D-

Arg<sup>1</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>,Leu<sup>11</sup>]-SP o espántida, [D-Arg<sup>1</sup>, D-Pro<sup>2</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>,Leu<sup>11</sup>]-SP y [D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>,Leu<sup>11</sup>]-SP, cuya IC<sub>50</sub> (concentración que causa el 50% de inhibición de la secreción enzimática de BBS en acinares pancreáticos de cobaya o el 50% de la incorporación de [<sup>3</sup>H] timidina en células Swiss 3T3) se encuentra en el rango micromolar (Jensen y cols., 1984a y b, Corps y cols., 1985).

Por otro lado, y como se observa en la *tabla 10*, estos antagonistas son capaces de bloquear, en la mayoría de los casos, los efectos producidos *in vivo* por la administración exógena de BBS (Pappas y cols., 1985).

Sus principales inconvenientes son su baja potencia, ya que sólo son efectivos en el rango micromolar, y su falta de selectividad por el receptor de GRP (Houben y Denef, 1991b), ya que además de ser antagonistas de este receptor, se comportan como antagonistas de sustancia P (Jensen y cols., 1988b; Coy y cols., 1988). Es más, [D-Arg<sup>1</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>,Leu<sup>11</sup>]-SP o espántida es tóxico cuando se administra en el SNC a partir de 0,5 µg, pudiendo causar la muerte (Yachnis y cols., 1984). Es importante destacar también la actividad agonista parcial de estos compuestos en algunos estudios (Merali y cols., 1988a; Campos y cols., 1989), aunque no en otros (Jensen y cols., 1984b; Corps y cols., 1985). La variabilidad de los resultados obtenidos también se refleja en el hecho de que su efecto sobre la estimulación de la liberación de gastrina inducida por BBS depende del tipo de ensayo y de antagonista utilizado (Giraud y cols., 1987b; Holst y cols., 1987; Campos y cols., 1989).

La utilización de esta clase de antagonistas en distintos estudios ha revelado la posible intervención de péptidos análogos a BBS en la regulación endógena de la secreción gástrica (Makhlouf y Schubert, 1988) y pancreática (Holst y cols., 1989).

#### 8.1.2. Antagonistas peptídicos de clase II

La constituyen análogos de BBS en los que el aminoácido histidina (His) de la posición 12 ha sido sustituido por D-aminoácidos.

En 1975, Broccardo y cols. destacaron la importancia del aminoácido triptófano (Trp) en posición 8 y de His en posición 12 para la actividad biológica de la BBS. Estudios posteriores (Heinz-Erian y cols., 1987; Saeed y cols., 1989) en los que se sintetizaron más de 100 análogos con diferentes sustituciones de aminoácidos por D-aminoácidos sugirieron que tanto estas dos posiciones como la estereoespecificidad son fundamentales para determinar la actividad agonista o antagonista de un compuesto, y que la hidrofobicidad de un aminoácido es determinante para la afinidad a su receptor. Así, compuestos en los que el aminoácido His de la posición 12 se ha sustituido por D-Phe, D-p-clorofenilalanina y D-Tirosina (D-Tyr) se comportan como antagonistas, siendo el análogo [D-Phe<sup>12</sup>, Leu<sup>14</sup>] bombesina el que presenta una mayor afinidad. Sustituciones adicionales de otros aminoácidos mejoraron la afinidad 3 veces, siendo el análogo [D-Phe<sup>6,12</sup>] bombesina el que presenta mayor afinidad (Saeed y cols., 1989). Otros antagonistas de este grupo son [D-Phe<sup>12</sup>] bombesina y [Tyr<sup>4</sup>, D-Phe<sup>12</sup>] bombesina. Todos ellos presentan una IC<sub>50</sub> de 4 µM y no presentan actividad agonista a dosis mayores de 30 µM en células acinares pancreáticas de

cobaya (Heinz-Erian y cols., 1987; Saeed y cols., 1989). En cuanto a su afinidad por el receptor de GRP, es comparable a la de los análogos de sustancia P o ligeramente superior.

Al contrario que los análogos de sustancia P, estos antagonistas son efectivos a nivel del SNC y no producen toxicidad *in vivo* (Merali y cols., 1988a y b). Además, son más selectivos que los anteriores, aunque en algunos tejidos presentan afinidad por el receptor de sustancia P (Heinz-Erian y cols., 1987; Merali y cols., 1988a). Aun así, presentan inconvenientes, como su poca potencia (son sólo efectivos en rango micromolar), y baja solubilidad en agua, por lo que en general son poco útiles en estudios *in vivo*.

### 8.1.3. Antagonistas peptídicos de clase III

Está formada por análogos de BBS en los que el grupo (CO-NH) de la unión entre aminoácidos se ha reducido a CH<sub>2</sub>NH (unión entre aminoácidos de tipo  $\psi$ ) o a CH<sub>2</sub>O.

Dentro de este grupo destacan dos antagonistas por su selectividad y competitividad a nivel del receptor de GRP:

#### (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina

Este análogo presenta dos modificaciones estructurales con respecto a la BBS, péptido del que procede: por un lado la unión entre los aminoácidos 13 y 14 -CONH- se ha reducido a -CH<sub>2</sub>NH-. Por otra parte, el aminoácido Met de la posición 14 se ha sustituido por Leu.

Este antagonista está descrito como altamente específico y competitivo sobre el receptor de GRP (Severi y cols., 1989). Presenta una afinidad 100 veces mayor que la descrita para los análogos de sustancia P sustituidos por D-aminoácidos y para los análogos de [D-Phe<sup>12</sup>] bombesina (Coy y cols., 1988) y además es soluble en agua. Se comporta como antagonista *in vivo*, ya que inhibe la liberación de gastrina y el incremento de la motilidad gástrica y secreción ácida gástrica inducido por BBS (Rossowsky y cols., 1989; Holst y cols., 1990). Entre sus efectos endocrinos destaca su capacidad para bloquear el aumento de PRL inducido por estrógenos (Mai y Pan, 1993). Asimismo se ha demostrado su capacidad antagonista *in vitro*, al inhibir la secreción enzimática en células acinares pancreáticas y la incorporación de H<sup>3</sup>-timidina y el crecimiento autocrino en células Swiss 3T3 y SCLC (Coy y cols., 1988 y 1989).

Se desconoce el mecanismo por el cual este compuesto se comporta como antagonista. Se ha sugerido que debido a que la BBS tiene una hélice  $\beta$  entre los aminoácidos valina (Val) de la posición 10 y Leu de la posición 13, podría formarse un enlace por puentes de hidrógeno entre estos dos aminoácidos, al igual que se ha visto en análogos de somatostatina o de LH-RH (Rivier y Brown, 1978; Coy y cols., 1988), aunque esta hipótesis no es totalmente aceptada (Erne y Schwyzer, 1987).

Este péptido ha servido como base para el desarrollo de otros análogos de menor número de aminoácidos cuya síntesis es más sencilla y presentan mayor potencia que el

anterior; además, al reducirse la secuencia de aminoácidos se reduce también el número de sitios posibles de ataque para las proteasas y por tanto las posibilidades de degradación del péptido (Coy y cols., 1989 y 1990). Estudios posteriores demostraron, al igual que en los antagonistas de clase II, que la sustitución por D-aminoácidos en estos análogos de cadena corta se traduce en un incremento de su potencia. Un ejemplo de este tipo de antagonistas es [D-Phe<sup>6</sup>-Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina<sub>6-14</sub>, del que se conoce su actividad *in vitro*, pero no *in vivo* (Coy y cols., 1989).

[D-Trp<sup>6</sup>-Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina (RC-3095):

Este análogo presenta una modificación adicional con respecto al péptido anterior: la introducción del análogo de D-Trp, D-Trp, en la posición 6 en lugar del aminoácido arginina (Asn). Es un antagonista altamente específico y competitivo a nivel del receptor de GRP, capaz de bloquear la liberación de amilasa a partir de células acinares pancreáticas de rata (Jaworek y cols., 1992) y la secreción de gastrina, glucagón y LH, y además de la supresión de GH inducida por GRP (Pinski y cols., 1992a y b). Por otra parte, existen múltiples estudios en los que se describen las propiedades antitumorales de este compuesto, ya que es capaz de inhibir el crecimiento celular de distintos tumores humanos (Radulovic y cols., 1991; Milovanovic y cols., 1992; Yano y cols., 1992; Pinski y cols., 1993; Pinski y cols., 1994 a y b; Qin y cols., 1994a y b; Radulovic y cols., 1994; Shirahige y cols., 1994; Qin y cols., 1995) y de rata (Pinski y cols., 1994c).

Por último, y dentro de la clase III de antagonistas, parece ser que los análogos en los que la unión peptídica CO-NH se ha sustituido por CH<sub>2</sub>O presentan incluso mayor afinidad que los anteriores. Entre ellos cabe destacar Ac-[ψCH<sub>2</sub>O 25-26] GRP<sub>20-27</sub> (Saari y cols., 1989).

8.1.4. Otros antagonistas peptídicos

Debido a que [Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina presenta actividad agonista en algunas ocasiones, se planteó la búsqueda de nuevos antagonistas con mayor afinidad sobre el receptor de GRP.

Una primera aproximación consistió en la modificación del extremo carboxilo terminal de GRP, obteniéndose como resultando análogos desmetilados o alquilamidados (*tabla 11, compuestos I-IV*; Coy y cols., 1989; Heimbrock y cols., 1989; Saari y cols., 1989) con capacidad antagonista en células pancreáticas acinares y células Swiss 3T3. Esta modificación indica que el extremo carboxilo terminal de GRP/BBS es importante para activar el receptor de GRP e iniciar la respuesta biológica, pero no es determinante para la unión del compuesto al receptor (Houben y Denef, 1991b). La introducción de D-Phe en posición 6 en estos péptidos mejora la capacidad antagonista; esta última modificación, unida a la sustitución del extremo carboxilo terminal por un residuo alquilamida aumenta la afinidad del compuesto por el receptor. Así surgen (D-Phe<sup>6</sup>) bombesina<sub>6-13</sub> propilamida y (D-Tyr<sup>6</sup>) bombesina<sub>6-13</sub> propilamida (Coy y cols., 1989), que presentan una potencia ligeramente superior a la de los antagonistas de clase III. Este último antagonista es capaz de inhibir la liberación de ACTH inducida por CRF y potenciada por BBS en células adenohipofisarias ovinas (Au y cols., 1997).

De forma paralela al desarrollo de estos compuestos, Heimbrook y cols., (1989) encontraron que la supresión del aminoácido Met en posición 27 de GRP y/o la sustitución del extremo carboxilo terminal por un residuo N-acetilado daba como resultado compuestos con actividad antagonista (*tabla 11, compuesto V*). Estos compuestos resultaron ser antagonistas capaces de inhibir la liberación de insulina y glucagón inducida por GRP en ratón (Karlsson y Ahren, 1990). A partir de N-acetil GRP<sub>20-26</sub> amida, se obtuvieron distintos análogos que resultaron ser más potentes que [Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesina, gracias a la sustitución del aminoácido Met del extremo carboxilo terminal por Leu y reemplazando la última unión peptídica por una unión eter (*tabla 11, compuesto VI*; Saari y cols., 1989). La inclusión de un grupo carbamoilo en este último compuesto dio como resultado un antagonista más potente que el anterior (Saari y cols., 1989). Por otro lado, a partir de los análogos desmetilados en posición 27, y por adición de grupos dadores de electrones como hidrazidas (*tabla 11, compuesto VII*; Camble y cols., 1989; Heimbrock y cols., 1989; Wang y cols., 1990), ésteres (*tabla 11, compuesto VIII y IX*; Heimbrock y cols., 1989; Wang y cols., 1990), o grupos alquil amida, se obtuvieron potentes antagonistas. Concretamente, (D-Phe<sup>6</sup>) bombesina<sub>6-13</sub> metil ester es capaz de inhibir la secreción de amilasa inducida por GRP en rata (Varga y cols., 1991; Coy y cols., 1992), así como la liberación de insulina tanto basal como inducida por BBS en rata (Varga y cols., 1994), lo que sugiere que los péptidos análogos a BBS regulan de forma endógena la liberación de insulina.

Otro grupo de antagonistas se obtuvo partiendo de N-acetil GRP<sub>20-26</sub> amida, sustituyendo su extremo terminal por un residuo etil eter o alquil amida. Los compuestos con residuo alquil amida resultaron ser más potentes (Houben y Deneff, 1991b).

En 1993 y 1994, Leban y cols. desarrollaron otro grupo de antagonistas del receptor de GRP por introducción de un grupo D-Pro-ψ[CH<sub>2</sub>NH]Phe-NH<sub>2</sub> en el extremo C-terminal y/o residuos aromáticos en el extremo N-terminal (*tabla 11, compuesto X*), que resultaron ser potentes antagonistas.

De forma paralela a este grupo, Cai y cols. (1994) sintetizaron otra serie de análogos introduciendo en el extremo C-terminal un grupo Leu-ψ(CH<sub>2</sub>-N)Tac-NH<sub>2</sub> o un derivado de este grupo, siendo Tac un análogo del aminoácido Cys. Estos análogos resultaron ser potentes antagonistas, al ser capaces de desplazar la unión del radioligando [I<sup>125</sup>-Tyr<sup>4</sup>] BBS de su unión al receptor en concentraciones <0,001 nM e inhibir el crecimiento celular en distintas líneas celulares tumorales (*tabla 11, compuesto XI*).

Asimismo, destacan dentro de los antagonistas peptídicos una serie de análogos desarrollados por Edwards y cols. en 1994, en los que la introducción del grupo [Phe<sup>13</sup>ψ[CH<sub>2</sub>S]Leu<sup>14</sup>] en la secuencia peptídica de BBS da como resultado potentes antagonistas pseudopeptídicos activos en el rango nanomolar y capaces de inhibir el aumento del recambio de fosfoinosítidos en páncreas de ratón inducido por BBS (*tabla 11, compuesto XII*). Por otra parte, los análogos sintetizados más recientemente se han obtenido incluyendo un residuo hidroxiamida en el extremo carboxilo-terminal (Devin y cols., 1999), o sustituyendo el aminoácido Leu de la posición 13 por un residuo estatil, o por un residuo con un grupo hidroxilo en lugar del grupo carbonilo, lo que da lugar a antagonistas activos en el rango

nanomolar (Llinares y cols., 1999).

**TABLA 11**  
**Principales antagonistas peptídicos de GRP**

<b>Clase I: Análogos de Sustancia P sustituidos por D-aminoácidos</b>	[D-Arg <sup>1</sup> , D-Trp <sup>7,9</sup> , Leu <sup>11</sup> ]-SP o espántida [D-Arg <sup>1</sup> , D-Pro <sup>2</sup> , D-Trp <sup>7,9</sup> , Leu <sup>11</sup> ]-SP [D-Arg <sup>1</sup> , D-Phe <sup>5</sup> , D-Trp <sup>7,9</sup> , Leu <sup>11</sup> ]-SP
<b>Clase II: [Derivados de D-Phe]<sup>12</sup> bombesina</b>	[D-Phe <sup>12</sup> , Leu <sup>14</sup> ] bombesina [D-Phe <sup>6,12</sup> ] bombesina [Tyr <sup>4</sup> , D-Phe <sup>12</sup> ] bombesina
<b>Clase III: Análogos de BBS con unión peptídica reducida</b>	⇒ <i>Sustitución de la unión -CONH- por -CH<sub>2</sub>NH-</i> {Leu <sup>13</sup> -ψ-CH <sub>2</sub> NH-Leu <sup>14</sup> } bombesina {D-Phe <sup>6</sup> -Leu <sup>13</sup> -ψ-CH <sub>2</sub> NH-Leu <sup>14</sup> } bombesina <sub>6,14</sub> {D-Tpi <sup>6</sup> -Leu <sup>13</sup> -ψ-CH <sub>2</sub> NH-Leu <sup>14</sup> } bombesina o RC-3095  ⇒ <i>Sustitución de la unión -CONH- por -CH<sub>2</sub>O-</i> Ac-[ψCH <sub>2</sub> O 25-26] GRP <sub>20,27</sub>
<b>Otros antagonistas</b>	(I) Bombesina <sub>1-10</sub> NH <sub>2</sub> (II) Bombesina <sub>6-13</sub> NH <sub>2</sub> (III) Bombesina <sub>6-13</sub> etilamida (IV) (D-Phe <sup>6</sup> ) Bombesina <sub>6-13</sub> propilamida (D-Tyr <sup>6</sup> ) Bombesina <sub>6-13</sub> propilamida (V) N-acetil GRP <sub>20-26</sub> amida (VI) {Leu <sup>26</sup> -ψ-CH <sub>2</sub> O-Leu <sup>27</sup> }-N-acetil GRP (VII) (D-Phe <sup>6</sup> ) BBN <sub>6-13</sub> hidrazida (VIII) (D-Phe <sup>6</sup> ) BBN <sub>6-13</sub> metil ester/etil ester (IX) Ac (GRP) <sub>20-26</sub> etil ester (X) Fenil-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> (CO)His-Trp-Val-D-Ala-His-D-Pro-ψ-Phe-NH <sub>2</sub> (XI) [Tpi <sup>6,13</sup> ψ <sup>14</sup> , CH <sub>2</sub> N, Tac <sup>14</sup> ] bombesina <sub>6-14</sub> Phe <sup>13</sup> ψ[CH <sub>2</sub> S]Leu <sup>14</sup> ] bombesina

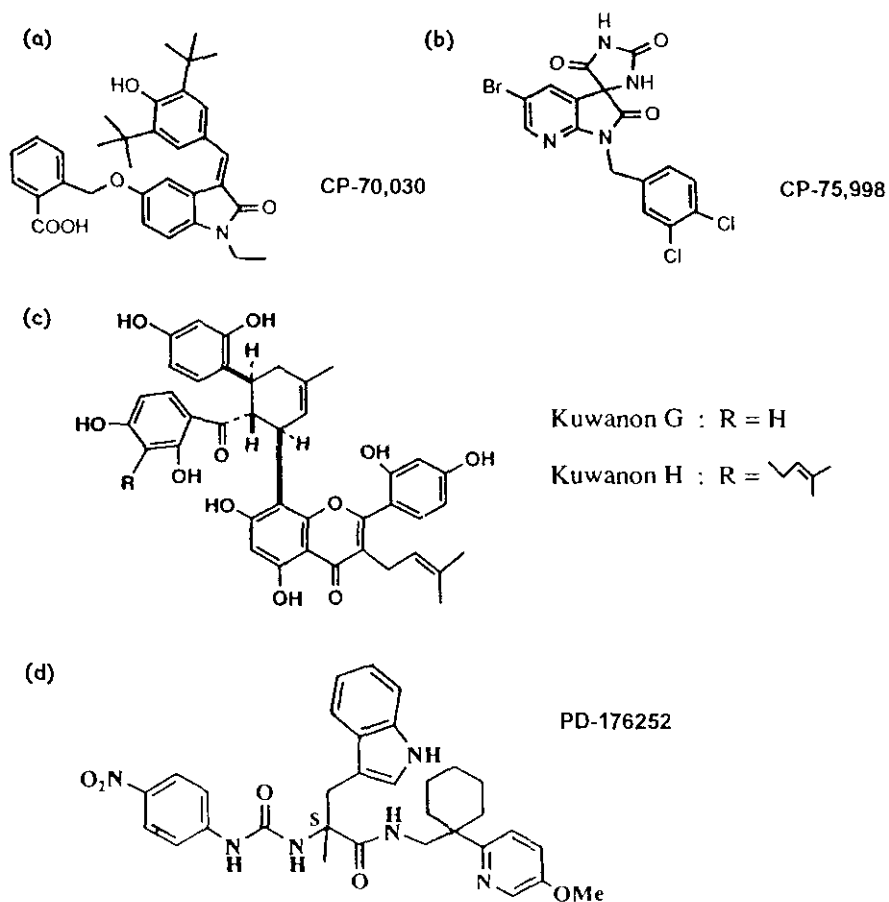
## 8.2. Antagonistas no peptídicos

Los primeros antagonistas no peptídicos del receptor de GRP fueron sintetizados por Valentine y cols. en 1992. Estos dos compuestos, CP-70,030 y CP-75,998 (*figura 11, compuestos a y b*) fueron identificados como antagonistas del receptor de GRP mediante ensayo de unión de radioligandos, ya que ambos, en concentraciones del rango micromolar, fueron capaces de desplazar el radioligando <sup>125</sup>I-GRP de la unión a su receptor en cerebro de rata. Estos compuestos demostraron capacidad antagonista al inhibir el recambio de fosfoinosítidos inducido por BBS, aunque fueron incapaces de desplazar el radioligando

anteriormente mencionado de su unión al receptor de GRP en células SCLC.

En 1995, Mihara y cols. obtuvieron dos nuevos antagonistas no peptídicos del receptor de GRP, llamados *Kuwanon G* y *H* (figura 11 c), a partir del extracto metabólico de la especie de morera *Morus Bombycis*. *Kuwanon H* demostró ser más potente que *Kuwanon G*, y su capacidad antagonista quedó de manifiesto al desplazar, en concentraciones del rango nanomolar, el radioligando  $^{125}\text{I}$ -GRP de la unión a su receptor, e inhibir el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular y la incorporación de timidina inducida por BBS en células Swiss 3T3.

**FIGURA 11**  
**Antagonistas no peptídicos del receptor de GRP**



Recientemente se ha desarrollado un nuevo antagonista del receptor de GRP, llamado PD 176252 (figura 11d), descrito como competitivo y con gran afinidad por el receptor de GRP en el rango nanomolar (Ashwood y cols., 1998).

**TABLA 10**

**Efecto de antagonistas peptídicos de GRP tipo I, II y III sobre la unión de radioligandos de bombesina a su receptor y sobre distintos efectos producidos por péptidos análogos a bombesina in vivo e in vitro**

<b>Efecto ejercido por el antagonista</b>			
<b><i>Acción ejercida por péptidos análogos a bombesina</i></b>	<b><i>Unión de radioligandos</i></b>	<b><i>In vivo</i></b>	<b><i>In vitro</i></b>
<i>Modificación de la actividad del sistema nervioso autónomo</i>	☞ <u>clase I</u> : + Yachnis y cols., 1984; Merali y cols., 1988b; Moody y cols., 1988 ☞ <u>clase II</u> : + Merali y cols., 1988a ☞ <u>clase III</u> : + Dickinson y cols., 1988	☞ <u>clase I y II</u> : - Brown y cols., 1988	----
<i>Estimulación de la secreción ácida gástrica</i>	----	☞ <u>clase III</u> : + Rossowski y cols., 1989	----
<i>Inhibición de la secreción ácida gástrica</i>	----	☞ <u>clase I</u> : - Taché y Gunion, 1985 ☞ <u>clase II</u> : + Taché y cols., 1988	----
<i>Comportamiento (Incremento en sus hábitos de escarbar y acicalarse)</i>	----	☞ <u>clase I</u> : + y - Yachnis y cols., 1984; Cowan y cols., 1985; Moody y cols., 1988 ☞ <u>clase II</u> : + Merali y cols., 1988b ☞ <u>clase III</u> : - Cowan y cols., 1988	----
<i>Descenso de temperatura corporal</i>	----	☞ <u>clase I</u> : + y - Yachnis y cols., 1984; Cowan y cols., 1985	----
<i>Disminución de la motilidad gastrointestinal</i>	----	----	☞ <u>clase III</u> : + Holst y cols., 1990
<i>Disminución de la ingestión de alimentos</i>	----	☞ <u>clase I</u> : + Merali y cols., 1988a ☞ <u>clase II</u> : + Merali y cols., 1988a ☞ <u>clase III</u> : + Merali y cols., 1993	----

**Efecto ejercido por el antagonista**

<i>Aumento de la liberación de gastrina y estimulación del vaciamiento gástrico</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>tipo I</u>: + Vigna y cols., 1988</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>tipo I</u> :- Pappas y cols., 1985</li> <li>☉ <u>clase III</u>: + Kovacs y cols., 1988</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>tipo I</u>: + y - Campos y cols., 1989; Giraud y cols., 1987b</li> <li>☉ <u>clase III</u>: + Campos y cols., 1989; Holst y cols., 1990</li> </ul>
<i>Estimulación de la secreción pancreática exocrina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase I</u>: + Jensen y cols., 1984a; Jensen y cols., 1988b</li> <li>☉ <u>clase II</u>: + Heinz-Erian y cols., 1987</li> <li>☉ <u>clase III</u>: + Coy y cols., 1988</li> </ul>	----	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase I</u>: + Jensen y cols., 1984 a y b; 1988b</li> <li>☉ <u>clase II</u>: + Heinz-Erian y cols., 1987; Saeed y cols., 1989</li> <li>☉ <u>clase III</u>: + Coy y cols., 1988</li> </ul>
<i>Estimulación de la secreción pancreática endocrina</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase II y III</u>: + Mukai y cols., 1990</li> </ul>	----	----
<i>Contracción de músculo liso</i>	----	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase I</u>: + Reynolds y cols., 1986</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase I</u>: + Mizrahi y cols., 1985</li> <li>☉ <u>clase III</u>: + Severi y cols., 1989</li> </ul>
<i>Estimulación de la secreción de hormonas gastrointestinales</i>	----	----	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase III</u>: + Cuber y cols., 1990; Holst y cols., 1990</li> </ul>
<i>Liberación de hormonas hipofisarias</i> <ul style="list-style-type: none"> <li>☉ Inhibición de GH in vivo</li> <li>☉ Aumento de PRL y GH in vitro</li> </ul>	----	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase III</u>: + y - Rossowski y cols., 1989; Pinski y cols., 1992b</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>☉ <u>clase III</u>: + Houben y cols., 1990</li> </ul>

+ : efecto antagonista sobre la acción indicada; - : no se observa efecto antagónico sobre la acción indicada; ---- : no existen estudios

## **9. GRP y el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

### **9.1. Regulación de la secreción hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por GRP**

La distribución anatómica de GRP en el eje HHA, como se ha descrito en el apartado 3, y el efecto de GRP y péptidos análogos sobre la secreción hormonal hipofisaria, como se ha descrito en el apartado 7.11.1., sugieren la participación de este neuropéptido en la regulación del eje HHA.

Thomas y Sander en 1985 describen por primera vez el efecto de la BBS sobre la secreción de ACTH y cortisol en perro. Este estudio muestra cómo la administración iv de BBS eleva los niveles plasmáticos de ambas hormonas, resultados que se repiten posteriormente tras administración iv de GRP e ip de BBS en rata (Sander y Porter, 1988; Sander y Thomas, 1991). Por otra parte, estos datos están de acuerdo con los obtenidos en humanos (Knigge y cols., 1987), donde la administración iv de GRP eleva de forma marcada y duradera los niveles de ACTH y cortisol, y los valores obtenidos son similares a los observados tras administración iv de CRF (Orth y cols., 1983). Sin embargo, las dosis utilizadas en estos experimentos son relativamente altas, hecho que sugiere que GRP puede aumentar la liberación de ACTH y corticosterona actuando a nivel central, y de aquí las altas dosis requeridas, necesarias para evitar que el péptido se degrade y pueda atravesar la barrera hematoencefálica, ejerciendo así su efecto sobre el cerebro.

Aunque algunos autores no han observado modificaciones de los niveles plasmáticos de corticosterona tras administración de BBS en la cisterna magna (Brown y cols., 1979), estudios más recientes demuestran como la administración icv de GRP o la administración en el tercer ventrículo de BBS a dosis relativamente bajas aumenta las concentraciones plasmáticas de ACTH y corticosterona en rata (Gunion y cols., 1989; Olsen y cols., 1992; Merali y cols., 1994). En humanos, la administración iv de GRP eleva los niveles plasmáticos de ACTH y cortisol (Knigge y cols., 1987). Estos estudios sugieren la posible mediación de otros secretagogos de ACTH como CRF y/o AVP en el efecto estimulador de GRP sobre la secreción de ambas hormonas; sin embargo, estos autores no profundizan en algunos aspectos, como son las dosis y los tiempos a los que GRP ejerce su efecto, así como el mecanismo de acción y el lugar exacto del eje HHA sobre el que GRP puede ejercer su acción, y su función en la regulación de estas hormonas en situación basal y de estrés. Todos estos aspectos son abordados en la presente tesis doctoral.

Asimismo, existen bastantes estudios *in vitro* sobre la influencia de GRP en la liberación de ACTH. Aunque algunos autores niegan que este neuropéptido tenga algún efecto sobre la liberación de esta hormona tanto en disociados de adenohipófisis (Watabane y Orth, 1988) como en la línea celular AtT20 (Westendorf y Schonbrunn, 1982), la mayoría de los estudios realizados hasta la fecha muestran como GRP y BBS son capaces de estimular la liberación de ACTH en disociados de adenohipófisis. Además, ambos péptidos potencian la liberación de ACTH inducida por CRF (Hale y cols., 1984; Au y cols., 1997). Esta potenciación, que se consigue con concentraciones de GRP similares a las encontradas en el sistema portal hipofisario ovino (Giraud y cols., 1990), depende tanto de la activación del receptor de GRP (Au

y cols., 1997) como de la presencia de glucocorticoides (Familiari y cols., 1988), y puede explicarse por la co-activación de dos cascadas de segundos mensajeros diferentes (Au y cols., 1997), la acoplada a proteína-quinasa A (PKA), por la que CRF aumenta la liberación de ACTH (King y Baertschi, 1990), y la acoplada a PKC, por la que parece que GRP ejerce la mayoría de sus funciones (Bjoro y cols., 1987; Muir y Murray, 1987).

Por otra parte, GRP no parece regular de forma tónica la liberación de ACTH en hipófisis, ya que la administración de un antagonista no modifica la secreción de esta hormona (Houben y Deneff, 1991a).

## **9.2. GRP y su implicación en procesos de ansiedad y estrés**

Como se ha mencionado anteriormente, la respuesta al estrés se caracteriza por una activación conjunta del eje HHA y de la división simpática del sistema nervioso autónomo. Esta activación también se observa en procesos de ansiedad y depresión. Distintos estudios sugieren la implicación de CRF en la respuesta al estrés, ya que su administración central aumenta los niveles plasmáticos de ACTH (Vale y cols., 1981; Rivier y cols., 1982a) y la administración tanto de un anticuerpo como de un antagonista de su receptor bloquea el aumento de ACTH y corticosterona inducido por estrés (Linton y cols., 1985; Ono y cols., 1985b; Arnold y cols., 1992). Por otra parte, GRP produce efectos endocrinos autonómicos y comportamentales similares a los producidos por CRF, lo que unido a su distribución regional, podría sugerir su mediación en procesos de estrés.

Taché y cols. (1979) observaron que la administración central de BBS no modifica el aumento de corticosterona producido tras someter a los animales a una situación de estrés por frío y por restricción de movimientos. Aunque este estudio no parece implicar a los péptidos análogos a BBS en la mediación de la respuesta al estrés, estudios más recientes sí apuntan a este hecho. Según Malendowicz y Nussdorfer (1995) la administración sc de BBS aumenta la secreción de ACTH y corticosterona en animales que han sido sometidos a estrés por frío. Más recientemente, Kent y cols. (1998) han observado un aumento de inmunorreactividad a BBS en el hipotálamo tras someter a los animales a 10 y 30 min de estrés por restricción de movimientos, y un aumento en la densidad de receptores de GRP tras 120 min de estrés en el NPV, ARC y NTS. Además, las variaciones en el contenido de CRF y péptidos análogos a BBS producidas por estrés en distintas regiones cerebrales es diferente según se utilicen razas de ratones reactivas o resistentes al estrés (Anisman y cols., 1998). También se ha observado que el estrés por exposición de las ratas a un depredador modifica el contenido de GRP en distintas regiones cerebrales relacionadas con el eje HHA, como son diversas estructuras límbicas y zonas discretas del tallo cerebral (Adamec y cols., 1998). Por otra parte, el estrés por restricción de movimientos aumenta la liberación de péptidos análogos a BBS en la EM hipotalámica y el núcleo central de la amígdala, región cerebral implicada en el comportamiento emocional (Kent y cols., 1997; Merali y cols., 1998). Este último estudio muestra como el aumento en la liberación de péptidos análogos a BBS en el núcleo central de la amígdala que se produce tras someter a los animales a estrés es menor que el aumento en la liberación de CRF, pero más sostenido en el tiempo, hecho que sugiere que estos péptidos pueden contribuir al mantenimiento de los cambios emocionales que se producen

tras una situación de estrés.

Existen además distintos estudios sobre la función de los péptidos análogos a BBS en procesos de ansiedad y depresión. Aunque no se han observado modificaciones en los niveles plasmáticos de péptidos análogos a BBS en pacientes con ansiedad y depresión (Saiz Ruiz y cols., 1992), estudios más recientes en animales de experimentación apuntan a la posible implicación de estos péptidos en procesos de ansiedad, ya que el tratamiento con un oligonucleótido antisentido del ARNm de GRP (administrado vía icv) en ratas mostró tener propiedades ansiolíticas, tanto en el test del laberinto elevado en cruz, como en el laberinto oval en forma de túnel (Plamondon y cols., 1996).

### **III. La serotonina como neurotransmisor del sistema nervioso central y regulador del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

A finales del siglo XIX, Stevens y Lee (1884) y Brodie (1900) demostraron por primera vez la existencia de una sustancia endógena vasoconstrictora. Observaron que el suero obtenido por coagulación era capaz de aumentar el tono vascular. Treinta años más tarde, Vialli y Erspamer (1933) caracterizaron una sustancia vasoconstrictora encontrada en altas concentraciones en células cromafines de la mucosa intestinal. A la sustancia aislada en sangre se la denominó “serotonina”, mientras que a la aislada en el tracto gastrointestinal se le llamó “enteramina”. La serotonina fue identificada como 5-hidroxitriptamina (5-HT) y se comprobó que era idéntica a la llamada “enteramina”. En 1951, Hamlin y Fischer la sintetizan. Pocos años más tarde se describió su presencia en cerebro y su distribución fue detallada en 1964 por Dahlstrom y Fuxe mediante técnicas de histofluorescencia. En el cuerpo humano adulto la 5-HT se encuentra principalmente en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal, en plaquetas y en el SNC. También se ha detectado 5-HT en mastocitos de otras especies. Al tratarse de una molécula que no puede atravesar la barrera hematoencefálica, la totalidad de la 5-HT presente en el SNC se sintetiza *in situ*.

La importancia de la 5-HT hoy en día radica, entre otras cosas, en su implicación en distintos tipos de alteraciones psiquiátricas como son la ansiedad, la depresión, la agresividad, el pánico, el trastorno obsesivo-compulsivo, la esquizofrenia, las tendencias suicidas y el autismo. También está implicada en enfermedades neurodegenerativas (Alzheimer, Parkinson y Corea de Huntington), migraña, emesis y adicción a drogas como el alcoholismo.

#### **1. Biosíntesis, almacenamiento, liberación, degradación y recaptación de la serotonina**

##### **1.1. Biosíntesis**

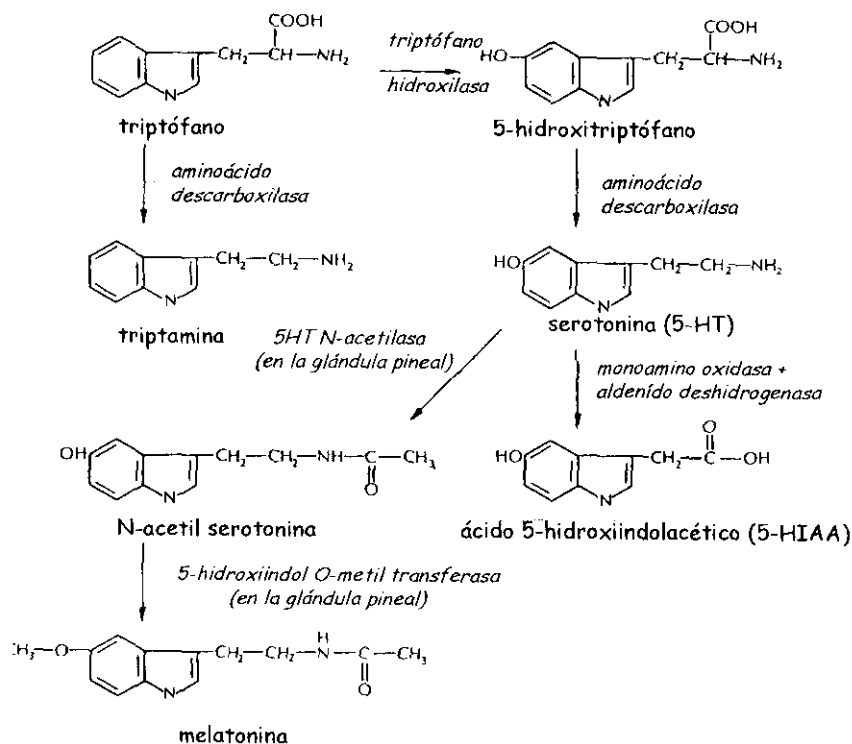
El primer paso de la biosíntesis de 5-HT es el transporte a través de la barrera hematoencefálica del aminoácido precursor L-Trp, punto de partida de la síntesis.

El Trp plasmático procede principalmente de la dieta, por lo que la eliminación de este aminoácido como componente alimentario puede disminuir drásticamente los niveles cerebrales de 5-HT. Este aminoácido atraviesa la barrera hematoencefálica por transporte activo. Los niveles de Trp en plasma presentan un ritmo circadiano, que influye en la proporción y síntesis de 5-HT en el cerebro.

El siguiente paso en la síntesis de 5-HT es la hidroxilación del L-Trp a 5-hidroxitriptófano (5-HTP) por el enzima L-triptófano-5-monooxidasa, conocida generalmente como triptófano hidroxilasa. Este enzima únicamente se encuentra en células que sintetizan 5-HT. La triptófano hidroxilasa es el enzima limitante en la síntesis de la 5-HT. No se satura por el sustrato, por lo que la formación de 5-HT en el cerebro está directamente ligada a la disponibilidad de Trp.

A continuación, el 5-HTP es descarboxilado por la L-aminoácido descarboxilasa y forma 5-hidroxitriptamina o 5-HT. La descarboxilación del 5-HTP es casi tan rápida como su síntesis, por lo que para su detección en cerebro es necesario bloquear el enzima. Este enzima no se encuentra exclusivamente en neuronas serotoninérgicas, ya que se ha detectado también en neuronas catecolaminérgicas (figura 12).

**FIGURA 12**  
**Síntesis y metabolismo de la serotonina**



## 1.2. Almacenamiento y liberación

La 5-HT sintetizada se almacena principalmente en vesículas y se libera por mecanismos de exocitosis. En algunos aspectos las vesículas que almacenan 5-HT se asemejan a las vesículas que almacenan catecolaminas. Por ejemplo, fármacos como la reserpina y la tetrabenazina, que actúan inhibiendo la actividad del transportador de la membrana vesicular, reducen los niveles cerebrales tanto de 5-HT como de catecolaminas. Por otra parte, las vesículas de almacenamiento de 5-HT se diferencian de las de catecolaminas en que no contienen ATP.

La proporción de 5-HT liberada depende de la magnitud de la descarga en los cuerpos celulares serotoninérgicos. Numerosos estudios han sugerido que los procesos que estimulan la descarga de neuronas serotoninérgicas aumentan la liberación de 5-HT en las áreas de proyección, mientras que procesos que la reducen, disminuyen la liberación de 5-HT. Por lo tanto, aquellos fármacos que modifican la descarga en los cuerpos celulares de neuronas serotoninérgicas también modifican la liberación de 5-HT. Este tipo de fármacos actúa sobre los autorreceptores somatodendríticos que son receptores del subtipo 5-HT<sub>1A</sub>. La administración de agonistas de este receptor como la 8-hidroxi-(dipropilamino)tetralina u 8-OH-DPAT en el núcleo dorsal del rafe disminuye la descarga en los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas. Por otra parte, estudios realizados con técnicas de microdiálisis *in vitro* han observado que la administración de agonistas de autorreceptores de los terminales serotoninérgicos, como los 5-HT<sub>1D</sub>, también disminuye la liberación de 5-HT (Hjorth y Tao, 1991).

## 1.3. Recaptación

El sistema de transporte para 5-HT está localizado en las terminaciones, soma y dendritas de las neuronas serotoninérgicas. De este modo, estudios de lesiones de neuronas serotoninérgicas han detectado una marcada reducción del transportador de 5-HT. Por otra parte, las células gliales también son capaces de captar 5-HT por una proteína transportadora muy similar al transportador de las neuronas serotoninérgicas.

El sistema de recaptación de 5-HT es saturable. La recaptación de 5-HT es un proceso activo dependiente de la temperatura y de las concentraciones extracelulares de Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup> en el que además interviene una ATPasa dependiente de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>. Existe un grupo de fármacos antidepressivos que actúan inhibiendo selectivamente el transportador de 5-HT, son los denominados inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS) como la fluoxetina y la paroxetina. Se ha sugerido que estos inhibidores se unen a puntos de la proteína transportadora impidiendo así la unión de 5-HT.

## 1.4. Degradación

La vía metabólica principal de la 5-HT es una desaminación oxidativa por el enzima monoaminoxidasa (MAO). La 5-HT por acción de la MAO se convierte en 5-hidroxiindolacetaldehído, que se oxida por la aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup>

para formar 5-HIAA. El 5-hidroxiindolacetaldehído también puede reducirse a 5-hidroxitriptofol por acción de la aldehído reductasa dependiente de NADH. El que se produzca una oxidación o una reducción depende del cociente  $NAD^+/NADH$  del tejido. En el cerebro, el 5-HIAA es el metabolito principal de la 5-HT (figura 12).

Existen al menos dos isoenzimas de la MAO, denominadas MAO tipo A y MAO tipo B, que se encuentran localizadas en la membrana mitocondrial externa en neuronas, glía y otros tipos de células. Estudios inmunohistoquímicos, autorradiográficos y de hibridación *in situ* sugieren que la MAO-A se localiza en neuronas adrenérgicas y noradrenérgicas, mientras que la MAO-B se encuentra en neuronas histaminérgicas y serotoninérgicas. Por otra parte, la isoenzima A presenta alta afinidad por la 5-HT y la NA, pero es la isoenzima B la que predomina en el cerebro humano y en los cuerpos celulares de las neuronas serotoninérgicas (Richards y cols, 1992). Este dato sugiere que en neuronas serotoninérgicas la MAO B puede estar evitando la acumulación de otro tipo de sustancias (por ejemplo, DA) que puedan interferir en el almacenamiento, liberación y recaptación de 5-HT.

## 2. Distribución de las vías serotoninérgicas en el sistema nervioso central

### 2.1. Cuerpos celulares

En 1964, Dahlstöm y Fuxe, utilizando una técnica de fluorescencia inducida por formaldehído, realizan el primer estudio sobre la distribución de los cuerpos celulares de neuronas serotoninérgicas. Identifican nueve grupos a los que denominan B1, B2, B3,..., B9. Estos grupos de cuerpos celulares serotoninérgicos se encuentran localizados en la línea media del cerebro y del tallo del cerebro. Sus axones inervan casi todas las áreas del cerebro.

**TABLA 12**  
**Localización de los cuerpos celulares serotoninérgicos**

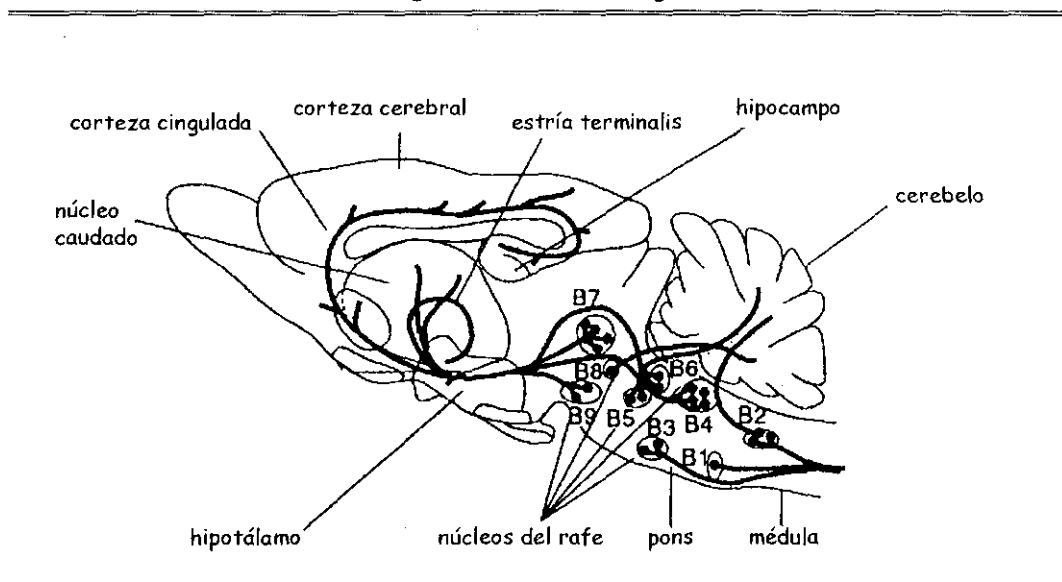
<b>CUERPOS CELULARES SEROTONINÉRGICOS</b>		
<b>•Grupo caudal o inferior</b>	(desde el puente caudal hasta la médula espinal)	
<b>•Grupo rostral o superior</b> (entre el cerebro medio y el puente)	•Núcleo caudal lineal (B8)	<ul style="list-style-type: none"> <li>•n. rafe obscurus (B2)</li> <li>•n. rafe pallidus (B1 y B4)</li> <li>•n. rafe magnus (B3)</li> <li>•neuronas de la médula ventrolateral</li> <li>•neuronas del área postrema</li> </ul>
	•Núcleo medial del rafe (B8 y B5)	
	•Núcleo dorsal del rafe (B7 y B6)	
	•Núcleo supralemniscal (B9)	

Los núcleos dorsal y medial del rafe correspondientes a los grupos B6, B7 y B8 presentan una densidad de neuronas serotoninérgicas mayor que el resto de los grupos. Las neuronas serotoninérgicas representan un tercio del total de neuronas que existen en los núcleos del rafe (Descarries y cols., 1982).

## 2.2. Proyecciones

Los axones de los cuerpos celulares del núcleo caudal del rafe (B1-B3) proyectan hacia la médula espinal (vías descendentes), mientras que los procedentes del núcleo dorsal del rafe (B4-B9) emiten sus proyecciones hacia la corteza cerebral, el caudado-putamen, hipocampo e hipotálamo (vías ascendentes). Por su parte, los núcleos del rafe reciben proyecciones de otros núcleos del tallo cerebral como la sustancia nigra, el ATV (DA), núcleo superior vestibular (Ach), LC (NA), NTS (adrenalina) y núcleo prepósito hipoglosa (Liposits y cols., 1987; tabla 13 y figura 13). Por otra parte, estos mismos autores demostraron la existencia de una conexión directa entre terminales nerviosos serotoninérgicos y neuronas CRFérgicas en el NPV.

**FIGURA 13**  
*Proyecciones serotoninérgicas*



*Los principales cuerpos celulares serotoninérgicos se encuentran en los núcleos dorsal y caudal del rafe, situados en el pons y la médula (B1-B9). Los axones procedentes de los núcleos caudales (B1-B3) proyectan hacia la médula espinal, mientras que los procedentes de los núcleos dorsales (B4-B9) proyectan hacia la corteza cerebral, núcleo caudado, hipotálamo e hipocampo.*

El desarrollo de técnicas inmunohistoquímicas de elevada sensibilidad, basadas fundamentalmente en el uso de anticuerpos de 5-HT, ha permitido detectar diferencias morfológicas entre las neuronas de diferentes orígenes (Steinbusch y cols, 1978). De este modo, los axones procedentes del núcleo medial del rafe (tipo M) presentan varicosidades grandes y esféricas, mientras que los procedentes del núcleo dorsal del rafe (tipo D) son finos y generalmente presentan varicosidades pequeñas y de formas diferentes. Estos dos tipos de axones serotoninérgicos presentan una distribución regional diferente.

**TABLA 13**  
**Proyecciones serotoninérgicas**

<b>PROYECCIONES SEROTONINÉRGICAS</b>		
Las vías de proyección de las neuronas serotoninérgicas pueden dividirse en dos grandes		
<b>Origen</b>	<b>Area de proyección</b>	
<b>Sistema Descendente</b>	Núcleos del grupo caudal	Tronco cerebral Médula espinal
<b>Sistema Ascendente</b>	Núcleos del grupo rostral (principalmente núcleos dorsal y medial del rafe)	
	Banda ventral (haz medial del cerebro anterior)	a)Tracto del rafe dorsal (banda lateral)      Ganglios basales Núcleo accumbens
		b)Tracto del rafe medial (banda medial)      Corteza cingulada Septum Hipocampo
	Banda dorsal	a)Tracto cortical del rafe dorsal      Caudado-putamen Corteza temporoparietal y frontal
		b)Tracto periventricular del rafe dorsal      Tálamo Hipotálamo
		c)Tracto arcuato del rafe dorsal      Sustancia nigra Núcleo geniculado núcleo supraóptico
		d)Tracto medial del rafe      Núcleo interpeduncular Cuerpos mamilares

### 3. Receptores serotoninérgicos

La 5-HT actúa a través de un complejo sistema de receptores. Actualmente, los receptores serotoninérgicos se clasifican como 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> (Humphrey y cols., 1993). El receptor 5-HT<sub>1</sub> se divide a su vez en 1A, 1B, 1C, 1D, 1E y 1F, y el receptor 5-HT<sub>2</sub> en 2A, 2B y 2C. Estudios más recientes revelan la existencia de un mayor número de receptores serotoninérgicos, de cuya farmacología y función fisiológica se conoce bastante poco; entre ellos se incluyen los receptores 5HT<sub>5A</sub>, 5HT<sub>5B</sub>, 5HT<sub>6</sub> y 5HT<sub>7</sub> (Sleight y cols., 1998).

### 4. Serotonina y regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal

El hecho de que existan proyecciones serotoninérgicas desde los núcleos del rafe hasta el NPV hizo pensar en la posible implicación de la 5-HT en la regulación del eje HHA. Así se observó que la 5-HT estimula directamente la liberación de CRF en explantes y cultivos celulares hipotalámicos (Calogero y cols., 1989; Tsagarakis y cols., 1989), y que tanto la 5-HT como fármacos que potencian sus efectos producen liberación de CRF en sangre portal hipofisaria y elevan la secreción de ACTH plasmático (Bevan y Scanlan, 1992). Sin embargo, la función precisa de la 5-HT en la regulación de la liberación de CRF inducida por estrés y su periodicidad circadiana aún no se conoce con detalle (Grossman y Costa, 1993).

Por todo ello existen evidencias de papel regulador de la 5-HT sobre el eje HHA. Los precursores de serotonina 5-HTP y L-Trp son capaces de estimular la liberación de ACTH. Además, la fenfluramina, que produce liberación de 5-HT, eleva las concentraciones de ACTH y cortisol en humanos, efecto que aumenta de forma marcada en pacientes maníacos y depresivos (Meltzer y cols., 1983; Siever y cols., 1984; O'Keane y Dinan, 1991).

Por otra parte, el uso de herramientas farmacológicas, como agonistas y antagonistas de los distintos receptores serotoninérgicos ha hecho posible el conocimiento de qué subtipo de receptor modula la liberación de CRF, ACTH y corticosterona, como se resume en la *tabla 14*.

#### 4.1. Acción de la serotonina sobre el hipotálamo

La ipsapirona es un agonista selectivo del receptor 5-HT<sub>1A</sub> capaz de elevar de forma dosis-dependiente las concentraciones plasmáticas de ACTH y cortisol en humanos (Lesch y cols., 1989). Esta respuesta se bloquea por el antagonista de los receptores 5-HT<sub>1/2</sub> metergolina y por el antagonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> pindolol (Lesch y cols., 1990b). Asimismo, la administración central del agonista 5HT<sub>1A</sub> 8-OH-DPAT, y la administración periférica de este agonista y de ipsapirona en rata (Di Scullo y cols., 1990) eleva la concentración plasmática de ACTH, actuando probablemente en el NPV y en el núcleo dorsal del rafe (Bluet Pajot y cols., 1995). Estos estudios sugieren que el receptor 5-HT<sub>1A</sub> es el principal subtipo de receptor que interviene en la regulación serotoninérgica del eje HHA, hecho que se confirma por el aumento en la secreción plasmática de cortisol en humanos producido por el agonista parcial del receptor 5-HT<sub>1A</sub> buspirona (Meltzer y Maes, 1994). Por otra parte, estudios *in vitro* demuestran

que tanto la 5-HT como el agonista 5-HT<sub>2</sub> (2,5, dimetoxi-4-yodo-fenil-2-aminopropano) o DOI y los agonistas 5-HT<sub>1A</sub> meta-clorofenilpiperazina ó m-CPP y 8-OH-DPAT son capaces de estimular la liberación de CRF a partir de hipotálamo de rata aislado; este efecto se bloquea por la administración del antagonista 5HT1/2 metergolina y por los antagonistas selectivos del receptor 5-HT<sub>2</sub> ketanserina y ritanserina, lo que demuestra que la liberación de CRF hipotalámico producida por 5-HT está mediada tanto por el receptor 5-HT<sub>1A</sub> como por el receptor 5-HT<sub>2</sub> (Calogero y cols., 1989).

**TABLA 14**  
**Receptores serotoninérgicos y su implicación en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

Hormona	Nivel del eje HHA	Receptor	Agonista	Antagonista	Mensajero
CRF	Hipotálamo	5HT <sub>1A</sub>	Ipsapirona, 8-OH-DPAT	Pindolol	AMPc
		5HT <sub>2</sub>	DOI (2,5, dimetoxi-4- yodo-fenil-2- aminopropano)	Ritanserina	
ACTH	Hipófisis	5HT <sub>2</sub> 5HT <sub>3</sub>	A-metil 5HT	Ritanserina	IP
Corticosterona	Adrenal	5HT <sub>4</sub>	Zacopride	DAU 6285 GR 113808	AMPc
		5HT <sub>2</sub>	DOI	Xilamidina MDL 11939	IP

(Tomado de Fuller y Snoddy, 1990 y Dinan, 1996)

Por tanto, el hecho de que la 5-HT regule la liberación de CRF a partir del hipotálamo, y como consecuencia la secreción de ACTH y corticosterona plasmáticas parece evidente. Sin embargo, se han realizado menos estudios sobre la regulación directa de la liberación de ACTH a partir de la adenohipófisis, hecho que parece probable debido a que existe inmunorreactividad a 5-HT en células neuroendocrinas de la hipófisis anterior (Piezzi y Wurtman, 1970; Saavedra y cols., 1975). Asimismo se ha demostrado la presencia de receptores 5HT<sub>2</sub> en la hipófisis (De Souza, 1986).

#### 4.2. Acción de la serotonina sobre la hipófisis

La 5-HT aumenta de forma dosis-dependiente la liberación de ACTH en disociados de adenohipófisis, efecto que es potenciado por AVP y bloqueado por el antagonista de los receptores 5HT1/2 metergolina (Spinedi y Negro-Vilar, 1983). Parece ser que los receptores 5HT<sub>2</sub> son los principales encargados de regular la liberación de ACTH en la hipófisis, ya que, antagonistas de este receptor son capaces de bloquear la liberación de ACTH inducida por 5-HT. Por otra parte, el agonista de los receptores 5HT<sub>2A/2C</sub> m-CPP fue menos efectivo, mientras

que el agonista del receptor  $5HT_{1A}$  8-OH-DPAT no tuvo ningún efecto (Bagdy y cols., 1989; Bluet Pajot y cols., 1995). Además, la función de los receptores  $5HT_3$  ha sido recientemente investigada por Calogero y cols. (1995), encontrándose que el agonista  $5HT_3$  1-(m-clorofenil)-biguanida ó m-CPBG estimula de forma dosis-dependiente la liberación de ACTH en hipófisis, y que tanto el antagonista del receptor  $5HT_3$  3-tropanil-3,5-diclorobenzoato como el antagonista  $5HT_{3/4}$  3-tropanil-indol-3-carboxilato son capaces de bloquear la liberación de ACTH inducida por 5-HT.

Todos estos estudios realizados *in vitro* demuestran que la 5-HT puede actuar directamente sobre la hipófisis anterior para liberar ACTH. Estos resultados se confirman por el hecho de que los agonistas serotoninérgicos 8-OH-DPAT y m-CPP aumentan las concentraciones plasmáticas de ACTH en ratas con resección del pedúnculo hipofisario, aunque de forma menos marcada que en ratas intactas, lo que sugiere que la 5-HT estimula la liberación de ACTH *in vivo* actuando tanto a nivel hipotalámico como hipofisario (Calogero y cols., 1990).

#### **4.3. Acción de la serotonina sobre la corteza adrenal**

La corteza adrenal humana contiene cantidades significativas de 5-HT y su metabolito 5-HIAA, como se ha demostrado en distintos estudios (Lefebvre y cols., 1992). En la rata, la 5-HT se almacena en vesículas secretoras en las células cromafines, mientras que en humanos se encuentra en otro tipo de células tanto en la corteza como en la médula adrenal (Brownfield y cols., 1985).

Estudios *in vitro* han demostrado cómo la 5-HT estimula la liberación de corticosterona a partir de células de médula adrenal de rana (Contesse y cols., 1994). Parece ser que la 5-HT produce una respuesta de desensibilización de estas células, ya que su administración continuada produce un aumento rápido seguido de un descenso gradual de cortisol, lo que puede ocurrir por internalización o por un descenso de la afinidad de los receptores (Lefebvre y cols., 1993). Por otra parte se ha observado la implicación de los receptores  $5-HT_4$  en la liberación de cortisol a nivel de la glándula adrenal, ya que distintos agonistas de este receptor aumentan la liberación de corticosterona en células de médula adrenal de rana (Contesse y cols., 1994). Asimismo, estudios *in vivo* realizados por Alper (1990) sugieren que la 5-HT puede actuar directamente sobre receptores serotoninérgicos de la glándula adrenal y estimular la liberación de corticosteroides de forma independiente de la estimulación por ACTH, ya que la administración periférica de DOI aumentó las concentraciones plasmáticas de corticosterona, efecto que fue inhibido tras pretratamiento con el antagonista central de receptores  $5-HT_2$  LY 53857. El antagonista de estos receptores xilamidina, así como el pretratamiento con dexametasona atenuaron la respuesta producida por DOI, lo que sugiere que los agonistas  $5-HT_2$  aumentan la liberación de corticosterona, al menos en parte, a través de un mecanismo directo sobre la glándula adrenal, y a través de mecanismos centrales sensibles a la dexametasona e independientes de ACTH.

#### **4.4. Acción de la serotonina sobre el sistema de retroalimentación de glucocorticoides**

El sistema de retroalimentación de glucocorticoides también parece influir sobre el sistema de neurotransmisión serotoninérgico, ya que la adrenalectomía reduce la síntesis de 5-HT en hipotálamo (Van Loon y cols., 1981), hipocampo dorsal (De Kloet y cols., 1982) y núcleos del rafe (De Kloet y cols., 1983). Estas regiones son sitios de acción de la corticosterona, y la administración de dosis bajas de corticosterona tras la adrenalectomía es capaz de restablecer la síntesis de 5-HT. Además, la adrenalectomía aumenta la densidad de receptores 5HT<sub>1</sub> en el subíulum, lámina molecular del giro dentado, sustancia nigra y núcleos del rafe, y la posterior administración de corticosterona restablece los niveles normales de receptores, hecho que sugiere que la densidad de receptores 5HT<sub>1</sub> está regulada, al menos en parte por los glucocorticoides (De Kloet y cols., 1986). Así, mientras la 5-HT regula la actividad del eje HHA a distintos niveles, el eje HHA regula la actividad serotoninérgica central.

#### **4.5. Acción de la serotonina sobre el control circadiano de ACTH y corticosterona**

Parece ser que la inervación serotoninérgica del NSQ facilita el control circadiano de la liberación de ACTH (Szafarczyk y cols., 1980), y que la 5-HT interviene en el control circadiano de la liberación de corticosterona, ya que lesiones en el núcleo del rafe de la rata alteran la periodicidad de la corticosterona plasmática (Scapagnini y Nistico, 1979).

#### **4.6. Serotonina, ansiedad y estrés**

Por último, la 5-HT ha demostrado ser un importante neurotransmisor en procesos de ansiedad y estrés. Está demostrado que en enfermos depresivos existen anomalías tanto del eje HHA como de la actividad serotoninérgica, y que las disfunciones endocrinas existentes en depresión están mediadas por anomalías del sistema de neurotransmisión serotoninérgico (Dinan, 1994). Asimismo, estudios recientes demuestran que las alteraciones serotoninérgicas asociadas con la depresión pueden revertirse mediante el descenso de los niveles plasmáticos de cortisol con metirapona (inhibidor de la síntesis de cortisol; Thakore y Dinan, 1995) y con dexametasona (Arana y cols., 1995).

## **IV. Expresión génica de neuropéptidos**

### **1. Estructura génica**

Un gen puede ser considerado como una unidad de ADN dentro del cromosoma, que se transcribe generando ARNm, a partir del cual se sintetizan proteínas con funciones específicas dentro de la célula.

El transcrito primario de un gen contiene tanto regiones intrónicas como exónicas. Sin embargo, el ARNm maduro contiene solamente regiones exónicas. La maduración del transcrito primario ocurre en el núcleo, dando lugar a ARNm maduro que es transportado al citoplasma. Este proceso es conocido como "splicing", o corte y empalme. El mecanismo

bioquímico de este proceso se basa en unos complejos proteicos a los que se asocian pequeñas moléculas de ARNm, llamados espliceosomas. Estas moléculas reconocen secuencias específicas que señalan los límites entre un intrón y un exón.

Además de la eliminación de los intrones, durante la maduración del ARNm tiene lugar un segundo procesamiento post-transcripcional, que consiste en la adición de una estructura metilada llamada caperuza o cap en el extremo 5' de la molécula de ARNm. Esta estructura facilita la unión del ARN eucariota a los ribosomas y activa la síntesis de proteínas, además de estabilizar la molécula de ARNm.

La última modificación que experimenta el transcrito primario es la adición en el extremo 3' de una cadena nucleotídica de residuos adenílicos repetidos, llamada cola poli A. Este proceso también ocurre en el núcleo, y aunque la función precisa de la cola de poli A es desconocida, se sabe que confiere una mayor estabilidad a la molécula de ARNm.

Por otra parte, la secuencia de tripletes que codifica para la futura proteína se denomina marco abierto de lectura. Comienza por un codon iniciador (AGG) y termina en un codon de terminación (UAA o UAG). En el ARNm maduro, el marco abierto de lectura está flanqueado por regiones no traducibles en ambos extremos, donde se incluyen las estructuras cap y la cola de poli A.

## **2. Regulación de la expresión génica**

La regulación de la expresión de genes eucarióticos implica gran variedad de acciones sobre los diversas fases del proceso de expresión génica, tanto a nivel transcripcional (alterando la velocidad de transcripción de un gen determinado), post-transcripcional (modificando el "splicing" -corte y empalme- del ARNm, el proceso de transporte del ARN del núcleo al citoplasma y la estabilidad del mismo), como a nivel de la traducción, para dar lugar a la proteína definitiva.

La transcripción, o expresión de un gen, es controlada por secuencias en el extremo 5' flanqueante de la unidad transcripcional. Las secuencias que se requieren para la regulación de la expresión se conocen como elementos actuantes en cis (cis-acting elements) del gen. Actuar en cis indica que estos elementos, que son secuencias de ADN, son parte de la misma cadena de ADN que contiene la unidad transcripcional. Estos elementos son reconocidos como un sitio de unión por la ARN polimerasa y por otras proteínas con las que ésta va a interaccionar. En muchos genes, esta región incluye una secuencia corta de nucleótidos denominada caja TATA, que se extiende aproximadamente 30 bases más arriba del sitio donde comienza la transcripción. Además, existen otras secuencias consenso situadas delante de la caja TATA, denominadas CCAAT o caja CAT, y que también juegan un papel importante en la activación de la transcripción. Este último elemento es fundamental para la expresión constitutiva de un gen.

Sin embargo, en la mayoría de los genes, la expresión es controlada por factores

fisiológicos o xenobióticos adicionales, como la dieta, los ritmos circadianos, el estrés, las hormonas o los fármacos. En estos casos, se asocian a los genes otros elementos cis adicionales, localizados normalmente en la región 5' flanqueante. Estas secuencias adicionales fijan proteínas llamadas factores que actúan en trans, *trans-acting factors* o factores de transcripción, que regulan la unión de la ARN polimerasa a la región que rodea la caja TATA, y de esta manera regulan el nivel de transcripción. Además, existen elementos potenciadores o enhancers, que son secuencias de ADN que unen proteínas y pueden actuar en cualquier orientación (5'-3' ó 3'-5') y a una distancia considerable del sitio donde comienza la transcripción. Los potenciadores se unen a proteínas que aumentan (activadores) o disminuyen la expresión génica (represores).

Ciertos tipos de genes, como los descritos en este trabajo, se caracterizan por tener secuencias cis comunes, y por tanto están regulados por factores de transcripción muy similares o idénticos.

### **2.1. Regulación de la expresión génica por el receptor de hormonas esteroideas**

Las hormonas esteroideas (glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos, estrógenos, progesterona, hormonas tiroideas, etc) ejercen sus efectos a través de su unión a receptores específicos que normalmente se encuentran en el núcleo. El complejo esteroide-receptor regula el nivel de transcripción de determinados genes y por tanto la síntesis de ciertas proteínas (Tsai y cols., 1994).

### **2.2. Regulación de la expresión génica por la proteína fijadora al elemento de respuesta a AMPc (CREB)**

CREB, o c-AMP-responsive element binding protein, es otro tipo de proteína que regula la expresión de distintos genes. Varios genes eucariotas cuya expresión está regulada por AMPc comparten una secuencia cis común en sus regiones 5' flanqueantes (TGACGTCA). Para que CREB inicie la transcripción, es necesaria su fosforilación por parte de una proteína-quinasa dependiente de AMPc. Así, el AMPc, un segundo mensajero cuya síntesis está controlada por diversos factores que se unen a receptores de membrana específicos, regula la expresión génica a través de este factor de transcripción (Goodman, 1990; Montminy y cols., 1990).

### **2.3. Regulación de la expresión génica por genes de expresión temprana**

Los proto-oncogenes *c-fos* y *c-jun* son miembros de una familia de genes inducibles denominada genes de expresión temprana. Sus productos proteicos, Fos y Jun, son factores de transcripción que interactúan con una secuencia reguladora de ADN llamada AP1, y de este modo regulan la expresión de muchos genes. Ambos se caracterizan por presentar una región común rica en Leu, llamada cremallera de leucina, que puede formar una hélice cuando se une a otra proteína de la misma familia, favoreciéndose la unión a la secuencia reguladora AP1 (ATAGAGTACT), y regulando así la expresión de genes que contengan sitios de unión para AP1 (Hoffman y cols., 1993). Jun puede formar homodímeros, pero Fos necesita asociarse con Jun

para poder formar un heterodímero activo (Morgan y Curran 1991).

Los genes de expresión temprana, en particular *c-fos*, han demostrado ser marcadores de actividad neuronal fiables para una gran variedad de estímulos fisiológicos y farmacológicos (Hoffman y cols., 1993).

### **3. Distribución del ARNm de CRF, POMC y proencefalina**

#### **3.1. Distribución del ARNm de CRF**

La localización de ARNm de CRF en el SNC coincide en líneas generales con las áreas cerebrales que contienen el péptido. La región en donde se observa una mayor expresión de ARNm de CRF es el NPV, pero este gen se expresa además en otras regiones hipotalámicas, como por ejemplo el NSO, y en otras áreas cerebrales, como son la oliva inferior, corteza, amígdala, núcleo de la estria terminalis, LC y NTS. De las diversas estructuras centrales analizadas, la única que carece del mensajero es el cerebelo. Estos datos han sido obtenidos en diversas especies animales, incluyendo a la rata, oveja, mono y humanos (Beyer y cols., 1988; Matthews y cols., 1991).

#### **3.2. Distribución del ARNm de POMC**

POMC se sintetiza fundamentalmente en el hipotálamo y la hipófisis. En el cerebro, los cuerpos neuronales que contienen ARNm de POMC se encuentran en el ARC y en el NTS, mientras que en la hipófisis, existe ARNm de POMC tanto en el lóbulo anterior como en el intermedio (Civelli y cols., 1982; Gee y cols., 1983 Lundblad y Roberts, 1988)

#### **3.3. Distribución del ARNm de proencefalina**

La distribución de ARNm de proencefalina (PENK) en el SNC y en la médula espinal ha sido descrita detalladamente por Harlan y cols. (1987). Existe una elevada densidad de ARNm de PENK en la corteza piriforme, neocórtex, ACC, tubérculo olfatorio y caudado putamen. Además, también abunda en el hipotálamo (NVM, NPV y núcleo mamilar medial), amígdala, y SGP.

La amplia distribución de las encefalinas en el SNC sugiere su posible implicación en numerosas funciones fisiológicas, entre las que cabe destacar la secreción de factores hipotalámicos que regulan la secreción de distintas hormonas.

### **4. Regulación de la expresión génica de CRF, POMC y PENK**

La regulación de la expresión génica de CRF, POMC y PENK presenta características semejantes. En las respectivas regiones 5' flanqueante aparecen varias secuencias reguladoras comunes a los tres genes. Las más relevantes son las que corresponden a los factores de

transcripción Fos, Jun y CREB (Comb y cols., 1982; Eberwine y Roberts, 1983; Comb y cols., 1986; Fremeau y cols., 1986; Gagner y Drouin, 1987; Seasholtz y cols., 1988; Sonnenber y cols., 1989; Goodman 1990; Zhu y Pfaff, 1995). Además, y como se describía en el apartado 3, los ARNm de estos genes se encuentran distribuidos principalmente en el hipotálamo, lo que sugiere que la expresión génica de CRF, POMC y PENK puede responder de forma similar a diferentes estímulos fisiológicos y farmacológicos.

#### 4.1. Regulación de la expresión génica de CRF

En muchos casos, la exposición a situaciones estresantes, y la consiguiente activación del eje HHA induce la transcripción de genes que codifican para diversos neuropéptidos. Dicha activación del eje implica en la mayoría de los casos una inducción de la expresión de CRF en el NPV, habitualmente junto a la de POMC en adenohipófisis. Así, distintos estudios muestran como una gran variedad de estímulos, como el estrés (restricción de movimientos, administración de hipertónico salino ó natación; Harbuz y Lightman, 1989a; Harbuz y cols., 1994) y el síndrome de abstinencia a morfina provocado por naloxona (Lightman y Young, 1988; García-García y cols., 1998a; Hsu y cols., 1998), aumentan la expresión génica de CRF en el NPV. Incluso la administración central de CRF aumenta la expresión génica de su propio gen, efecto que es bloqueado por la administración previa de  $\alpha$ -helical (9-41) CRF, lo que sugiere que CRF actúa de forma positiva para regular su propia biosíntesis (Parkes y cols., 1993).

El aumento de los niveles de ARNm de CRF en el NPV y en la amígdala observado tras someter a los animales a estrés agudo por frío (Hsu y cols., 1998) no se observa después de someter a los animales a estrés crónico en el NPV, pero sí en el núcleo central de la amígdala. Estos datos sugieren que existe una regulación diferencial de la expresión de este gen en ambas regiones cerebrales en respuesta a estrés agudo ó crónico (Hatalski y cols., 1998). De hecho, y como se describirá posteriormente, la administración de agonistas dopaminérgicos eleva la expresión de CRF en el NPV, pero no en la amígdala (Eaton y cols., 1996).

La expresión del gen de CRF, al igual que ocurre con otros neuropéptidos como POMC y PENK, se encuentra regulada por los glucocorticoides por dos mecanismos: 1) Los glucocorticoides a altas dosis inhiben la expresión génica de CRF, en el NPV probablemente a través de mecanismos dependientes del receptor tipo II y 2) Los glucocorticoides a bajas dosis elevan los niveles de ARNm de CRF y mantienen la transcripción génica en condiciones de estrés en el NPV, probablemente actuando a través de mecanismos dependientes del receptor de glucocorticoides tipo I (Tanimura y Watts, 1998). Por otra parte, la administración del antagonista del receptor de glucocorticoides tipo II RU-486 aumenta la expresión génica de CRF en el NPV en condiciones basales (García-García y cols., 1998b), mientras que la expresión génica de este neuropéptido aumenta tanto en condiciones basales como de estrés en ratas adrenalectomizadas (Young y cols., 1986a), efecto que se revierte mediante pretratamiento con dexametasona (Frim y cols., 1990; Imaki y cols., 1995). Asimismo, en la amígdala, región relacionada e implicada en el miedo y la ansiedad, se ha observado que los glucocorticoides facilitan la expresión génica de CRF (Makino y cols., 1994), mientras que en otras regiones cerebrales en donde está presente el ARNm de CRF, como el NSO, y el núcleo

de la *estria terminalis*, los glucocorticoides no modifican la expresión de CRF (Beyer y cols., 1988). Por otra parte, implantes de dexametasona en la corteza cerebral, hipocampo, subículum o amígdala no modificaron los niveles de ARNm de CRF en el NPV (Kovacs y Mezey, 1987).

La 5-HT y la DA también intervienen en la regulación de la expresión génica de CRF en el NPV, ya que la administración central de 5-HT en rata y la administración periférica de agonistas dopaminérgicos eleva los niveles de ARNm de CRF en el NPV (Eaton y cols., 1996; Kageyama y cols., 1998). Además, parece que el aumento de la expresión génica de CRF en situaciones de estrés requiere de la integridad de la transmisión dopaminérgica, ya que la lesión de estas neuronas con 6-hidroxi-dopamina altera los niveles de ARNm en respuesta al estrés (Lightman y Harbuz, 1993). Sin embargo, no ocurre lo mismo con la 5HT y la NA, ya que la deplección de ambos neurotransmisores no modificó el aumento de los niveles de ARNm de CRF producido en el NPV tras someter a los animales a una situación de estrés (Harbuz y cols. 1991 y 1994).

Estudios recientes demuestran que la expresión génica de CRF en el NPV está regulada por el sistema de segundos mensajeros vía PKA, dependiente de AMPc, lo que sugiere la posible implicación de CREB en la regulación de la expresión génica de CRF inducida por estrés (Itoi y cols., 1996). Este estudio está de acuerdo con la presencia de un elemento regulador CREB en el gen de CRF (Seasholtz y cols., 1988). Pero la expresión génica de CRF también parece estar regulada vía PKC; en cualquier caso, la estimulación ejercida por ambas vías es inhibida por los glucocorticoides (Majzoub y cols., 1993). Además, el aumento de la expresión génica de CRF que se produce tras someter a los animales a estrés va precedido por una elevación de los niveles de ARNm de Fos, lo que sugiere que *c-fos* interviene en la activación de la expresión génica de CRF en situaciones de estrés (Imaki y cols., 1992).

Existen distintas regiones cerebrales cuyas conexiones con el NPV regulan la expresión génica de CRF. Así, el hipocampo interviene en la regulación de la expresión génica del gen de CRF, ya que lesiones en esta región cerebral resultan en un aumento de los niveles de ARNm de CRF en el NPV (Herman y cols., 1990). Estos mismos autores observaron posteriormente que el núcleo de la *estria terminalis* también parece regular de forma diferencial y tónica la expresión génica de CRF en el NPV, ya que lesiones en la región anterolateral disminuyen los niveles de ARNm de CRF, mientras que lesiones en la región posterior aumentan la expresión del gen de CRF (Herman y cols., 1994). Por otra parte, tras la desaferentización total del NPV se observa un aumento de la expresión génica de CRF, lo que indica que en ausencia de impulsos neuronales procedentes de otra región cerebral, la expresión génica de CRF está regulada a la alta, sugiriendo que los efectos locales de los glucocorticoides sobre las neuronas del NPV no son eficaces en la completa regulación de la expresión génica de CRF, y por lo tanto debe existir un sistema de retroalimentación en las neuronas CRFérgicas del NPV (Herman y cols., 1990).

Además, existen variaciones en los niveles de ARNm de CRF en el hipotálamo a lo largo del día, que alcanzan el nivel máximo justo antes del periodo de oscuridad, y disminuyen de forma marcada a las dos horas de comenzar el periodo de oscuridad, lo que coincide con un

aumento de los niveles plasmáticos de corticosterona (Kwak y cols., 1992).

Por último, cabe destacar que la administración del antagonista de receptores de N-metil-D-aspartato (NMDA) MK-801 y de prostaglandina E2 (PGE2) aumenta la expresión génica de CRF en el NPV (Lee y cols., 1994; Lacroix y cols., 1996). También la administración de  $\beta$ -endorfina aumenta los niveles de ARNm de CRF en el NPV, efecto que es revertido por la administración de naloxona (Wang y cols., 1996). Asimismo, distintos estudios publicados recientemente demuestran la implicación de los cannabinoides en la regulación de la expresión génica de CRF en el NPV (Corchero y cols., 1999a y b), ya que tanto la administración crónica de  $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol ( $\Delta^9$ -THC) como del potente agonista del receptor de cannabinoides CP-55,940 aumentan la expresión génica de CRF en el NPV, hecho que podría formar parte del mecanismo molecular por el cual los cannabinoides activan el eje HHA (Weidenfeld y cols., 1994; Rodríguez de Fonseca y cols., 1996).

#### **4.2. Regulación de la expresión génica de POMC**

La expresión génica de POMC *in vivo* tanto en adenohipófisis como en hipotálamo, es inhibida de forma tónica por los glucocorticoides (Birnberg y cols., 1983; Eberwine y Roberts, 1984; Jíngami y cols., 1985; Freneau y cols., 1986), siendo el lóbulo intermedio menos sensible a la acción de los glucocorticoides circulantes (Schachter y cols., 1982; Gagner y Drouin, 1987). A nivel hipotalámico los estrógenos también regulan negativamente la expresión de este gen (Wilcox y Roberts, 1985), mientras que en hipófisis CRF aumenta la expresión génica de POMC en ambos lóbulos, aunque de forma más marcada en el lóbulo anterior (Hollt y Haarman, 1984). Esto parece ser debido a que CRF regula directamente la expresión génica de POMC en el lóbulo anterior, pero no en el lóbulo intermedio, donde están implicados otros factores, como revelan estudios en los que se han destruido neuronas CRFérgicas del NPV (Bruhn y cols., 1984). Por otra parte, en disociados de hipófisis tanto de lóbulo anterior como de lóbulo intermedio, la transcripción del gen de POMC se estimula mediante la adición al medio de AMPc y de CRF (Loeffler y cols., 1985; Autelitano y cols., 1990), aunque algunos estudios sólo han observado aumento de la transcripción en el lóbulo anterior (Gagner y Drouin, 1987). Por último, y contrariamente a lo esperado, se ha observado en cultivos de adenohipófisis ovinos, de ratón y de rata que la liberación de ACTH producida por AVP y CRF no se correlaciona con un aumento en los niveles de ARNm de POMC en estas células (Castro, 1993; Levin y cols., 1993), y que AVP no potencia el aumento de la transcripción de POMC inducido por CRF, a diferencia de lo que ocurre a nivel hormonal, donde sí potencia la liberación de ACTH (Levin y cols., 1989).

La DA parece estar implicada en la regulación de la expresión génica de POMC, ya que agonistas dopaminérgicos reducen la transcripción de este gen en el ARC y en el lóbulo intermedio de la hipófisis (Chen y cols., 1983; Chronwall y cols., 1987; Pelletier, 1993). Este efecto, que también se ha descrito en cultivos hipotalámicos, parece estar mediado por receptores  $D_2$ , ya que se previene por la administración de haloperidol y del antagonista selectivo  $D_2$ , (+) butaclamol, mientras que tanto NA, Ach y el agonista selectivo  $D_1$ , SKF 38393 no modifican los niveles de ARNm de POMC (L'Hereault y Barden, 1991a). A su vez, la regulación de los niveles de ARNm de POMC se encuentran bajo control inhibitorio de

distintos péptidos opioides, siendo mediado principalmente por receptores  $\delta$  y  $\kappa$ , pero no por receptores  $\mu$  (L'Hereault y Barden, 1991b).

El estrés activa la transcripción génica de POMC en el hipotálamo mediobasal y en el ARC (Bauvet y cols., 1994; Larsen y Mau, 1994), así como en el lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis (Holtt y cols., 1986; Harbuz y Lightman, 1989a; García-García y cols., 1997), hecho que parece estar mediado, al menos en parte, por una potenciación de la liberación de CRF hipotalámico (Holtt y cols., 1986; Lightman y Young, 1988). Este efecto inductor se produce cierto tiempo después de la finalización del estrés, en caso de emplearse un modelo experimental de estrés agudo. En cuanto a paradigmas de estrés crónico, como inmovilización repetida y exposición a frío, distintos estudios indican que se produce una desensibilización de las respuestas de la hipófisis al estímulo primario, pero se produce una hiperrespuesta a un estímulo estresante nuevo, tanto si el estrés crónico es aplicado de forma continua o intermitente (Aguilera y cols., 1993; Hauger y cols., 1988; Vernikos y cols., 1982), elevándose el contenido tanto de ARNm de POMC hipofisario como de ARNm de CRF hipotalámico (Kiss y Aguilera, 1993). Por otra parte, la aplicación de terapia electroconvulsiva eleva la expresión génica de POMC en el ARC, pero no en el lóbulo anterior de la hipófisis (García-García y cols., 1998a).

La administración de 5-HT produce un incremento en los niveles de ARNm de POMC tanto *in vivo*, en el lóbulo anterior de la hipófisis (Kageyama y cols., 1998) como en disociados celulares de hipotálamo de rata, efecto que fue bloqueado por el antagonista 5-HT<sub>2</sub> ketanserina (L'Hereault y cols., 1991a). La 5-HT modula también el aumento en los niveles plasmáticos de  $\alpha$ -MSH inducido por estrés, ya que la administración de un antagonista 5-HT<sub>2</sub> ó la inhibición de la actividad serotoninérgica mediante la administración central de la neurotoxina 5,7-dihidroxitriptamina (5,7-DHT), bloquea el incremento en los niveles plasmáticos de esta hormona producido por estrés (Goudreau y cols., 1993). Además, la 5-HT parece regular de forma diferencial la expresión génica de POMC en ambos lóbulos de la hipófisis en situación de estrés, ya que la administración central de 5,7-DHT en ratas estresadas produjo una elevación aún mayor en la expresión génica de POMC en el lóbulo anterior, mientras que bloqueó el aumento en la expresión génica de POMC producido por estrés en el lóbulo intermedio (García-García y cols., 1997).

Por último, la expresión génica de POMC en hipófisis parece estar regulada también por genes de expresión temprana como *c-fos* (Boutiller y cols., 1991) y por hormonas gonadales en el hipotálamo, ya que mientras en la castración produce una elevación en los niveles de ARNm de POMC en hembras, en machos se observa el efecto contrario (Wilcox y Roberts, 1985; Chowen y cols., 1990). Además, estudios recientes apuntan a la implicación de los cannabinoides en la regulación de la expresión génica de POMC tanto en hipotálamo como en hipófisis, ya que la administración crónica del potente agonista sintético del receptor de cannabinoides CP-55,940 incrementa los niveles de ARNm de POMC en el ARC y lóbulo anterior de la hipófisis, mientras que produce una disminución en el lóbulo intermedio (Corchero y cols., 1999a). Por otra parte, la administración crónica de  $\Delta^9$ -THC aumenta la expresión del gen de POMC tanto en el ARC como en el lóbulo anterior de la hipófisis 1 día después de finalizado el tratamiento, disminuyendo los niveles de ARNm progresivamente,

mientras que en lóbulo intermedio, la administración crónica de  $\Delta^9$ -THC disminuye los niveles de ARNm de POMC en el lóbulo intermedio tras 14 días de tratamiento diario, hecho que, al igual que en el estudio anterior, sugiere que los cannabinoides regulan de forma diferencial la expresión génica de POMC en cerebro e hipófisis, por un mecanismo mediado al menos en parte, por la activación del sistema hipotalámico CRFérgico (Corchero y cols., 1999b).

#### 4.3. Regulación de la expresión génica de PENK

Se conoce la existencia de distintos elementos reguladores en la región 5' del gen de PENK (Comb y cols., 1986 y 1988; Hyman y cols., 1988 y 1989; Goodman, 1990), estando su expresión génica afectada por glucocorticoides, AMPc y ésteres de forbol. A diferencia de la regulación de la expresión génica de POMC, en la que los esteroides ejercían una regulación negativa, los glucocorticoides parecen regular de forma positiva la expresión génica de PENK (Naranjo y cols., 1986; Yoshikawa y Sabol, 1986; Inturrisi y cols., 1988), e intervienen en la regulación de la expresión génica de PENK en situaciones de estrés. Así, la administración del antagonista del receptor de glucocorticoides tipo II RU-486 bloquea el aumento de la expresión génica de PENK en el NPV inducido por estrés (García-García y cols., 1998b). Asimismo, y al igual que ocurre con otros neuropéptidos, la expresión del gen de PENK está regulada por *c-fos*, como demuestra el hecho de que en ataques de epilepsia se ha observado una elevación de los niveles de ARNm de PENK justo después de un aumento de la expresión génica de *c-fos* (Sonnenberg y cols., 1989).

La administración de agonistas  $\beta$ -adrenérgicos inducen la transcripción del gen de PENK mediante un mecanismo que implica a AMPc como segundo mensajero (Folkesson y cols., 1989). De forma similar a lo que ocurre con el gen de POMC, el sistema dopaminérgico parece inhibir la expresión de PENK (Mocchetti y cols., 1985; Young y cols., 1986b; Romano y cols., 1987). Asimismo, la expresión del gen de PENK se incrementa en diversos núcleos en respuesta a diversos estímulos, como el estrés (Lightman y Young, 1987a; Harbuz y Lightman, 1989b), la terapia electroconvulsiva (Xie y cols., 1989), los estímulos dolorosos (Iadarola y cols., 1988), y la estimulación eléctrica de vías nerviosas (Xie y cols., 1990). Concretamente, la aplicación de estímulos estresantes agudos aumentan la expresión génica de PENK en el NPV (Lightman y Young, 1987a; Harbuz y Lightman, 1989b), y NVM (Larsen y Mau, 1994; García-García y cols., 1998a y b). Es por ello que las acciones que produce el estrés sobre la transcripción del gen de PENK en el NPV son importantes desde el punto de vista de la actividad del eje HHA, ya que aunque el contenido basal del ARNm de PENK que se expresa en las neuronas parvocelulares del NPV es generalmente indetectable o mínimo (Lightman y Young, 1987a; Harbuz y Lightman, 1989b), en situaciones de estrés físico se incrementa de forma muy acusada (Harbuz y Lightman, 1989b). Además, la expresión del gen de PENK se modifica de forma diferente según el modelo de estrés utilizado: paradigmas en donde el componente principal es de tipo psicológico (como restricción de movimientos y estrés por natación forzada) no modifican los niveles de ARNm de PENK en el NPV, mientras que los de tipo físico sí son capaces de incrementarlos (administración ip de una solución salina hipertónica; exposición a drogas de abuso como nicotina, heroína, cocaína y etanol; Rivier y cols., 1984a; Lightman y Young, 1987a; Harbuz y Lightman, 1989b; Rivier y cols., 1990; Rivier y Lee, 1994). Estos datos sugieren que la expresión de PENK en el hipotálamo es un índice de

la respuesta del animal a distintos estímulos estresantes.

Distintos estudios publicados recientemente han demostrado la implicación de los cannabinoides en la regulación de la expresión génica de PENK en distintas regiones cerebrales (Manzanares y cols., 1998; Corchero y cols., 1999a y b). La administración crónica de  $\Delta^9$ -THC aumenta los niveles de ARNm de PENK en la SGP, núcleo medial mamilar (Manzanares y cols., 1998), y en el NVM y NPV (Corchero y cols., 1999b), regiones en las cuales también se observa este efecto tras la administración crónica del potente análogo de cannabinoides CP-55,940 (Manzanares y cols., 1998). El incremento en la expresión génica de PENK en la SGP podría formar parte de los mecanismos moleculares supraespinales por los que los cannabinoides ejercen su efecto antinociceptivo, mientras que el aumento de ARNm en el núcleo medial mamilar está relacionado con la modulación de la atención y del comportamiento emocional ejercida por los cannabinoides (Manzanares y cols., 1998). Por otra parte, la expresión génica de PENK en respuesta a un tratamiento prolongado de  $\Delta^9$ -THC es diferente en ambos núcleos, ya que mientras en el NVM el aumento máximo en la expresión de PENK se observa tras 7 días de tratamiento, en el NPV, este mismo aumento se observa 14 días después de la administración diaria repetida de  $\Delta^9$ -THC. Estos resultados indican que existe una regulación diferente de la expresión de este gen en ambos núcleos hipotalámicos (Corchero y cols., 1999). La activación de la expresión génica de PENK tanto en el NVM como en el PVN, tras un tratamiento prolongado con cannabinoides puede explicarse como parte del mecanismo por el cual los cannabinoides regulan, en el NVM, el balance energético, el comportamiento sexual y la secreción hormonal, y en el NPV, la respuesta a distintos estímulos estresantes (Manzanares y cols., 1998).

Además, la administración crónica de  $\Delta^9$ -THC, o de CP-55,940, incrementa la expresión génica de PENK en otras regiones cerebrales como son el ACC o el estriado, hecho que parece estar relacionado con las disfunciones motoras producidas por los cannabinoides a largo plazo y con el aumento de la transmisión dopaminérgica en el sistema mesolímbico ejercido por los cannabinoides, a través de un aumento del sistema opioide endógeno (Manzanares y cols., 1998).

Por último, cabe destacar que la presencia de hormonas gonadales circulantes influye de manera decisiva en la expresión génica de PENK en el hipotálamo. Así, en machos y hembras castradas se ha observado un descenso en los niveles de ARNm en el NVM (Romano y cols., 1989; Hammer y cols., 1993; Priest y cols., 1995 y 1997).

# **Planteamiento y objetivos**



Es bien sabido que una respuesta inadecuada al estrés o el padecimiento de una situación de estrés crónico son hechos capaces de producir diferentes patologías en los seres humanos, como son la ansiedad o la depresión (Raadsheer y cols., 1994). En dicha situación de estrés existe una activación mantenida del eje HHA, que se manifiesta por una elevada concentración de glucocorticoides plasmáticos (Kant y cols., 1987).

Se ha demostrado que GRP participa en la regulación de la secreción de hormonas hipofisarias como PRL y GH (Kentroti y cols., 1988a y b; Manzanares y cols., 1991). Este hecho, unido a su abundancia tanto en el hipotálamo como en la hipófisis sugiere su participación en la regulación funcional del eje HHA, y su posible implicación en procesos de estrés.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, en este estudio se ha pretendido conseguir un mejor conocimiento del papel de GRP en la regulación del eje HHA así como de los mecanismos endocrinos y neuroquímicos implicados en dicha regulación.

Para ello nos hemos planteado los siguientes objetivos:

**Objetivo 1: Estudio del efecto de GRP sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal *in vitro***

En este primer apartado se han evaluado los efectos de GRP sobre la secreción de ACTH y corticosterona y se ha explorado a que nivel del eje HHA se ejerce esta acción. Asimismo se ha investigado si dicho efecto está mediado a través del receptor de GRP y si la liberación de ACTH que produce GRP es un proceso calcio-dependiente.

**Objetivo 2: Estudio del efecto de GRP sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal *in vivo***

En este segundo apartado se ha caracterizado tanto la vía de administración como las dosis, los tiempos y el mecanismo de acción por el cual GRP activa el eje HHA en condiciones basales *in vivo*.

**Objetivo 3: Estudio del efecto de GRP sobre la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en situación de estrés**

Una vez estudiada la posible participación de GRP en la regulación endógena de la secreción de ACTH y corticosterona, decidimos explorar, de forma comparativa con CRF, si GRP interviene en la regulación de la secreción de ambas hormonas en situación de estrés.

**Objetivo 4: Estudio del efecto de GRP sobre la actividad serotoninérgica en el núcleo paraventricular del hipotálamo**

Dada la importancia de la serotonina en la regulación del eje HHA, el objetivo de este cuarto apartado ha sido caracterizar el eventual efecto de GRP sobre la actividad serotoninérgica en el NPV, tanto en situación basal como de estrés, así como los mecanismos implicados en el efecto observado.

**5. Estudio del efecto de GRP sobre la expresión génica de CRF, proencefalina y proopiomelanocortina**

En esta última sección, y de forma preliminar, se ha investigado el potencial efecto de GRP sobre la expresión génica de los péptidos CRF, PENK y POMC. También se ha estudiado la evolución temporal del efecto observado.

# **Materiales y métodos**



## **1. Animales, péptidos y reactivos químicos**

### **1.1. Animales**

En todos los experimentos, tanto *in vivo* como *in vitro*, se utilizaron ratas macho raza Sprague Dawley de peso 225-250 g, suministradas por Harlán Interfauna (San Feliú de Codines, Barcelona). A su llegada al laboratorio, las ratas se estabularon en un animalario con un ciclo de luz/oscuridad (8:00-20:00 h) y permanecieron estabuladas al menos tres días antes de ser utilizadas, siendo este tiempo más o menos largo en función del tipo de experimento.

### **1.2. Péptidos**

El Péptido Liberador de Gastrina o GRP fue suministrado por Península Laboratories (Belmont, California, Estados Unidos). El fragmento utilizado corresponde a la secuencia terminal del péptido (aminoácidos 14-27), similar en cerdo y en hombre.

El antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina fue suministrado por RBI (Research Biochemicals International, Natick, Estados Unidos). Actualmente los productos de esta compañía se distribuyen en España a través de Sigma (Madrid).

El antagonista del receptor de CRF α-helical (9-41) CRF fue suministrado por Sigma (Madrid).

### **1.3. Reactivos químicos**

La procedencia de los reactivos químicos utilizados en la preparación de las distintas soluciones se detalla en los apartados en los que se menciona su utilización.

## **2. Métodos experimentales *in vitro***

### **2.1. Explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal**

Los experimentos en explantes se realizaron siguiendo el método descrito por Scaccianocce y cols. (1989, 1990, 1993) con algunas modificaciones.

#### *2.1.1. Explantes de hipotálamo e hipófisis*

El fundamento de este método *in vitro* consiste en estimular los hipotálamos con los péptidos a estudiar y medir la liberación de CRF que se produce a nivel hipotalámico de forma indirecta, gracias a la capacidad del medio de incubación de los hipotálamos de producir liberación de ACTH a partir de cuartos de hipófisis (Buckingham y Hodges, 1977; Scaccianocce y cols. 1990, 1993).

Las ratas se sacrificaron por decapitación. Se extirparon tanto los hipotálamos como

las hipófisis. En el caso de las hipófisis se separó la neurohipófisis y cada mitad de la adenohipófisis se dividió en dos partes iguales con una hoja de bisturí estéril.

El medio utilizado en experimentos de explantes de hipotálamo e hipófisis (medio Bradbury) tiene la siguiente composición:

NaCl (Sigma, Madrid): 3,683 g/500 ml (126 mM)  
KCl (Sigma, Madrid): 0,223 g/500 ml (6 mM)  
Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Sigma, Madrid): 0,071 g/500 ml (1 mM)  
MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O (Sigma, Madrid): 0,108 g/500 ml (0,88 mM)  
CaCl<sub>2</sub>·2 H<sub>2</sub>O (Sigma, Madrid): 0,106 g/500 ml (1,45 mM)  
Acido ascorbico (Sigma, Madrid): 4,4 mg (0,05 mM)  
D-glucosa·1H<sub>2</sub>O (Sigma, Madrid): 1,08 g/500 ml (11 mM)  
Hepes (Sigma, Madrid): 3 g/500 ml

Tras disolver todos estos compuestos en 500 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7,4 con NaOH y se añade albumina bovina (Sigma, Madrid; 2,5 g/500 ml).

Los hipotálamos y cada cuarto de hipófisis se preincubaron individualmente en 1 ml de medio Bradbury durante 1 h a 37°C en baño, cambiando el medio cada 30 min. Transcurrido este tiempo (60 min), el grupo de hipotálamos designado como control se incubó durante 20 min a 37°C con 1 ml de medio nuevo para establecer la liberación basal, mientras que el resto de los hipotálamos y los cuartos de hipófisis se preincubaron durante otros 30 min. A los 90 min, el resto de los hipotálamos se estimularon con 1 ml de medio con GRP y/o su antagonista (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina, dependiendo del experimento, durante 20 min, mientras que los cuartos de hipófisis se preincubaron durante otros 30 min. A los 120 min, las hipófisis se incubaron con 1 ml del medio en el que habían sido incubados los hipotálamos durante 20 min. A cada cuarto de hipófisis le corresponde un hipotálamo, de modo que cada cuarto de hipófisis es incubado con 1 ml del medio de incubación de un hipotálamo. Posteriormente, el medio se centrifugó a 3.000 rpm, 10 min, 4°C para precipitar cualquier resto celular o de tejido y se almacenó a -80°C en alícuotas de 100 µl hasta medir la cantidad de ACTH liberado por RIA.

Al final de cada experimento se pesó cada cuarto de hipófisis para expresar el resultado final en ng/ml de ACTH por mg de tejido húmedo.

### *2.1.2. Explantes de hipófisis*

Se extirparon las hipófisis, y tras separar la neurohipófisis, cada mitad de la adenohipófisis se dividió en dos partes iguales con una hoja de bisturí estéril.

Cada cuarto de hipófisis se preincubó individualmente en 1 ml de medio Bradbury (descrito en el apartado 2.1.1.) durante 2 h a 37°C en baño, cambiando el medio cada 30 min. Transcurrido este tiempo, los cuartos se incubaron durante 20 min a 37°C con 1 ml de medio nuevo (grupo control) o 1 ml de medio con GRP y/o su antagonista (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina, dependiendo del experimento. Pasados los 20 min el medio se centrifugó a 3.000

rpm, 10 min, 4°C para precipitar cualquier resto celular o de tejido y se almacenó a -80°C en alícuotas de 100 µl hasta medir la cantidad de ACTH liberado por RIA.

Al final de cada experimento se pesó cada cuarto de hipófisis para expresar el resultado final en ng/ml de ACTH por mg de tejido húmedo.

### *2.1.3. Explantes de adrenal*

Se extirparon las glándulas adrenales, se limpiaron de tejido adiposo y con la ayuda de una hoja de bisturí cada glándula adrenal se dividió en cuatro cuartos.

El medio utilizado en experimentos de explantes de adrenal (medio KRBAG) tiene la siguiente composición:

NaCl (Sigma, Madrid): 3,488 g/500 ml (118 mM)  
KCl (Sigma, Madrid): 0,176 g/500 ml (4,74 mM)  
KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Sigma, Madrid): 0,068 g/500 ml (1 mM)  
MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O (Sigma, Madrid): 0,123 g/500 ml (1 mM)  
CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O (Sigma, Madrid): 0,187 g/500 ml (2,55 mM)  
Glucosa · 1 H<sub>2</sub>O (Sigma, Madrid): 1,89 g/500 ml (11 mM)  
Hepes (Sigma, Madrid): 3 g/500 ml

Tras disolver todas estas sales en 500 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7,4 con NaOH y se añade albumina bovina (Sigma, Madrid; 1,250 g/500 ml).

Cada cuarto de adrenal se preincubó individualmente en 1 ml de medio KRBAG durante 2 h a 37°C en baño, cambiando el medio cada 30 min. Transcurrido este tiempo, los cuartos se incubaron durante 1 h a 37°C con 1 ml de medio nuevo (grupo control) o 1 ml de medio con GRP y/o su antagonista (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina, dependiendo del experimento. Pasado el tiempo de incubación, el medio se centrifugó a 3.000 rpm, 10 min, 4°C para precipitar cualquier resto celular o de tejido y se almacenó a -80°C en alícuotas de 50 µl hasta medir la cantidad de corticosterona liberada al medio por RIA.

Al final de cada experimento se pesó cada cuarto de adrenal para expresar el resultado en ng/ml de corticosterona por mg de tejido húmedo.

## **2.2. Disociados de adenohipófisis**

### *2.2.1. Cultivo primario de células adenohipofisarias de rata*

Antes de extraer las hipófisis es necesario la preparación del medio de cultivo y de los reactivos que se utilizarán en la disociación.

El medio utilizado en la disociación se prepara a partir de medio DMEM en polvo (Dulbecco's Modified Eagle Medium; 4.500 mg/l glucosa, sin piruvato sódico, sin NaHCO<sub>3</sub>; Gibco BRL, Life Technologies, Barcelona). Para ello se disuelven 1,34 g de medio DMEM en

polvo y 0,3 g de Hepes (Sigma, Madrid) en 100 ml de agua miliQ estéril. Este último se añade para mantener el pH del medio mientras las células permanecen fuera del incubador. Tras ajustar el pH a 7,4 con NaOH se añadieron 0,25 g de albúmina bovina (Sigma, Madrid).

Además es necesario preparar tres soluciones:

Desoxirribonucleasa (DNAsa):

Se preparan alícuotas de DNAsa (Sigma, Madrid) de concentración 10 µg/ml en agua miliQ. En el momento del cultivo se diluye cada alícuota 100 veces en medio DMEM.

Tripsina:

A partir de tripsina (Sigma, Madrid) se prepara una solución de 10 ml de concentración 0,4% (p/v) en medio DMEM. A esta solución se le añadieron 20 µl de la solución de DNAsa anteriormente preparada. Posteriormente se esterilizó esta solución a través de un filtro estéril (Millex GS 0,22 µm, Millipore, Madrid).

Inhibidor de tripsina

Se preparan alícuotas de 1 ml de inhibidor de tripsina (Sigma, Madrid) de concentración 3 mg/ml. En el momento del cultivo se diluye cada alícuota 10 veces en medio DMEM. A esta solución se le añadieron 10 µl de la solución de DNAsa anteriormente preparada. Al igual que la tripsina, la solución de inhibidor de tripsina se esterilizó a través de un filtro estéril.

En cada cultivo se utilizaron 8-10 hipófisis. Primero se decapitaron los animales para extraer la adenohipófisis de la base del cráneo en condiciones estériles. Tras separar la neurohipófisis, se troceó la adenohipófisis con una hoja de bisturí estéril y los fragmentos se incubaron en la solución de tripsina anteriormente preparada durante 20 min en baño con agitación, para facilitar la acción de los enzimas. Tras centrifugar a 3.000 rpm, 10 min, 15°C, se retiró el sobrenadante y se añadieron 10 ml de la solución de inhibidor de tripsina anteriormente preparada. Los fragmentos de hipófisis se pasaron entonces con la solución de inhibidor de tripsina a través de una pipeta de 5 ml con una punta de pipeta de 1 ml en su extremo durante 10 min. Transcurrido este tiempo las células ya dispersadas se filtraron a través de un filtro de 100 µm (Falcon, Beckton Dickinson Labware, MA, Estados Unidos), y la suspensión celular se centrifugó a 3.000 rpm, 10 min, 15°C. Posteriormente se decantó el sobrenadante y se suspendieron las células en un volumen pequeño de medio de cultivo líquido (DMEM sin piruvato sódico, con 4.500 mg/l glucosa, con piridoxina; Gibco BRL, Life Technologies, Barcelona) suplementado con 10% de suero bovino fetal activado (Reactiva, Barcelona) y 1% de una solución de antibióticos (Penicilina 1.000 UI/ml y Estreptomina 10.000 µg/ml; Bio-Whittaker, Bélgica). Se contó el número de células en cámara de Newbauer y se sembraron las células en placas de 24 pocillos especiales para cultivos primarios (Falcon, Beckton Dickinson Labware, MA, Estados Unidos), a una densidad de 200.000-250.000 células/pocillo en 0,5 ml de medio por pocillo. El volumen final de medio en el que hay que resuspenden las células se calcula de la siguiente forma:

$$\text{n}^\circ \text{ células contadas en la cámara de Newbauer} \cdot 10^4 = \text{n}^\circ \text{ de células totales}$$

$n^{\circ}$  células totales/ $n^{\circ}$  células por pocillo= $n^{\circ}$  pocillos que pueden llenarse

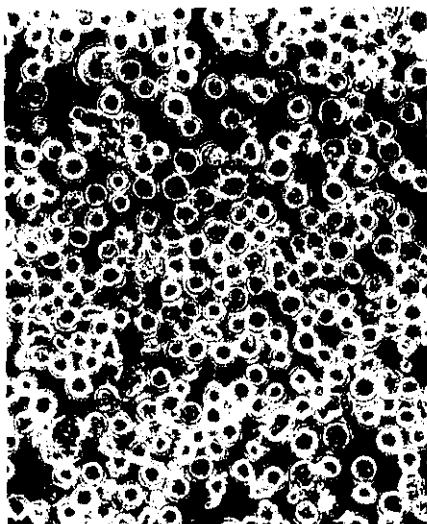
$n^{\circ}$  pocillos que puedan llenarse $\cdot$ 0,5 ml= volumen de medio en el que se resuspenden las células

Los cultivos se mantuvieron en un incubador durante 4 días con una concentración de CO<sub>2</sub> de 5%. Al cuarto día, las células ya se habían adherido al fondo de la placa, estando preparadas para realizar los experimentos (figura 14).

FIGURA 14  
Cultivo primario de células adenohipofisarias de rata

---

(a)



(b)



---

(a) Aspecto que presentan los corticotrofos después del proceso de disociación. (b) Morfología de los corticotrofos después de cuatro días en cultivo.

### 2.2.2. Experimento de secreción de ACTH

El día del experimento se sacaron las células del incubador, se aspiró el medio de cultivo y se añadieron 0,5 ml de medio DMEM preparado este mismo día a partir de DMEM en polvo de la misma forma indicada en el apartado 2.2.1. Las células se incubaron en este medio durante 1 h en baño a 37°C. Posteriormente se aspiró el medio y se añadió a una de las placas 0,5 ml de medio Bradbury con una concentración de Ca<sup>2+</sup> 1,5 mM (preparado de la forma indicada en el apartado 2.1.1) y a la otra placa 0,5 ml de medio Bradbury con baja concentración de Ca<sup>2+</sup> (preparado de la forma indicada en el apartado 2.1.1. pero añadiendo 5,6 mg/l de ClCa<sub>2</sub> (38 μM) y 18,42 mg/l de Na<sub>2</sub>EDTA (50 μM), de modo que la concentración final de Ca<sup>2+</sup> es 200 nM). Tras un periodo de preincubación de 30 min a 37°C, se aspiró el

medio, se añadieron 0,5 ml de medio nuevo y las células se preincubaron durante 30 min más a esta misma temperatura. Tras estos dos periodos de preincubación, se aspiró el medio y se añadió a una de las placas medio nuevo ( $\text{Ca}^{2+}$  1,5 mM) sin GRP (grupo control) y con distintas concentraciones de GRP. A la otra placa se añadió medio nuevo ( $\text{Ca}^{2+}$  200 nM) sin GRP (grupo control) y con distintas concentraciones de GRP. Las células se incubaron en estas condiciones durante 30 min. Tras este tiempo, se centrifugó el medio de cada pocillo a 3.000 rpm, 10 min, 4°C, para precipitar cualquier resto celular y se guardó a -80°C en alícuotas de 100  $\mu\text{l}$  hasta su análisis por RIA.

Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado y cada experimento se repitió dos veces, obteniéndose en ambos casos el mismo resultado.

### 3. Procedimientos quirúrgicos

#### 3.1. Administración intracerebroventricular

La administración icv se efectuó después de proceder a la canulación crónica del ventrículo lateral derecho del cerebro. Para ello, se anestesiaron las ratas con Equitesin (3 ml/kg; intraperitoneal). Este tipo de anestesia presenta varias ventajas, como son su rápida inducción y eliminación, además de la baja mortalidad que produce en las ratas.

Su composición es la siguiente:

- 21,25 ml de hidrato de cloral (Sigma, Madrid) disuelto en 49,4 ml de etanol absoluto. Añadir a esta solución secuencialmente:
- 4,86 g de pentobarbital sódico disueltos en 21 ml de agua destilada (o 24,3 ml de pentobarbital sódico comercial al 20% (Euta-Lender, Laboratorios Normon, Madrid)
- 198 ml de 1-2 propilenglicol (Panreac, Madrid)
- 10,63 g de  $\text{SO}_4\text{Mg}$  (Sigma, Madrid) disueltos en 50 ml de agua destilada
- Completar hasta 500 ml con agua destilada.

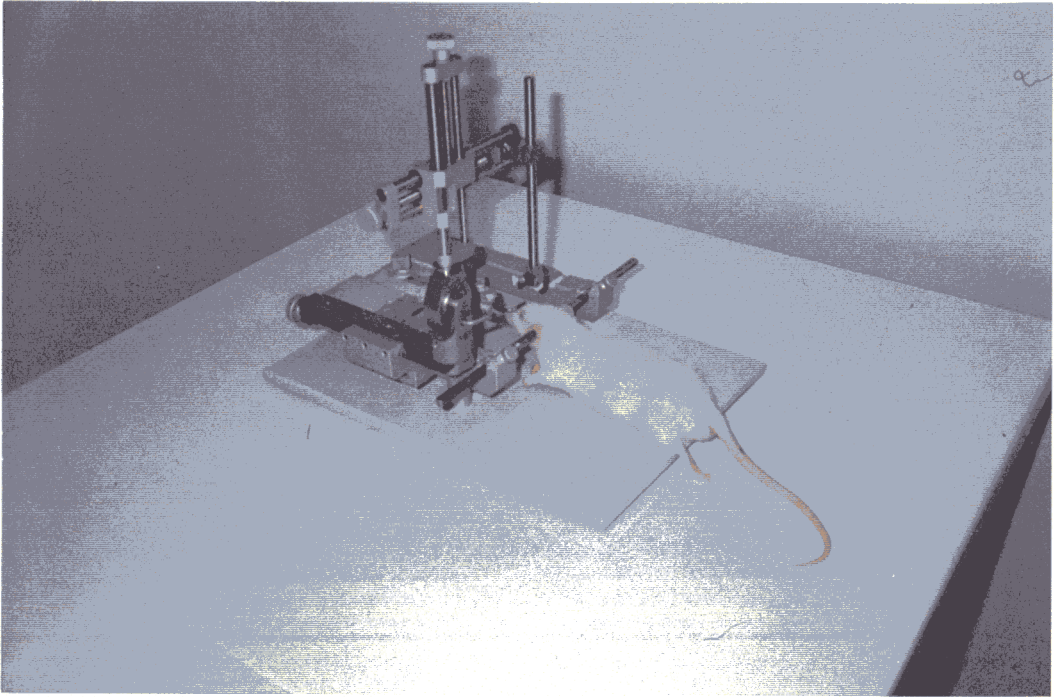
Una vez anestesiadas, las ratas se colocaron en un aparato de cirugía estereotáxica (David Kopf Instruments, Tujunga, California, Estados Unidos) con la barra de incisivos colocada 2,4 mm por debajo del plano horizontal. Posteriormente se implantó una cánula de acero inoxidable de tamaño 23 G en la siguiente posición: 1,4 mm lateral (hacia la derecha) con respecto al bregma (cuya posición es 0,0 mm anterior/posterior) y 3,2 mm ventral (hacia abajo), de acuerdo con el atlas de König y Klippel (*figura 15*). La cánula quedó fijada al cráneo con cemento dental (RR Self-cure acrylic repair material, Dentsply Limited De Trey Division, Surrey, Inglaterra). Para facilitar esta fijación, se hicieron tres pequeños orificios, situados por encima y por debajo de la posición de la cánula, sobre los cuales se colocaron tres pequeños tornillos de acero inoxidable. Durante los cinco días siguientes a la operación, los animales se manejaron cada día para reducir los efectos del estrés debidos a la manipulación.

La administración icv el día del experimento se llevó a cabo utilizando una jeringa Hamilton conectada a un inyector de acero inoxidable de tamaño 30 G mediante una cánula de polietileno de unos 25 cm de longitud (PE-10 tubing; Clay Adams, Parsippany, New Jersey, Estados Unidos). El inyector tiene la longitud necesaria para penetrar 1 mm por debajo del tope de la cánula y llegar así al ventrículo lateral del cerebro (figura 16).

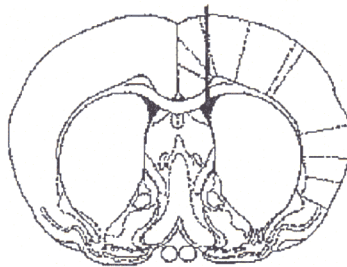
**FIGURA 15**  
**Implantación de una cánula guía en el ventrículo lateral cerebral**

---

(a)



(b)



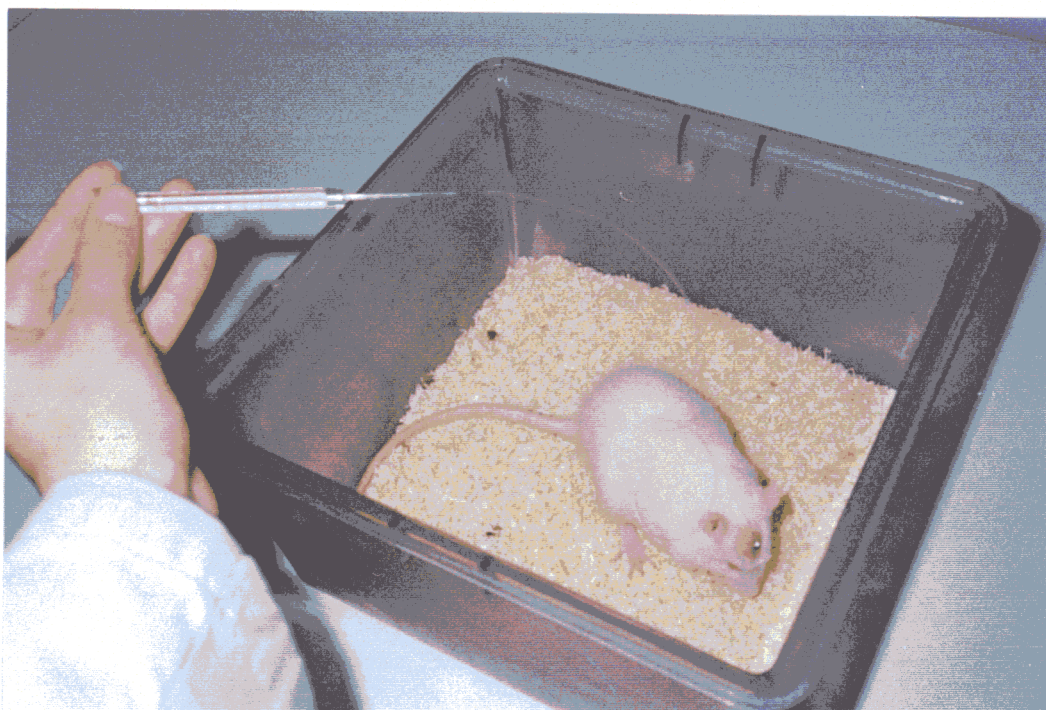
---

(a) Aparato de cirugía estereotáxica utilizado para implantar una cánula guía en el ventrículo lateral cerebral. (b) Sección cerebral donde se muestra la posición de la cánula en el ventrículo lateral.

Tanto los péptidos como el vehículo utilizado en cada experimento se inyectaron en un volumen de 5  $\mu$ l durante 1-2 min para facilitar la difusión de los compuestos en las estructuras cerebrales y evitar el reflujo de la solución por la cánula implantada.

**FIGURA 16**  
***Procedimiento de administración intracerebroventricular***

---



### **3.2. Administración intravenosa**

Una vez anestesiadas las ratas con Equitesin, se les implantó un catéter en la vena yugular (PE-50 tubing; Clay Adams, Parsippany, New Jersey, Estados Unidos) cinco días antes del experimento y se colocaron en cajas individuales. El día del experimento se conectaron los catéteres a un tubo de poliestireno de unos 25 cm de longitud (PE-50 tubing, Clay Adams, Parsippany, New Jersey, Estados Unidos) 60 min antes del comienzo del experimento para reducir los efectos del estrés. Por este catéter se realizó la administración iv y se recogieron muestras de sangre (0,7 ml) a distintos tiempos. El volumen de sangre recogido a cada tiempo se reemplazó con un volumen equivalente de glóbulos rojos en suero salino heparinizado (100 UI/ml).

Para evitar que las variaciones de los niveles plasmáticos de ACTH y corticosterona producidas por el ritmo circadiano pudiesen enmascarar los resultados, todos los

experimentos en los que se midieron ambas hormonas se realizaron entre las 9:00-13:00 h.

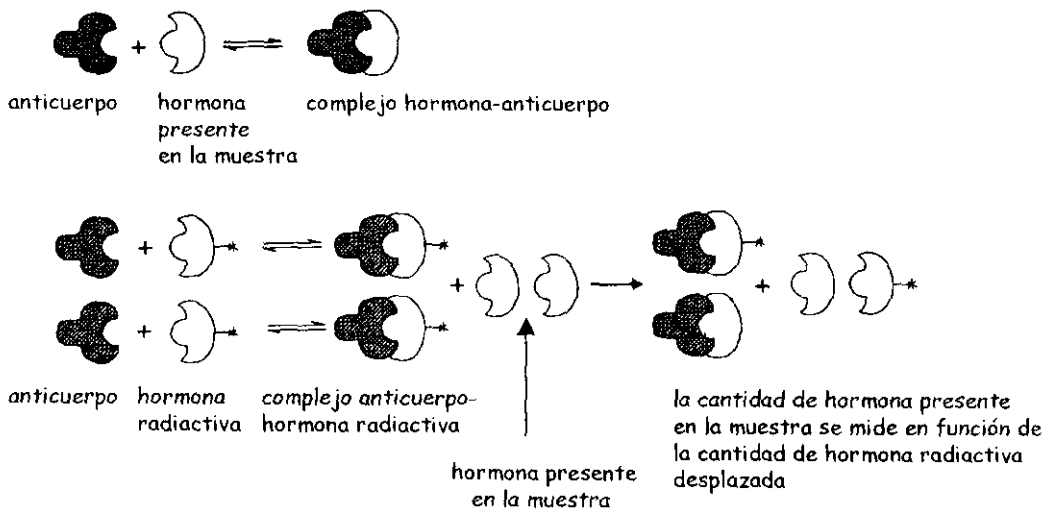
#### 4. Modelo experimental de estrés: estrés por restricción de movimientos

Las ratas, sin anestesiarse, se metieron en cilindros de metacrilato (tamaño interno 16 x 5 x 5,3 cm) con agujeros para que pudiesen respirar y se cerraron por su parte posterior para impedir que se moviesen o saliesen. Tras permanecer en esta posición durante 15 min, los animales se sacaron de los cilindros y fueron sacrificados.

#### 5. Medida de ACTH y corticosterona por radioinmunoensayo

El RIA es un método muy empleado en la medida de hormonas. Consiste en la adición a una muestra (plasma o medio de cultivo) que contiene una cantidad desconocida de hormona, de una cantidad conocida de anticuerpo frente a dicha hormona y una cantidad conocida de hormona marcada radiactivamente. La hormona de la muestra compite con la hormona marcada radiactivamente para unirse al anticuerpo (figura 17). Posteriormente la hormona no unida se elimina y se mide la cantidad de hormona marcada radiactivamente unida al anticuerpo. A mayor cantidad de hormona en la muestra, menor cantidad de hormona marcada se habrá unido al anticuerpo y menor radiactividad tendrá la muestra, y al contrario. La cantidad de hormona en la muestra se calcula extrapolando los resultados del ensayo (cuentas por minuto de radiactividad o cpm) a partir de una curva patrón (logaritmo de la concentración de hormona estándar en abscisas frente a cpm obtenidas para cada concentración de hormona estándar en ordenadas).

FIGURA 17  
Fundamento del radioinmunoensayo



La principal ventaja del radioinmunoensayo es su sensibilidad, ya que permite medir niveles de hormonas muy bajos (del orden de picogramos). Su principal inconveniente es la falta de especificidad del anticuerpo, que en ocasiones puede presentar reacciones cruzadas con otros metabolitos u hormonas de estructura química parecida. En nuestro caso, este problema se evitó mediante el uso de anticuerpos comerciales de gran especificidad.

## **5.1. Radioinmunoensayo de ACTH**

### *5.1.1. Obtención de la muestra*

Para la obtención de plasma, las ratas se decapitaron y la sangre troncal se recogió en tubos de Na<sub>2</sub>EDTA (Sarstedt, Barcelona) colocados en hielo. En aquellos animales en los que se implantó un catéter en la vena yugular, la sangre se recogió en tubos heparinizados (Sarstedt, Barcelona) que se colocaron inmediatamente en hielo. Se centrifugaron los tubos a 3.000 rpm, 20 min, 4°C para separar el plasma de la fracción celular de la sangre y el plasma se almacenó en alícuotas de 300 µl a -80°C hasta su análisis.

En el caso de los explantes de hipotálamo e hipófisis, explantes de hipófisis y disociados de adenohipófisis, el medio de cultivo se almacenó en alícuotas de 100 µl a -80°C hasta su medida por RIA.

### *5.1.2. Ensayo*

La medida de ACTH se realizó siguiendo el método de Arts y cols. (1985) con ligeras modificaciones.

Los tampones utilizados fueron los siguientes:

#### Tampón fosfato 0,01 M, pH=7,4 con Polietilenglicol (PEG)

Se utilizó para diluir los anticuerpos. Contiene:

- 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina (Sigma, Madrid)
- 0,1% (p/v) de Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma, Madrid)
- 0,1% (v/v) de Tritón X-100 (Sigma, Madrid)
- 6% (p/v) de Polietilenglicol 6.000 (Fluka, Sigma, Madrid)

#### Tampón fosfato 0,01 M, pH=7,4 sin PEG

Se utilizó para diluir la curva estándar, la hormona marcada radiactivamente y la muestra, en el caso de los explantes de hipófisis y de hipotálamo e hipófisis, ya que tanto las muestras de plasma como el medio de cultivo de los disociados de adenohipófisis no se diluye.

Contiene:

- 0,1% (p/v) de albúmina sérica bovina (Sigma, Madrid)
- 0,1% (p/v) de Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma, Madrid)
- 0,1% (p/v) de Tritón X-100 (Sigma, Madrid)

Para preparar tampón fosfato 0,01 M, pH 7,4 se preparan dos soluciones de fosfato disódico 0,01 M y fosfato monosódico 0,01 M a partir de fosfato disódico y monosódico

comercial ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  y  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , Merck, Darmstadt, Alemania). Sobre la solución de fosfato disódico se añade el monosódico hasta que el pH sea 7,4. Se toma una cantidad de la mezcla tamponada, a la que se añade con agitación suave los correspondientes reactivos. Ambos tampones se conservan a 4°C.

Es importante destacar que todo el RIA se realiza en hielo, para evitar la posible degradación de ACTH.

Para preparar la curva estándar se utilizó ACTH (1-39) de rata (Sigma, Madrid) diluido en agua destilada a una concentración de 256 pmol/ml. Esta solución debe guardarse a -80°C.

En el momento de realizar la curva de calibrado, se diluye la solución inicial 1:10, para lo cual se toman 100  $\mu\text{l}$  y se añaden 900  $\mu\text{l}$  de tampón sin PEG, con lo que se obtiene una dilución final de 1.280 fmoles/50  $\mu\text{l}$ . Se lleva a cabo otra dilución 1:10, para lo cual se toman 100  $\mu\text{l}$  de la solución de 1.280 fmol/50  $\mu\text{l}$  y se añaden 900  $\mu\text{l}$  de tampón sin PEG, obteniéndose una dilución final de 128 fmol/50  $\mu\text{l}$ . A partir de aquí se hacen diluciones seriadas para obtener las siguientes diluciones (expresadas en fmol/50  $\mu\text{l}$ ): 64, 32, 16, 8, 4, 2, 1 y 0,5.

A cada tubo (Tubos RIA, Sarstedt, Barcelona) se añadió el volumen necesario de muestra problema o 50  $\mu\text{l}$  de estándar. El volumen de muestra problema que se añade en cada tubo depende del tipo de experimento a analizar y es el siguiente:

- 50 o 75  $\mu\text{l}$  de plasma (75  $\mu\text{l}$  en el caso de esperar encontrar bajos niveles de ACTH en la muestra)
- 50  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo de explantes de hipófisis (diluido 6 veces) y explantes de hipotálamo e hipófisis (diluido entre 12 y 3 veces, dependiendo de los niveles de ACTH que se espere encontrar en la muestra)
- 75  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo de disociados de adenohipófisis

Posteriormente se añaden 50  $\mu\text{l}$  de una solución que contiene primer anticuerpo frente a ACTH (IgG-ACTH 1, IgG Corporation, Nashville, Estados Unidos) previamente titulado para obtener una unión máxima del 20% aproximadamente, y 10  $\mu\text{l}$  de  $^{125}\text{I}$ -ACTH (Amersham, Madrid; 2.000 Ci/mmol, 6.000-8.000 cpm/tubo). La solución de primer anticuerpo y de hormona marcada se preparó de la siguiente forma:

Primer anticuerpo:

- Se prepara justo antes de añadirlo. Para 50 tubos, las proporciones necesarias son:
- 50  $\mu\text{l}$  de una solución de primer anticuerpo. Esta solución se prepara a partir de anticuerpo liofilizado comercial disuelto en 1 ml de tampón fosfato 0,01 M, pH=7,4 y se guarda en alícuotas de 50  $\mu\text{l}$  a -20°C.
  - 10  $\mu\text{l}$  de aprotinina (Boehringer-Mannheim, Barcelona) de concentración 0,5% (p/v)
  - 2.440  $\mu\text{l}$  de tampón con PEG

Hormona marcada (<sup>125</sup>I-ACTH)

Se prepara también en el momento. La hormona marcada comercial se diluye en 1 ml de agua destilada y se guarda en alícuotas de 50 µl. En el momento del experimento cada alícuota se diluye en la cantidad de tampón sin PEG necesaria obtener entre 6.000 y 8.000 cpm/10 µl.

Los tubos se incubaron entre 48 y 72 h a 4°C. Posteriormente, para precipitar el complejo antígeno anticuerpo se añadió a cada tubo 10 µl de una solución de segundo anticuerpo (IgG-GARGG, IgG Corporation, Nashville, Estados Unidos).

La solución del segundo anticuerpo se prepara justo antes de añadirlo. Para 50 tubos, las proporciones necesarias son:

- 200 µl de una solución de segundo anticuerpo. Esta solución se prepara a partir de anticuerpo liofilizado comercial disuelto en 2,5 ml de tampón fosfato 0,01 M, pH=7,4 y se guarda en alícuotas de 200 µl a -20°C
- 30 µl de suero normal de conejo (NRS; Sigma, Madrid)
- 270 µl de tampón con PEG

Tras una incubación de 3 horas a 4°C para ayudar a la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo, se añadió a cada tubo 400 µl de una solución de PEG 6.000 6% en tampón fosfato 0,01 M, pH=7,4 y se centrifugaron a 3.000 rpm durante 25 min a 4°C. Posteriormente se decantaron los tubos y se contó el precipitado (que contiene el complejo antígeno-anticuerpo) en un contador gamma (Packard, Pacisa, Madrid). El resultado se obtiene en fmol/50 µl. Mediante un programa de ordenador (Graph Pad Prism para Windows, versión 1.03, 1994) se calculó la cantidad de ACTH por tubo en función de las cpm obtenidas y extrapolando los resultados a partir de la curva estándar. Los valores de ACTH de cada muestra se expresan en distintas unidades en función del tipo de experimento:

- Medida de ACTH en plasma: pmol/l
- Medida de ACTH en explantes: ng/ml ACTH/mg tejido húmedo
- Medida de ACTH en disociados de adenohipófisis: % respecto al valor basal de cada experimento

**TABLA 15**  
**Tabla-resumen de los reactivos a añadir en el radioinmunoensayo de ACTH**

	At	NSB	Bo	Estándares	Muestra problema
		50 µl ACTH estándar de concentración 1.280 fmol/50 µl (por triplicado)	50 µl tampón sin PEG (por triplicado)	50 µl de cada estándar (por triplicado)	50 o 75 µl (por duplicado)
<b>Primer Anticuerpo</b>		50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
<b><sup>125</sup>I-ACTH</b>	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
<b>Segundo anticuerpo</b>		10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
<b>PEG 6.000 6%</b>		400 µl	400 µl	400 µl	400 µl

At: Cuentas totales (deben estar entre 6.000-8.000 cpm)

NSB: Unión no específica (debe ser menor del 10% de las cuentas totales)

Bo: Unión máxima (debe ser igual o mayor del 20% de las cuentas totales)

## 5.2. Radioinmunoensayo de corticosterona

### 5.2.1. Obtención de la muestra

El plasma se obtiene como se describe en el apartado 5.1.1.

En el caso de los explantes de adrenal, el medio de cultivo se almacenó en alícuotas de 50 µl a -80°C hasta su análisis.

### 5.2.2. Ensayo

La corticosterona se midió siguiendo el método de Armario y Castellanos (1984) con algunas modificaciones.

El tampón utilizado para el radioinmunoensayo es tampón fosfato 0,01 M, pH=7,4, conteniendo 0,1% de gelatina y 0,9% de NaCl. Para ello se prepara tampón fosfato 0,01 M pH=7,4, como se describe en el apartado 5.1.2. Se toma una cantidad de la mezcla tamponada, a lo que se añade con agitación suave y calentando, gelatina (0,1%) y NaCl (0,9%). Se conserva a 4°C.

Para preparar la curva estándar se utilizó corticosterona de rata (Sigma, Madrid), diluida en etanol absoluto a una concentración de 0,5 mg/ml y almacenada a -80°C. Se toman 20 µl de esta solución y se añaden 980 µl de etanol. De esta solución se toman 16 µl, se evaporan en corriente de N<sub>2</sub>, y se resuspende en 2 ml de tampón. Este punto representa

una concentración de 8.000 pg/100  $\mu$ l y a partir de él se hacen diluciones en tampón RIA de 4.000, 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62, 31 y 15 pg/100  $\mu$ l.

A cada tubo se añadieron 100  $\mu$ l de plasma diluido 20 veces en tampón RIA o 100  $\mu$ l de medio de cultivo de explantes de adrenal (diluido 25 veces) 100  $\mu$ l de estándar. Posteriormente se añade, tanto a las muestras como a la curva estándar, 100  $\mu$ l de una solución de tripsina (1 mg/ml en tampón RIA; Boehringer Mannheim, Barcelona), incubando la mezcla durante 1 h a temperatura ambiente. Este paso tiene como finalidad liberar la corticosterona de las proteínas plasmáticas a las que se encuentra unida. Tras inactivarse esta reacción enzimática con 100  $\mu$ l de una solución de inhibidor de tripsina (1,25 mg/ml en tampón RIA; Boehringer Mannheim, Barcelona), se añade a la mezcla, en hielo, 100  $\mu$ l de anticuerpo frente a corticosterona (Bioclin, Cardiff, Reino Unido) y 100  $\mu$ l de  $^3$ H-corticosterona (Amersham, Madrid; 88 Ci/mmol, 5.000-7.000 cpm/tubo).

La solución de anticuerpo se prepara a partir de anticuerpo liofilizado comercial disuelto en 1 ml de agua destilada y 9 ml de tampón RIA. Se hacen alícuotas de 500  $\mu$ l, que se diluyen 10 veces (titulación 1:1000) en el momento del ensayo. Esta titulación es la adecuada para conseguir una unión máxima del 20%.

La solución de hormona marcada ( $^3$ H-corticosterona) se prepara en el momento del experimento, diluyendo 2  $\mu$ l de hormona marcada comercial en 25 ml de tampón RIA, proporción necesaria para obtener entre 5.000 y 7.000 cpm/100  $\mu$ l.

Tras 16-24 h de incubación a 4°C, se separa el complejo antígeno-anticuerpo añadiendo a cada tubo 500  $\mu$ l de una solución de carbón activo al 1% en tampón RIA frío. Esta solución debe agitarse previamente durante 30 min hasta su perfecta disolución. Los tubos se incuban en frío con esta solución durante 10 min y se centrifugan a 3.000 rpm, 10 min, 4°C. A continuación se recoge el sobrenadante (que contiene el complejo antígeno-anticuerpo), se le añade 3 ml de líquido de centelleo (Cocktail Biogreen 1, Reactivos Scharlau, Madrid) y se cuentan los tubos en un contador beta de centelleo líquido (Packard, Pacisa, Madrid). El resultado se obtiene en pg/100  $\mu$ l. Mediante un programa de ordenador (Graph Pad Prism para Windows, versión 1.03, 1994) se calculó la cantidad de corticosterona por tubo en función de las cpm obtenidas y extrapolando los resultados a partir de la curva estándar. Los valores de corticosterona de cada muestra se expresan en ng/ml, tanto en el caso del plasma como en los explantes.

TABLA 16

Tabla-resumen de los reactivos a añadir en el radioinmunoensayo de corticosterona

	At	NSB	Bo	Estándares	Muestra problema
	100 µl tampón (por triplicado)	100 µl tampón (por triplicado)	100 µl tampón (por triplicado)	100 µl de cada estándar (por triplicado)	100 µl (dilución 1:20, por triplicado)
<b>Tripsina</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Inhibidor tripsina</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Anticuerpo</b>	(*)	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<b><sup>3</sup>H-corticosterona</b>	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
<b>Carbón activo 1%</b>	-----	500 µl	500 µl	500 µl	500 µl

(\*) en su lugar se añaden 100 µl de tampón

At: Cuentas totales (deben estar entre 5.000-7.000 cpm)

NSB: Unión no específica (debe ser menor del 10% de las cuentas totales)

Bo: Unión máxima (debe ser igual ó mayor del 20% de las cuentas totales)

## 6. Hibridación *in situ*

### 6.1. Preparación del tejido

El día del experimento los animales se sacrificaron sacrificados por decapitación y los cerebros e hipófisis fueron rápidamente extraídos y congelados sobre hielo seco. Posteriormente se guardaron a - 80°C hasta ser cortados.

Para realizar los cortes en criostato, tanto los cerebros como las hipófisis fueron embebidos en gel criogénico (Tissue Teck, Sakura Finetek Europe, Zoeterwoude, Holanda) sobre placas de criostato (Bright Instruments, Londres, Inglaterra). Se cortaron secciones coronales de 20 µm de grosor montándose sobre portaobjetos gelatinizados libres de ARNasas. Estos portaobjetos fueron tratados con una solución de gelatina 3 % y sulfato crómico de potasio 0,025% en agua libre de ARNasas tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

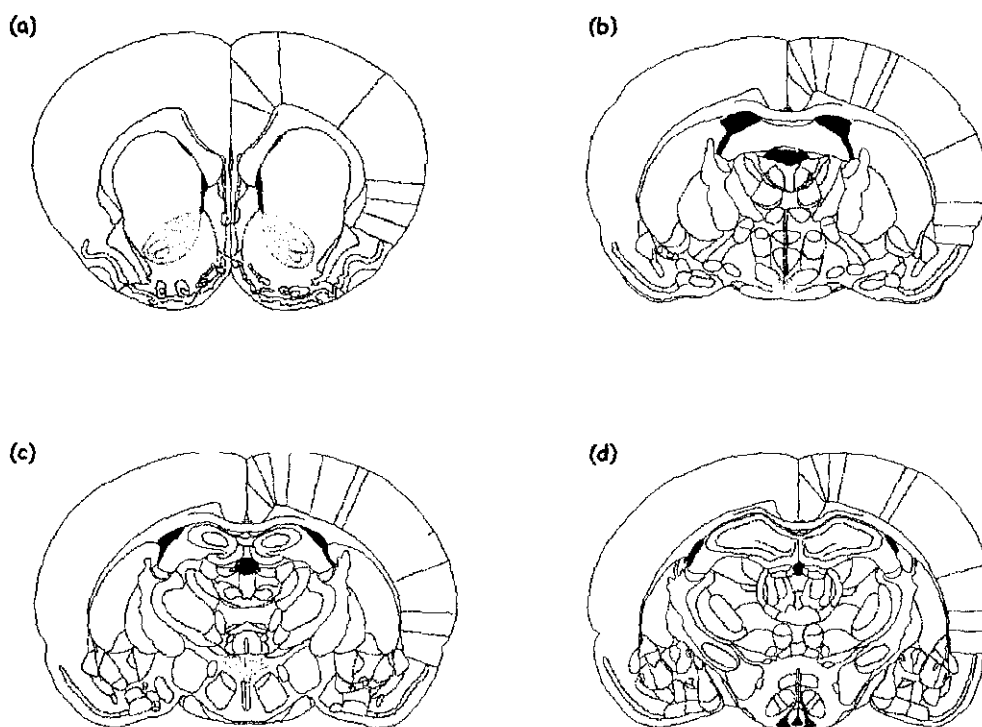
Los cortes obtenidos se secaron sobre placa caliente (37°C) y se guardaron a -80°C hasta el día del ensayo.

Los cortes cerebrales (ocho portaobjetos por núcleo cerebral; dos secciones por cada portaobjetos) y las secciones de hipófisis (cuatro portaobjetos por hipófisis; seis secciones por portaobjetos) se obtuvieron de forma seriada siguiendo el atlas de Paxinos y Watson, con el

fin de estudiar secciones rostrales y caudales en un mismo portaobjetos.

En este trabajo se estudió a nivel cerebral el NPV y NVM del hipotálamo (figura 18) y los lóbulos anterior e intermedio de la hipófisis.

**FIGURA 18**  
**Regiones cerebrales estudiadas en los experimentos de neuroquímica e hibridación *in situ***



Los colores representan los distintos núcleos cerebrales analizados. (a) Núcleo accumbens (color verde; estudios de neuroquímica). (b) Núcleo supraquiasmático (color amarillo; estudios de neuroquímica). (c) Núcleo paraventricular (color azul; estudios de neuroquímica e hibridación *in situ*). (d) Núcleo arqueado (color rojo oscuro; estudios de neuroquímica) y núcleo ventromedial (color rojo claro; estudios de hibridación *in situ*).

(Tomado del atlas de Paxinos y Watson, 1986).

Debido al pequeño tamaño del NPV, para su localización exacta fue necesario utilizar métodos de tinción y observación microscópica. El colorante utilizado fue azul de toluidina (Fluka, Sigma, Madrid) a una concentración de 0,1% (p/v) en acetato sódico 0,1M pH=6,5.

## 6.2. Hibridación *in situ*

### 6.2.1. Marcaje de sondas de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de hibridación *in situ* contenían 48

bases complementarias a la secuencia de los genes de PENK (NEN-Dupont, NEP-502, Madrid), CRF (NEN-Dupont, NEP-554, Madrid) y POMC (Advanced Biotechnology Center, Charing Cross y Westminster Medical School, Londres, Inglaterra).

Las secuencias 5' 3' de los respectivos oligonucleótidos (número de bases en paréntesis) complementaria al ARNm de los genes anteriormente mencionados de rata fueron:

⊕ PENK (388-345):

ATC-TGC-ATC-CTT-CTT-CAT-GAA-ACC-GCC-ATA-CCT-CTT-GCG-AAG-GAT-CTC

⊕ CRF (496-543):

CAG-TTT-CCT-GTT-GCT-GTG-AGC-TTG-CTG-AGC-TAA-CTG-CTC-TGC-CCT-GGC

⊕ POMC (96-134):

CTT-CTT-GCC-CAC-CGG-CTT-GCC-CCA-GCG-GAA-GTG-CTC-CAT-GGA-GTA-GGA.

Los oligonucleótidos se marcaron usando terminal transferasa de timo de cordero (Boehringer Mannheim, Barcelona), para añadir una cola  $\alpha^{35}\text{S}$  desoxiATP (actividad específica >1.000Ci/mmol; Amersham, Madrid) al extremo 3' en presencia de  $\text{CoCl}_2$  y tampón Tris Cl H/cacodilato potásico (Boehringer Mannheim, Barcelona).

La mezcla de la reacción se llevó a cabo tal y como se indica en la tabla 17.

**TABLA 17**

**Esquema de los reactivos a añadir en la reacción de marcaje de distintas sondas de oligonucleótidos**

	<b>PENK</b>	<b>CRF</b>	<b>POMC</b>
<b>Tampón 5X (*)</b>	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$	10 $\mu\text{l}$
<b><math>\text{CoCl}_2</math> (25 mM)</b>	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
<b>Oligonucleótido</b>	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
<b><math>\alpha^{35}\text{S}</math> dATP</b>	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$	5 $\mu\text{l}$
<b>Terminal Transferasa</b>	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$	1 $\mu\text{l}$
<b><math>\text{H}_2\text{O}</math> estéril</b>	24 $\mu\text{l}$	24 $\mu\text{l}$	24 $\mu\text{l}$
<b>Volumen final</b>	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$	50 $\mu\text{l}$

(\*) La composición del tampón 5X es la siguiente: cacodilato potásico 1M, tampón Tris Cl H 125mM pH=6,6, albúmina de suero bovino 1,25 mg/ml.

La reacción se llevó a cabo a 37°C durante 60 min. Se añadieron 12,5 unidades adicionales (0,5  $\mu\text{l}$ ) de terminal transferasa transcurridos los primeros 30 min con el fin de incrementar la incorporación de nucleótido radioactivo. La reacción se paralizó añadiendo 400

μl de tampón Tris Cl H/EDTA pH=7,4 (1 ml Tris Cl 1 M, pH=7,6; 0,5 ml Na<sub>2</sub> EDTA 0,2 M, pH=7,8; 98,5 ml agua DEPC) y 5 μl de ARNt de levadura (10 mg/ml; Boehringer-Mannheim, Barcelona).

Los oligonucleótidos fueron entonces extraídos con 450 μl de una solución de fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (Sigma, Madrid). Tras añadir esta solución, se centrifugaron los tubos a 3.000 rpm, 10 min, 4°C, se extrajo la fase acuosa y se añadió a unos tubos previamente preparados con 1 ml de etanol 100% y 20 μl de NaCl 4M. Posteriormente se mezcló por inversión y se incubó a -20°C durante un mínimo de 30 min. Pasado el tiempo de incubación se centrifugó la mezcla a 3.000 rpm durante 30 min, 4°C, se retiró el sobrenadante y se lavó el precipitado con 200 μl de etanol al 70%. Una vez que se ha secado el precipitado a temperatura ambiente se resuspende en 100 μl de tampón Tris Cl H/EDTA pH=7,4 con 5 μl de ditiotreitol 1M (Boehringer-Mannheim, Barcelona). La actividad específica de las sondas se determinó añadiendo 1 μl de sonda a 10 ml de líquido de centelleo (Cocktail Biogreen 1, Reactivos Scharlau, Madrid) y posterior medida en un contador beta de centelleo líquido (Packard, Pacisa, Madrid). La actividad específica promedio en los distintos marcajes fue aproximadamente de  $2-7,5 \cdot 10^3$  Ci/mmol. Las sondas se guardaron a -20 °C hasta el día del ensayo.

#### 6.2.2. *Tratamientos de prehibridación*

Los tratamientos de prehibridación contribuyen a incrementar la sensibilidad del ensayo. Además, mantienen la morfología celular, reducen la unión electrostática de la sonda al tejido bloqueando los grupos amino de las proteínas y disminuyen la unión no específica de la sonda al tejido.

El día del ensayo, las secciones fueron transferidas de -80°C a -20°C durante 30 min y colocadas sobre papel de filtro. Los portas se dejaron secar en su totalidad a temperatura ambiente, y se montaron en cubetas de lavado estériles donde se llevaron a cabo los tratamientos de hibridación.

Las secciones fueron fijadas por inmersión en paraformaldehído (Sigma, Madrid) al 4% (v/v) en salino tamponado con fosfato (PBS) durante 5 min, se lavaron dos veces en PBS, y fueron tratadas con 0,25% (v/v) de anhídrido acético (Sigma, Madrid) disuelto en 0,1 M de trietanolamina (Sigma, Madrid; 1,25 ml de anhídrido acético + 7 ml de trietanolamina en 500 ml de solución salina) durante 10 min. Tras la acetilación, las secciones fueron deshidratadas a través de una dilución seriada de lavados en etanol (70%, 1 min; 80%, 1 min; 95%, 2 min -preparados con H<sub>2</sub>O-DEPC- y 100%, 1 min), delipidadas en cloroformo durante 5 min, rehidratadas en etanol 100%, 1 min y 95%, 1 min y secadas a temperatura ambiente.

#### 6.2.3. *Hibridación in situ*

La concentración de la sonda marcada usada en nuestros experimentos fue aproximadamente de  $2-3 \cdot 10^5$  cpm/sección. Dicha concentración está en concordancia con la utilizada por otros autores que han estudiado la expresión de genes opiáceos en el cerebro (Rosen y cols., 1992; Hurd y Herkenham 1992; Hammer y cols., 1993).

El día de la hibridación, la sonda radioactiva fue descongelada y añadida al tampón de hibridación que para 20 ml contiene:

- Formamida desionizada 50 % (v/v)
- 4 ml citrato sódico salino (SSC) 4X: Preparado diluyendo SSC 20X cinco veces. SSC 20 X se prepara diluyendo 175,3 g NaCl y 88,2 g de citrato trisódico (Fluka, Sigma, Madrid) en 800 ml de agua DEPC. Se ajusta a pH=7 y se completa con agua DEPC hasta 1 l.
- 4 ml Denhardt's 50 X (siendo la concentración final 1 X; Sigma, Madrid): Contiene 0,2 g ficoll, 0,2 g albúmina bovina y 0,2 g polivinilpirrolidona.
- 1 ml de una solución de ADN de esperma de salmón 10 mg/ml, siendo la concentración final 500 µg/ml (Boehringer Mannheim, Barcelona).
- 100 µl de ARNt de levadura, siendo la concentración final de 250 µg/ml.
- Dextran sulfato 10 % (v/v) (Sigma, Madrid).

Esta mezcla fue aplicada sobre el tejido en un volumen de 50 µl, cubriéndose con una sección equivalente de parafilm manipulado en condiciones estériles. Las secciones se colocaron en una carcasa humidificada y se incubaron a 37°C durante 16-20 horas.

El proceso de hibridación tiene lugar a una temperatura aproximadamente 20°C inferior a la temperatura de fusión. Nuestra experiencia es que la incubación a 37°C produce unos excelentes resultados con todas las sondas utilizadas.

#### 6.2.4. Posthibridación

Tras la incubación, el parafilm se retiró lavando individualmente los portas en SSC 1X a temperatura ambiente. Las secciones se colocaron en una cubeta de tinción con SSC 1X (precalentado a 55°C) y fueron lavadas durante 15 min. La cubeta se introdujo en un baño de agua con oscilación a 55°C. Este procedimiento se repitió 4 veces, cambiando la solución de SSC 1X cada vez. Tras los lavados a alta temperatura, las secciones se lavaron dos veces en SSC 1X durante 30 min, una vez en agua destilada y se secaron al aire.

#### 6.2.5. Autorradiografía

Todos los procedimientos autorradiográficos fueron llevados a cabo en un cuarto oscuro con filtros de seguridad de luz roja para obtener claridad de fondo óptima en los autorradiogramas.

Los portaobjetos completamente secos se colocaron en cassetes de autorradiografía y se expusieron a una película autorradiográfica (Kodak BioMax MR-1, Amersham, Madrid).

Los tiempos de exposición fueron determinados experimentalmente para cada gen y cada región del estudio resultando ser diferentes para cada caso (tabla 18).

El revelado de las películas autorradiográficas fue llevado a cabo de forma manual. Los autorradiogramas se incubaron 1 min en revelador Kodak GBX a 20°C, lavados en agua destilada durante 30 seg y tratados con fijador Kodak GBX a 20°C durante 5 min.

Posteriormente se lavaron de forma continua en agua de grifo y se secaron al aire.

**TABLA 18**  
**Tiempos de exposición de las películas dependiendo del gen y la región de estudio**

Gen	Núcleo	Tiempo de exposición
CRF	NPV	7 días
PENK	NPV	7 días
	NVM	3 días
POMC	Lóbulo anterior (Hipófisis)	6 horas
	Lóbulo intermedio (Hipófisis)	1 hora

## 7. Determinación de serotonina en distintas regiones cerebrales

### 7.1. Preparación del tejido

El tejido se preparó de la misma forma descrita en el apartado 6.1: Se realizaron cortes cerebrales de 600  $\mu\text{m}$  de espesor de las siguientes regiones cerebrales: ACC, ARC, NSQ y NPV en un criostato, siguiendo el atlas de Paxinos y Watson, a una temperatura de  $-10^{\circ}\text{C}$  (figura 18).

Los núcleos mencionados anteriormente se diseccionaron siguiendo una modificación del método de Palkovits (Palkovits, 1973) descrito por Lookingland y Moore (1984). Para ello se hizo incidir perpendicularmente sobre los cortes congelados sobre hielo seco una aguja de 0,5 mm de diámetro que había sido enfriada previamente en hielo seco, de manera que se obtuvo una pequeña muestra de tejido que quedó en el interior del tubo (figura 19). Mediante la inserción de un alambre en su interior, se extrajeron las muestras de tejido, que se colocaron en 100  $\mu\text{l}$  (ACC) y 50  $\mu\text{l}$  (ARC, NSQ y NPV) de una solución tampón HPLC (fosfato sódico dibásico (Sigma, Madrid) 7,1 g (0,05 M), ácido cítrico (Sigma, Madrid) 6,5 g (0,03M) en 1 l de agua HPLC pH =2,75 conteniendo 15% de metanol), y se guardaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

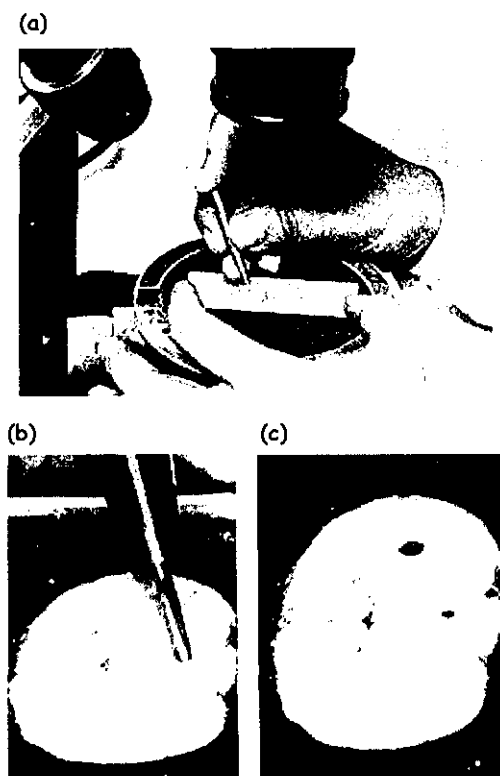
### 7.2. Medida de serotonina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

El día del ensayo se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm, 30 seg y posteriormente se sonicaron en tres sesiones consecutivas de 5 seg cada una, a una potencia de 30 W (Sonic, Vibracell, Estados Unidos). Se extrajo el sobrenadante tras 2 min de centrifugación y se completó el volumen a 100  $\mu\text{l}$  en el caso del ACC y a 70  $\mu\text{l}$  en el caso del ARC, NSQ y NPV. A continuación se inyectó un volumen de cada muestra en un cromatógrafo (modelo Shimadzu

SIL-10 A, refrigerado a 3°C) con detector columétrico electroquímico ESA Colouchem II. La fase móvil utilizada consistió en una solución tampón (fosfato sódico dibásico (Sigma, Madrid) 7,1 g (0,05 M), ácido cítrico (Sigma, Madrid) 6,5 g (0,03M), Na<sub>2</sub>EDTA 0,1 mM (Sigma), octil sulfato sódico (Sigma) 0,040% en 1 l de agua HPLC pH =2,75 conteniendo 25% de metanol). Para la separación de las catecolaminas e indolaminas se utilizó una precolumna y una columna C18 nucleosil (Scharlau, Madrid).

**FIGURA 19**  
***Técnica de microdissección de núcleos cerebrales***

---



---

*(a) Bajo una lupa, y manteniendo el tejido congelado sobre hielo seco, se sujeta la aguja en ángulo oblicuo y se coloca su punta sobre el núcleo cerebral que se va a diseccionar. (b) Cuando la punta de la aguja está sobre la región adecuada, se presiona sobre el tejido verticalmente para obtener el núcleo. (c) Aspecto que presentan las secciones cerebrales después de la disección.*

Para la medida del contenido 5-HT de las muestras se comparó la altura de los picos obtenidos tras inyectar la muestra con la altura de los picos correspondientes a las muestras estándar según lo descrito por Chapin y cols. (1986) y Lindley y cols. (1990). Para ello se prepararon estándares de concentración conocida (500 pg/50 µl) de 5-HIAA, 5-HT, DOPAC, DA y NA (Sigma, Madrid): Se prepara una solución de cada estándar de 1 mg/ml que se diluye

500 veces (100 ng/50 µl). Para llegar a la concentración final de 500 pg/50 µl, se diluyen 50 µl de la última dilución de cada estándar en 9,75 ml de tampón HPLC.

### **7.3. Medida del contenido de proteína en los núcleos cerebrales diseccionados**

La proteína se midió siguiendo el método descrito por Lowry y cols. (1951). Se añadieron 100 µl de NaOH 1N a las muestras y se sonicaron a la máxima potencia hasta que el tejido quedó totalmente homogenizado. A continuación se añadió a cada tubo 1 ml de una solución de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (20 g/l; Sigma, Madrid) /CuSO<sub>4</sub> (10 g/l; Sigma, Madrid) /Tartrato NaK (20 g/l; Sigma, Madrid) en una proporción 100:1:1. Al cabo de 10 min se añadió 100 µl del reactivo de Folin (Sigma, Madrid) diluido a la mitad, mezclándolo todo por agitación. Transcurridos al menos 30 min se procedió a la medida de la absorbancia en un espectrofotómetro a 700 nM. Los resultados obtenidos por HPLC en cada muestra se compararon con la absorbancia obtenida, que se determinó extrapolando los valores de absorbancia obtenidos en una curva estándar de diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina (50 µg/10 µl, 25 µg/10 µl y 12,5 µg/10 µl; Sigma, Madrid). Los datos finales se expresaron en ng/mg proteína.

## **8. Análisis estadístico de los resultados**

Las posibles diferencias entre los distintos grupos experimentales se analizaron estadísticamente mediante un programa de ordenador (Sigma Stat para Windows, versión 1.0, 1992-1994) .

Las diferencias entre dos grupos se analizaron mediante el test de t-Student.

Las diferencias entre más de dos grupos se estudiaron empleando el análisis de varianza (ANOVA) de una vía (cuando existía un sólo tratamiento) o de dos vías (cuando existían dos tratamientos), seguido por el test de Newman-Keuls en el caso de observar diferencias significativas entre los grupos.

# **Resultados**

---

---



## **I. Acción reguladora de GRP sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

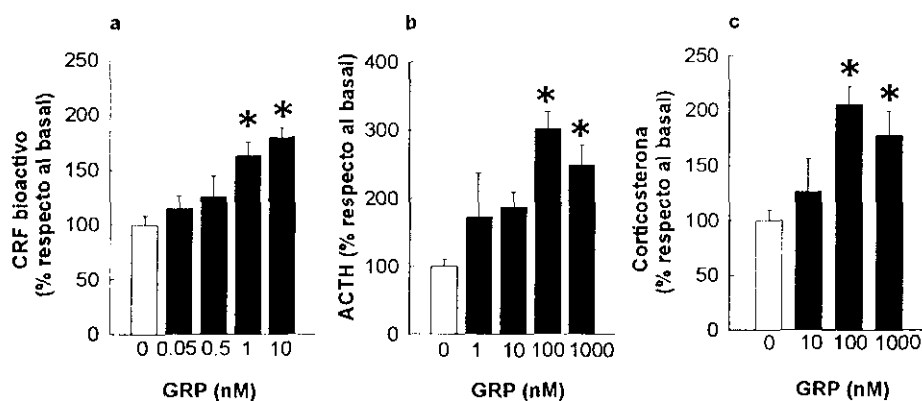
### **ESTUDIOS *IN VITRO***

Como se describe en la introducción del presente trabajo, existen estudios preliminares sobre el efecto de GRP en la liberación de ACTH y corticosterona/cortisol en distintos animales de experimentación y en humanos (Knigge y cols., 1987; Sander y Thomas, 1991; Olsen y cols., 1992). Sin embargo, estos autores no profundizan en algunos aspectos, como son las dosis y los tiempos a los que GRP ejerce su efecto, así como el mecanismo de acción y el lugar exacto del eje HHA sobre el que GRP puede ejercer su acción, y su función en la regulación de estas hormonas en situación basal y de estrés. Por ello, y como primer paso para llegar a un mejor conocimiento del papel de GRP en la regulación del eje HHA, se estudió el efecto de distintas dosis de este neuropéptido sobre la liberación de ACTH y corticosterona a los tres niveles del eje, en distintas preparaciones de hipotálamo, hipófisis y adrenal. Posteriormente se han realizado dos tipos de estudios en estas mismas preparaciones, encaminados a investigar la posible función fisiológica de GRP y la mediación de su receptor sobre la liberación de ACTH y corticosterona. Por último, y con el fin de determinar si la liberación de ACTH inducida por GRP a nivel hipofisario es dependiente de calcio, se ha estudiado el efecto de distintas concentraciones de GRP sobre la liberación de esta hormona tanto en condiciones fisiológicas (concentración de calcio extracelular 1,5 mM) como en concentraciones bajas de calcio extracelular (200 nM).

#### **1. Efecto de GRP sobre la liberación de ACTH y corticosterona, en explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal**

Como se muestra en la *figura 1a*, GRP provoca de forma dosis dependiente la secreción de CRF bioactivo en hipotálamos aislados, es decir, la liberación de CRF se estima midiendo el ACTH liberado a partir de explantes de hipófisis incubados en el medio en que habían sido incubados los hipotálamos. Asimismo, este péptido es capaz de aumentar la liberación de ACTH y corticosterona en explantes de hipófisis y adrenal (*figura 1 b y c*). Mientras que a nivel hipotalámico fueron necesarias concentraciones relativamente bajas de GRP para producir este efecto (1 y 10 nM), a nivel hipofisario y adrenal se requirieron concentraciones más altas (100 y 1000 nM), encontrándose que el efecto máximo de GRP sobre la liberación de ACTH y corticosterona a estos niveles se produce con la concentración de 100 nM.

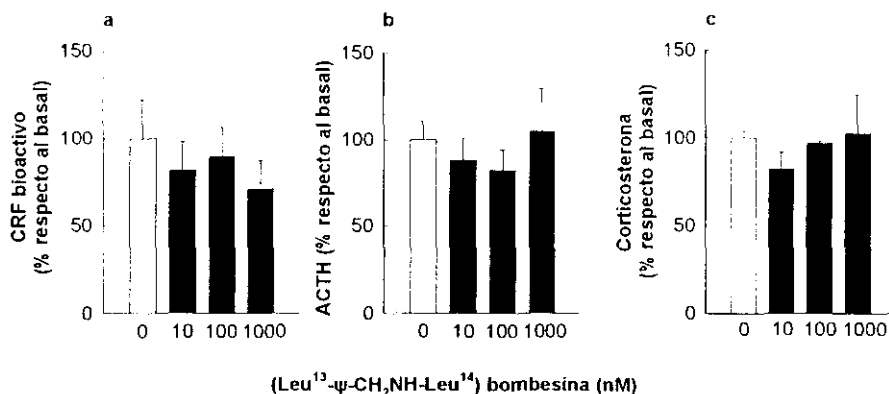
## Resultados



**Fig.1: Estudio dosis-respuesta del efecto de GRP sobre la secreción de ACTH y corticosterona en explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal.** a) Los hipotálamos se incubaron con distintas concentraciones de GRP; la liberación de CRF se estimó midiendo las concentraciones de ACTH en explantes de hipófisis incubados con el medio en el que habían sido previamente incubados los hipotálamos. Los cuartos de hipófisis (b) y los cuartos de adrenal (c) se incubaron con distintas concentraciones de GRP. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona obtenidas a partir de 5-7 determinaciones por grupo.

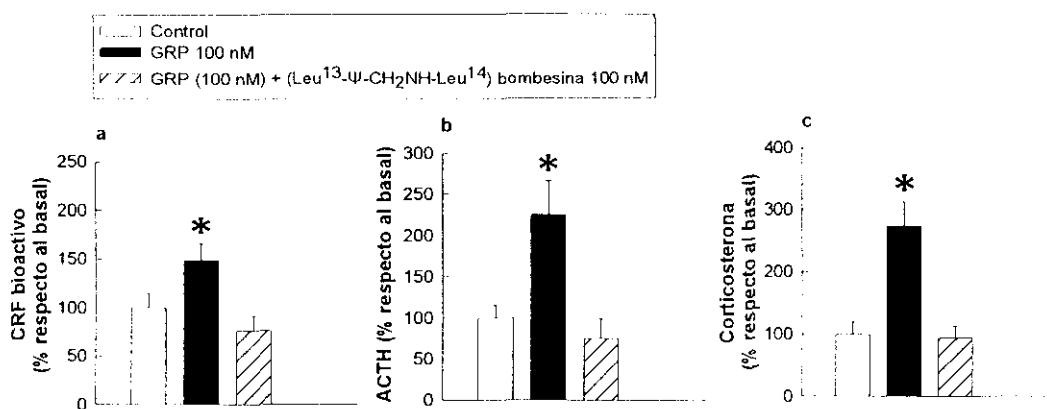
\* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de una vía seguido del test de Student Newman Keuls).

Liberación basal hipotalámica:  $6,5 \pm 0,5$  ng/ml CRF bioactivo/mg tejido húmedo; liberación basal hipofisaria:  $5,0 \pm 0,4$  ng/ml ACTH/mg tejido húmedo; liberación basal adrenal:  $3,7 \pm 0,3$  ng/ml corticosterona/mg tejido húmedo.



**Fig.2: Estudio dosis-respuesta del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{-NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la secreción de ACTH y corticosterona en explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal.** a) Los hipotálamos se incubaron con distintas concentraciones de ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{-NH-Leu}^{14}$ ) bombesina; la liberación de CRF se estimó midiendo las concentraciones de ACTH en explantes de hipófisis incubados con el medio en el que habían sido incubados los hipotálamos. Los cuartos de hipófisis (b) y los cuartos de adrenal (c) se incubaron con distintas concentraciones de ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{-NH-Leu}^{14}$ ) bombesina. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona obtenidas a partir de 5-8 determinaciones por grupo (ANOVA de una vía).

Liberación basal hipotalámica:  $7,6 \pm 1,1$  ng/ml CRF bioactivo/mg tejido húmedo; liberación basal hipofisaria:  $2,8 \pm 0,2$  ng/ml ACTH/mg tejido húmedo; liberación basal adrenal:  $3,3 \pm 0,1$  ng/ml corticosterona/mg tejido húmedo.



**Fig. 3: Estudio del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la secreción de ACTH y corticosterona inducida por GRP en explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal.** (a) Los hipotálamos se incubaron con GRP (100 nM) o GRP (100 nM) y ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (100 nM); la liberación de CRF se estimó midiendo las concentraciones de ACTH en explantes de hipófisis incubados con el medio en el que habían sido incubados los hipotálamos. Los cuartos de hipófisis (b) y los cuartos de adrenal (c) se incubaron con GRP (100 nM) o GRP (100 nM) y ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (100 nM). Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona obtenidas a partir de 5-8 determinaciones por grupo. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) con respecto al grupo control y al grupo tratado con GRP y ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (ANOVA de una vía seguido del test de Student Newman Keuls).

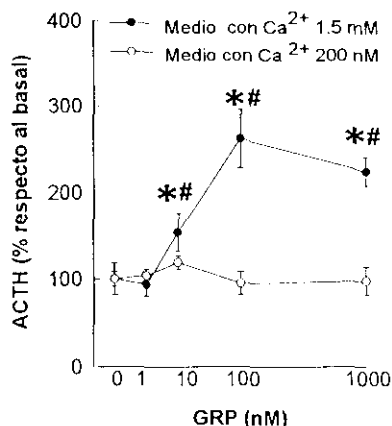
Liberación basal hipotalámica:  $5,5 \pm 0,8$  ng/ml CRF bioactivo/mg tejido húmedo; liberación basal hipofisaria:  $3,6 \pm 0,5$  ng/ml ACTH/mg tejido húmedo; liberación basal adrenal:  $3,1 \pm 0,6$  ng/ml corticosterona/mg tejido húmedo.

## 2. Efecto del antagonista del receptor de GRP ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la liberación basal e inducida por GRP de ACTH y corticosterona en explantes de hipotálamo e hipófisis, hipófisis y adrenal

La adición al medio de cultivo del potente y selectivo antagonista del receptor de GRP ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (Severi y cols., 1989) no tuvo efecto sobre la liberación basal de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona en hipotálamo, hipófisis y adrenal respectivamente (figura 2 a-c). Sin embargo, cuando este antagonista, a una concentración de 100 nM, se añadió al medio de cultivo conjuntamente con GRP (100 nM), sí bloqueó completamente el efecto estimulador de GRP sobre la liberación de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona, en hipotálamo, hipófisis y adrenal respectivamente (figura 3 a-c).

### 3. Estudio de la implicación de calcio extracelular en el efecto estimulador de GRP sobre la liberación de ACTH en disociados de adenohipófisis

En la figura 4 se muestra el efecto que produce la reducción de calcio extracelular en el medio de cultivo sobre la liberación de ACTH inducida por GRP. En un medio con alta concentración de calcio (1,5 mM), GRP eleva de forma dosis-dependiente la secreción de ACTH, siendo esta liberación máxima con una concentración de 100 nM. Sin embargo, cuando la concentración de calcio en el medio se reduce a 200 nM, GRP no produce ningún efecto sobre la secreción de ACTH.



**Fig. 4: Estudio de la dependencia del calcio sobre la liberación de ACTH inducida por GRP en disociados celulares de adenohipófisis.** Tras cuatro días en cultivo, las células se incubaron con GRP (1, 10, 100 y 1000 nM) en un medio con alta (1,5 mM) o con baja concentración de calcio (200 nM) durante 30 min. Los resultados mostrados representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de dos experimentos hechos por cuadruplicado. \* valores del grupo tratado con GRP en un medio con alta concentración de calcio que son significativamente diferentes ( $P < 0,05$ ) respecto a su grupo control (ANOVA de una vía seguido del test de Student Newman Keuls); # valores del grupo tratado con GRP en un medio con alta concentración de calcio que son significativamente diferentes ( $P < 0,001$ ) respecto al grupo tratado con GRP en un medio con baja concentración de calcio (test t-Student). La metodología de la preparación de los disociados se expone en el capítulo de materiales y métodos.

Liberación basal:  $21,2 \pm 1,8$  pmol/l ACTH en medio con alta concentración de calcio;  $19,5 \pm 3,5$  pmol/l ACTH en medio con baja concentración de calcio.

## ESTUDIOS IN VIVO

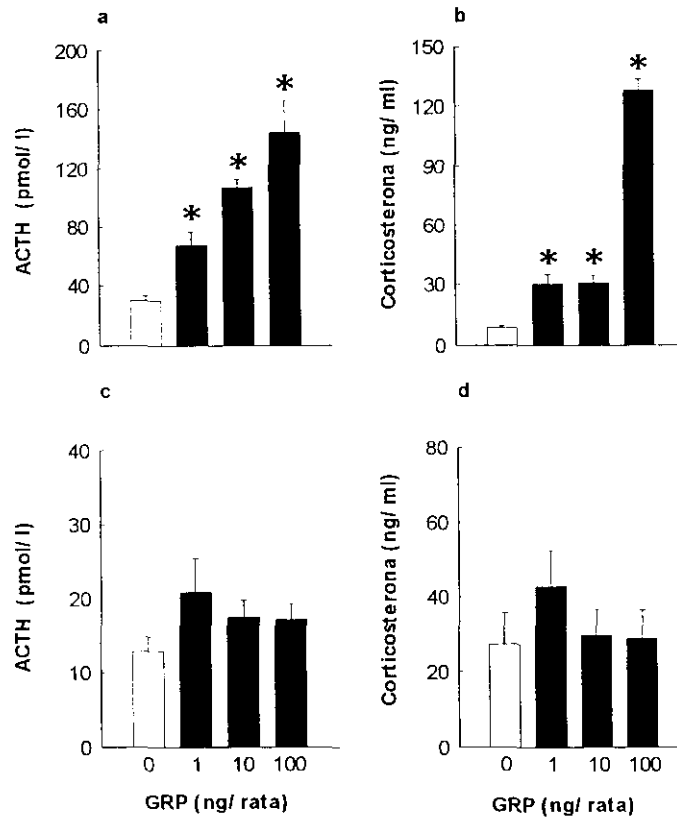
En esta segunda parte de estudios se ha llevado a cabo la caracterización de las dosis y los tiempos a los que GRP estimula la secreción plasmática de ACTH y corticosterona *in vivo*. Asimismo, se ha determinado si GRP ejerce este efecto a nivel central o periférico. Además, y de forma complementaria a los estudios *in vitro*, se ha evaluado la posible función fisiológica de GRP sobre la liberación de ambas hormonas. Por último, y para llegar a un mejor conocimiento del mecanismo por el cual este neuropéptido activa el eje HHA, se ha estudiado la implicación del receptor de GRP y de CRF sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona inducida por GRP, utilizándose para ello dos antagonistas de ambos

receptores, (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina (Severi y cols., 1989) y α-helical (9-41) CRF (Rivier y cols., 1984b).

## 1. Efecto de GRP sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona

### 1.1. Dosis-respuesta

Como se muestra en la *figura 5 a y b*, la administración icv de GRP (1-100 ng/rata) 30 min antes de la toma de sangre produjo un aumento dosis-dependiente en las concentraciones plasmáticas de ambas hormonas. El mayor efecto se produce con la dosis de 100 ng, que eleva las concentraciones plasmáticas de ACTH y corticosterona 4 y 14 veces respectivamente.

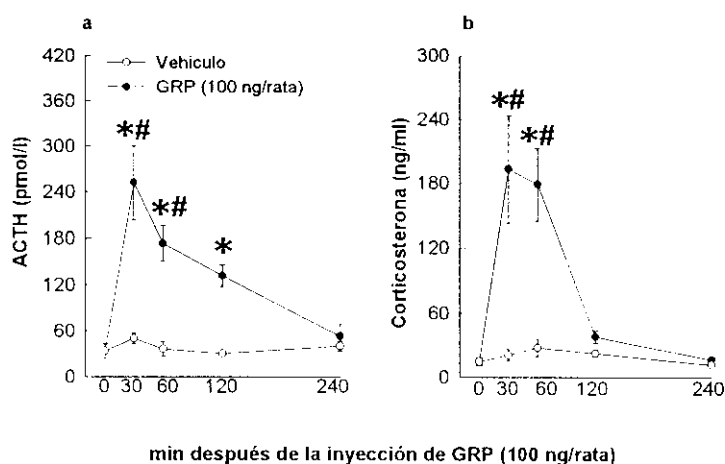


**Fig.5: Estudio dosis-respuesta del efecto de la administración intracerebroventricular e intravenosa de GRP sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona en ratas macho.** (a, b) Las ratas fueron inyectadas con GRP (1, 10 y 100 ng/rata; 5 µl/rata; icv) o su vehículo salino (5 µl/rata; icv). (c, d) Las ratas se inyectaron con las mismas dosis de GRP o su vehículo salino (200 µl/rata; iv). Los animales se decapitaron 30 min después de la administración. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH y corticosterona obtenidas a partir de 5-7 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes (p < 0,05) con respecto al grupo control (ANOVA de una vía seguido del test de Student Neuman Keuls).

Experimentos hechos en nuestro laboratorio revelan que dosis mayores (1  $\mu$ g) no producen aumentos mayores que la dosis de 100 ng. Por el contrario, la administración de las mismas dosis de GRP por vía iv no posee ningún efecto sobre la secreción de ACTH y corticosterona (figura 5 c y d).

### 1.2. Curso temporal

El potente efecto estimulador de GRP sobre la secreción de ACTH y corticosterona se confirma en este estudio de curso temporal (figura 6 a y b). La administración icv de GRP (100 ng/rata) produjo un aumento de la secreción de ACTH y corticosterona a los 30 min. Este efecto se mantuvo durante 30 min más, disminuyendo a los 120 min y retornando a sus respectivos niveles basales 240 min después de la inyección.

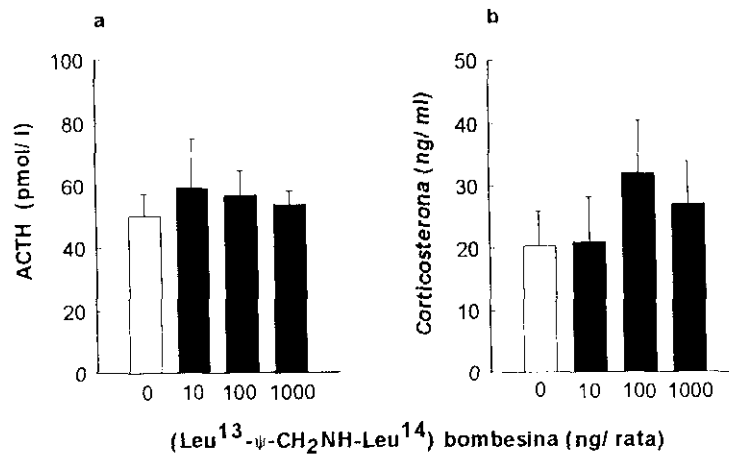


**Fig. 6: Curso temporal del efecto de GRP sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona en ratas macho.** La toma de sangre se realizó a través de un cateter implantado en la vena yugular antes (tiempo cero), 30, 60, 120 y 240 min después de la inyección de GRP (100 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) o de su vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv). Los resultados representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH (a) y corticosterona (b) obtenidas a partir de 5-7 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) en relación a su respectivo control (test t-Student); # valores del grupo tratado con GRP, 30 min después de su administración, que son significativamente diferentes con respecto al grupo tratado con GRP, 120 y 240 min después de su administración (ANOVA de una vía seguido del test de Student-Neuman Keuls).

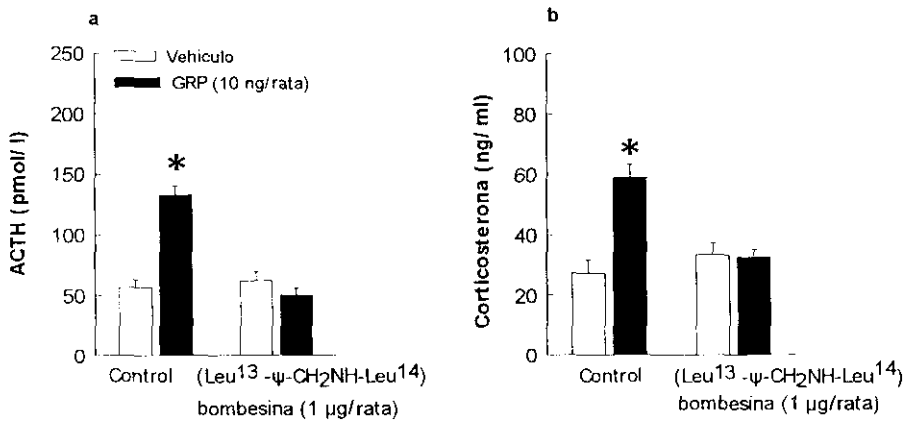
## 2. Efecto del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona tanto basal como inducida por GRP

### 2.1. Dosis respuesta

La administración icv del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina (10-1000 ng/rata) 30 min antes de la toma de sangre no produjo ningún efecto sobre la secreción de ACTH y corticosterona en plasma (figura 7 a y b).



**Fig.7:** Estudio dosis-respuesta del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona en ratas macho. Las ratas se inyectaron con ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (10, 100 ng y 1  $\mu\text{g}$ /rata; 5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) y se decapitaron 30 min después. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH (a) y corticosterona (b) obtenidas a partir de 5-6 ratas (ANOVA de una vía).



**Fig.8:** Estudio del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona inducida por GRP en ratas macho. Las ratas se inyectaron con GRP (10 ng/rata; 5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) y/o ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (1  $\mu\text{g}$ /rata; 5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) por separado o mezclados, en su caso, en la misma solución, y se decapitaron 30 min después. El grupo control recibió una inyección de vehículo salino (5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) 30 min antes de la decapitación. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH (a) y corticosterona (b) obtenidas a partir de 5-9 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de dos vías seguido del test de Student Newman Keuls).

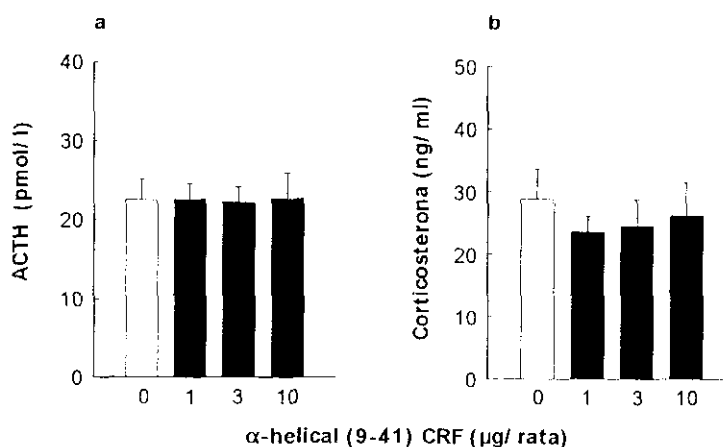
### 2.2. Bloqueo del efecto producido por GRP

Como se muestra en la *figura 8 a y b*, la administración icv del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)bombesina (1 µg/rata) de forma conjunta con GRP, 30 min antes de la toma de sangre, bloqueó el aumento de la secreción de ACTH y corticosterona producido por GRP.

### 3. Efecto del antagonista del receptor de CRF α-helical (9-41) CRF sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona tanto basal como inducida por GRP

#### 3.1. Dosis-respuesta

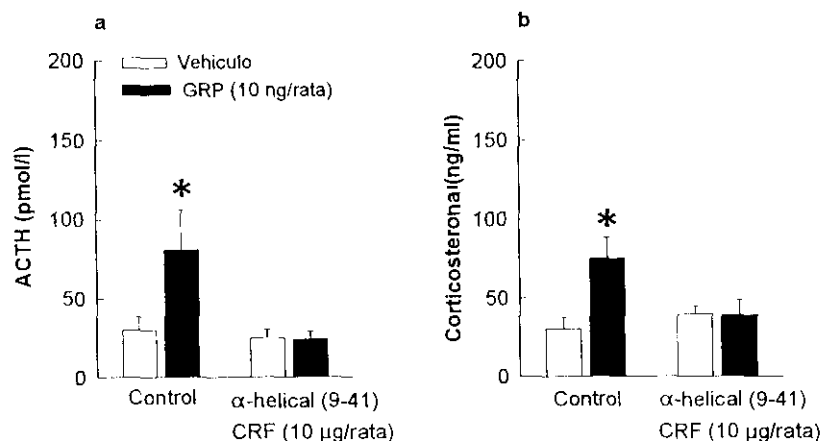
El péptido α-helical (9-41) CRF ha sido descrito como un antagonista competitivo del receptor de CRF (Rivier y cols., 1984b) que también muestra actividad agonista parcial a dosis altas. Para establecer si, en las condiciones experimentales empleadas, este compuesto poseía actividad agónica parcial sobre la secreción de ACTH y corticosterona, se administró vía icv a dosis de 1, 3 y 10 µg/rata, 20 min antes de la toma de sangre, no encontrándose ningún efecto sobre la secreción de ambas hormonas (*figura 9 a y b*).



**Fig.9: Estudio dosis-respuesta del efecto del antagonista del receptor de CRF α-helical (9-41) CRF sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con α-helical(9-41) CRF (1, 3 y 10 µg/rata; 5 µl/rata; icv) o su vehículo salino (5 µl/rata; icv) y se decapitaron 20 min después. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH (a) y corticosterona (b) obtenidas a partir de 6-10 ratas (ANOVA de una vía).

#### 3.2. Bloqueo del efecto producido por GRP

Como muestra la *figura 10 a y b*, la administración icv de α-helical (9-41) CRF (10 µg/rata) 20 min antes de la administración de GRP bloqueó el efecto estimulador de este neuropéptido sobre la secreción de ACTH y corticosterona.



**Fig.10: Estudio del efecto del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona inducida por GRP en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) 20 min antes de la administración de GRP (10 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv). La sangre troncal se recogió 30 min después de la segunda inyección. El grupo control recibió dos inyecciones de vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv), 50 y 30 min antes de la decapitación. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH (a) y corticosterona (b) obtenidas a partir de 5-6 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de dos vías seguido del test de Student Neuman Keuls).

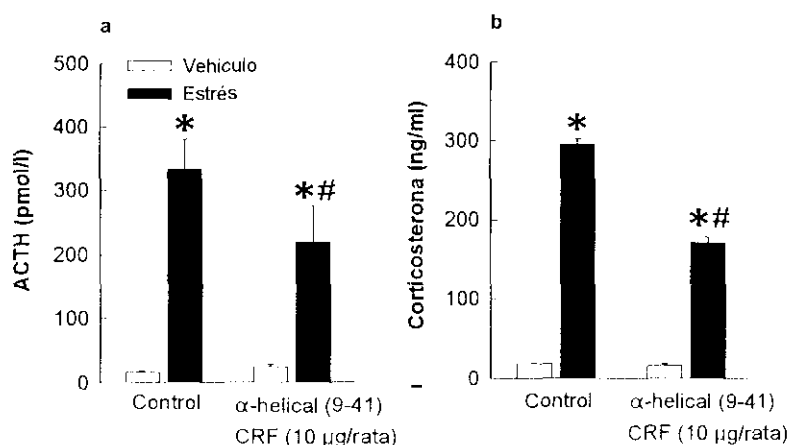
## II. Acción reguladora de GRP sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal en situación de estrés

Una vez determinadas tanto la vía de administración, como las dosis, los tiempos y el mecanismo de acción por el cual GRP activa el eje HHA, y tras no haberse encontrado evidencias de su participación en la regulación tónica de la secreción de ACTH y corticosterona en condiciones basales, se decidió estudiar la posible función fisiológica de este neuropéptido y de su receptor durante la activación del eje HHA en procesos de estrés. El estudio se ha llevado a cabo de forma comparativa con CRF, el activador más potente del eje HHA conocido la fecha. Para ello se han utilizado los antagonistas de los receptores de ambos neuropéptidos mencionados anteriormente.

### 1. Efecto del antagonista del receptor de CRF $\alpha$ -helical (9-41) CRF sobre la secreción de ACTH y corticosterona producida tras estrés por restricción de movimientos

El estrés por restricción de movimientos produce un gran aumento de la secreción plasmática de ACTH y corticosterona (16 veces en ambos casos). La administración icv del antagonista de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rata), 35 min antes de la decapitación, no tuvo efecto sobre la secreción de ACTH y corticosterona plasmática en condiciones basales,

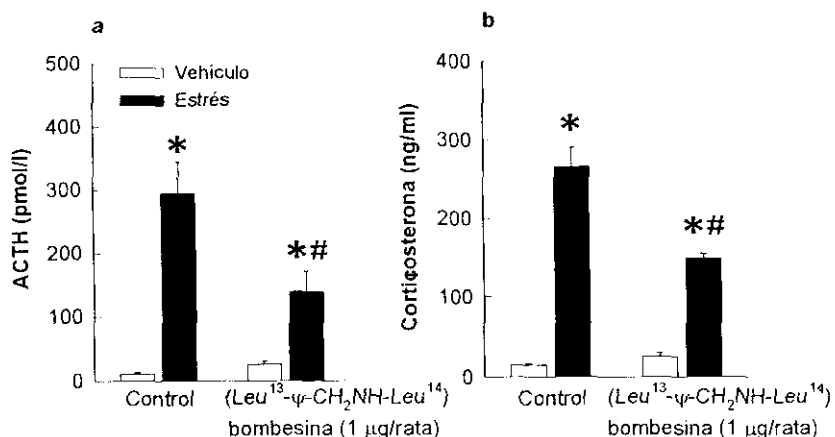
de acuerdo con lo observado anteriormente. Sin embargo, cuando las ratas estresadas se inyectaron icv con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF, 20 min antes de ser sometidas a estrés, este antagonista atenuó el efecto estimulador del estrés por restricción de movimientos sobre la secreción de ACTH (34%) y corticosterona (42%; figura 11 a y b).



**Fig.11: Estudio del efecto del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona producida tras estrés por restricción de movimientos en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) 20 min antes de ser sometidas a 15 min de estrés por restricción de movimientos. La sangre troncal se recogió al final de la sesión de estrés. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH (a) y corticosterona (b) obtenidas a partir de 5-7 ratas. \* valores del grupo sometido a estrés y del grupo sometido a estrés y tratado con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control y al grupo tratado con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF. # valores del grupo sometido a estrés y tratado con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF que son significativamente diferentes con respecto al grupo sometido a estrés (ANOVA de dos vías seguido del test de Student Neuman Keuls).

## 2. Efecto del antagonista del receptor de GRP, (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina, sobre la secreción de ACTH y corticosterona producida tras estrés por restricción de movimientos

Al igual que en la figura 11, el estrés por restricción de movimientos produce un gran aumento de la secreción plasmática de ACTH y corticosterona (25 y 17 veces respectivamente; figura 12 a y b). La administración icv del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina (1  $\mu$ g/rata) no modificó la secreción plasmática de ACTH y corticosterona en condiciones basales, de acuerdo con lo observado anteriormente. Sin embargo, la administración de este antagonista 30 min antes de someter a los animales a 15 min de estrés por restricción de movimientos, atenuó de forma muy marcada el efecto estimulador del estrés sobre la liberación de ACTH (52%) y corticosterona (43%).



**Fig.12: Estudio del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona producida tras estrés por restricción de movimientos en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (1  $\mu\text{g}$ /rata; 5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) 30 min antes de ser sometidas a 15 min de estrés por restricción de movimientos. La sangre troncal se recogió al final de la sesión de estrés. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de ACTH (a) y corticosterona (b) obtenidas a partir de 5-8 ratas. \* valores del grupo sometido a estrés y del grupo sometido a estrés y tratado con ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control y al grupo tratado con ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina. # valores del grupo sometido a estrés y tratado con ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina que son significativamente diferentes con respecto al grupo sometido a estrés (ANOVA de dos vías seguido del test de Student Newman Keuls).

### III. Regulación de la actividad serotoninérgica del núcleo paraventricular del hipotálamo por GRP

Como se describe en la introducción de la presente tesis, los cuerpos celulares serotoninérgicos de las neuronas del núcleo caudal del rafe (B4-B9) se proyectan, entre otras estructuras cerebrales, hacia el NPV. Dada la importancia de la 5-HT en la regulación del eje HHA, el objetivo de la tercera parte de este trabajo ha sido caracterizar el papel de GRP sobre la actividad serotoninérgica del NPV, tanto en situación basal como de estrés, así como los mecanismos implicados en dicho efecto, y evaluar además si los cambios hormonales descritos en la primera parte de este capítulo de resultados se relacionan con modificaciones en la actividad serotoninérgica en este núcleo hipotalámico. Como índice de la actividad serotoninérgica se han medido las concentraciones de ácido 5-HIAA, principal metabolito de la 5-HT.

### 1. Efecto de GRP sobre la actividad serotoninérgica en distintos núcleos cerebrales

Con el fin de explorar la posible implicación de GRP en la regulación de la actividad neuronal serotoninérgica, el primer estudio dentro de este grupo de experimentos consistió en determinar el efecto que produce la administración icv de GRP sobre los niveles de 5-HIAA en diferentes núcleos cerebrales, algunos sin relación con la funcionalidad del eje HHA, como el ACC, y otros relacionados con la activación de dicho eje y la presencia de inmunorreactividad y/o receptores de GRP, como el NSQ, el ARC y el NPV del hipotálamo. Como se muestra en la *figura 13*, GRP (1 -100 ng/rata), administrado 30 min antes de decapitar a las ratas, aumenta de forma dosis-dependiente las concentraciones de 5-HIAA en el NPV a las dosis de 10 y 100 ng (35 y 32% respectivamente), mientras que las concentraciones de 5-HT permanecen constantes. Aunque no se muestra en la tabla, dosis mayores (1 µg) no producen ningún efecto sobre la actividad serotoninérgica. Al contrario de lo que ocurre en el NPV, la administración icv de GRP no modifica las concentraciones de 5-HIAA en el ACC ni en otros núcleos hipotalámicos, como el ARC y el NSQ.

REGIÓN CEREBRAL		Control	1 ng	10 ng	100 ng
<i>n. accumbens</i>	5-HIAA	6,8±0,6	7,1±0,6	7,6±0,7	7,2±0,6
	5-HT	12,9±1,2	12,5±2,2	10,6±1,2	9,2±0,7
<i>n. arqueado</i>	5-HIAA	6,6±0,8	6,5±0,5	5,6±0,4	5,1±0,6
	5-HT	9,9±1,1	9,7±0,7	7,9±0,7	9,0±1,3
<i>n. supraquiasmático</i>	5-HIAA	7,1±0,5	8,1±0,8	8,7±0,7	8,5±0,5
	5-HT	9,2±0,6	8,2±0,6	8,2±1,0	11,0±0,9
<i>n. paraventricular</i>	5-HIAA	8,9±0,7	10,3±0,4	12,1±1,1 *	11,8±0,7 *
	5-HT	15,1±1,9	12,1±1,0	14,9±2,1	13,4±1,5

**Fig.13: Estudio del efecto de la administración icv de GRP sobre las concentraciones de 5-HIAA y 5-HT en el núcleo accumbens y en los núcleos arqueado, supraquiasmático y paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas fueron inyectadas con GRP (1, 10 y 100 ng/rata; 5 µl/rata; icv) o su vehículo salino (5 µl/rata; icv). Los animales se decapitaron 30 min después de la administración. Los resultados representan las medias ± 1 E.E.M. de las concentraciones de 5-HIAA y 5-HT obtenidas a partir de tejidos procedentes de 5-8 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de una vía seguido del test de Student Newman Keuls).

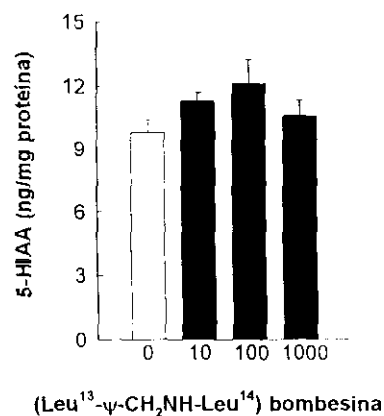
## 2. Efecto del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la activación serotoninérgica producida por GRP o por estrés en el núcleo paraventricular

### 2.1. Dosis respuesta

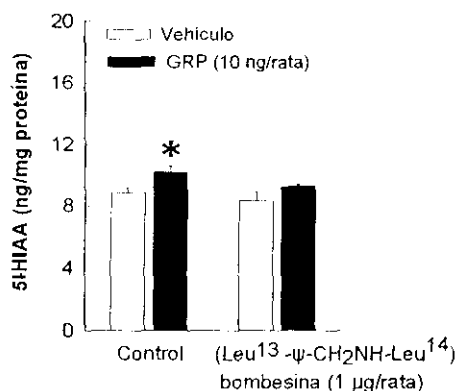
Con el objetivo de evaluar si GRP regula de forma tónica la actividad neuronal serotoninérgica en el NPV, se estudió el efecto que produce la administración del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre las concentraciones de 5-HIAA en el NPV. La administración icv de este compuesto (10, 100 y 1000 ng/rata), 30 min antes de decapitar las ratas, no modificó la actividad neuronal serotoninérgica del NPV (figura 14).

### 2.2. Bloqueo del efecto producido por GRP

Para determinar si el aumento que GRP produce sobre la actividad serotoninérgica en el NPV está mediado selectivamente a través de su receptor, se evaluó el efecto que produce la administración icv conjunta de GRP y del antagonista de su receptor ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (1  $\mu\text{g}$ /rata), sobre las concentraciones de 5-HIAA en el NPV. Como se muestra en la figura 15, la administración del antagonista del receptor de GRP de forma conjunta con GRP, 30 min antes de decapitar a las ratas, bloquea el aumento de la actividad serotoninérgica producido por GRP en el NPV.



**Fig.14: Estudio del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la actividad serotoninérgica en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (10, 100 ng y 1  $\mu\text{g}$ /rata; 5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) y se decapitaron 30 min después. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de 5-HIAA obtenidas a partir de tejidos procedentes de 6-8 ratas (ANOVA de una vía).



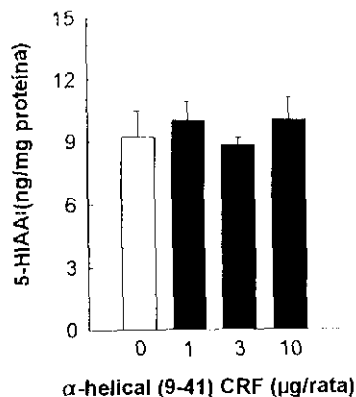
**Fig.15: Estudio del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la actividad serotoninérgica inducida por GRP en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con GRP (10 ng/rata; 5µl/rata; icv) y/ó ( $Leu^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (1 µg/rata; 5 µl/rata; icv) por separado o mezclados en la misma solución y se decapitaron 30 min después. El grupo control recibió una inyección de vehículo salino (5 µl/rata; icv) 30 min antes de decapitar. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de 5-HIAA obtenidas a partir de tejidos procedentes de 5-8 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA dos vías seguida del test de Student Newman Keuls).

### 3. Efecto del antagonista del receptor de CRF $\alpha$ -helical (9-41) CRF sobre la activación serotoninérgica producida por GRP o por estrés en el núcleo paraventricular

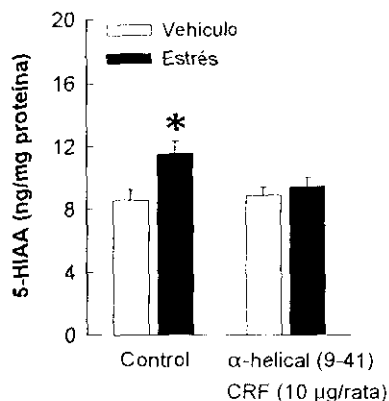
En 1987, Liposits y cols. encontraron que en el NPV, los terminales serotoninérgicos forman sinapsis con neuronas CRFérgicas, lo que sugiere que el sistema central serotoninérgico puede contribuir a regular la funcionalidad del eje HHA actuando directamente sobre neuronas del NPV en las que se sintetiza CRF. Por todo ello, y dado que CRF juega un papel fundamental en la activación del eje HHA y en procesos de estrés, el objetivo de los estudios que a continuación se describen ha sido explorar el efecto de CRF sobre la actividad serotoninérgica en el NPV, tanto en situación basal como de estrés, así como evaluar la posible mediación del receptor de CRF en el aumento de la actividad serotoninérgica inducida por GRP.

#### 3.1. Dosis-respuesta

La administración icv del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (1, 3 y 10 µg/rata), 30 min antes de decapitar a las ratas, no modificó la actividad serotoninérgica del NPV (figura 16).



**Fig.16: Estudio del efecto del antagonista del receptor de CRF α-helical (9-41) CRF sobre la actividad serotoninérgica en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con α-helical (9-41) CRF (1, 3 y 10 µg/rata; 5 µl/rata; icv) o su vehículo salino (5 µl/rata; icv) y se decapitaron 20 min después. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de 5-HIAA obtenidas a partir de tejidos procedentes de 5-6 ratas (ANOVA de una vía).



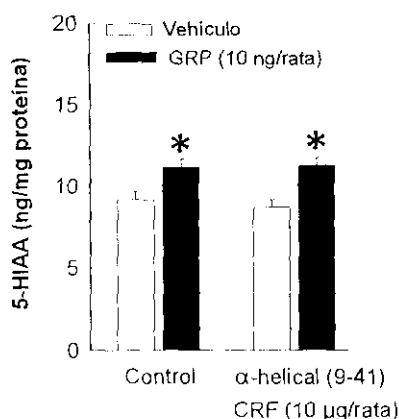
**Fig.17: Estudio del efecto del antagonista del receptor de CRF α-helical (9-41) CRF sobre la actividad serotoninérgica inducida tras estrés por restricción de movimientos en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con α-helical (9-41) CRF (10 µg/rata; 5 µl/rata; icv) o su vehículo salino (5 µl/rata; icv) 20 min antes de ser sometidas a una sesión de 15 min de estrés por restricción de movimientos, y se decapitaron al finalizar la sesión de estrés. El grupo control recibió una inyección de α-helical (9-41) CRF (10 µg/rata; 5 µl/rata; icv) o de su vehículo salino (5 µl/rata; icv), 35 min antes de decapitar. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de 5-HIAA obtenidas a partir de tejidos procedentes de 6-8 ratas. \* valores del grupo sometido a estrés que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de dos vías seguido del test de Student Newman Keuls).

### 3.2. Bloqueo del efecto producido por estrés

Como se observa en la figura 17, el estrés por restricción de movimientos eleva de forma marcada la actividad serotoninérgica en el NPV (35%). Al igual que se observa en la figura 16, la administración icv del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rata), 35 min antes de decapitar a las ratas, no modifica las concentraciones de 5-HIAA en el NPV en situación basal; sin embargo, la administración de este antagonista, 20 min antes de someter a los animales a 15 min de estrés por restricción de movimientos, bloquea el aumento de la actividad serotoninérgica en el NPV inducido por estrés.

### 3.3. Bloqueo del efecto producido por GRP

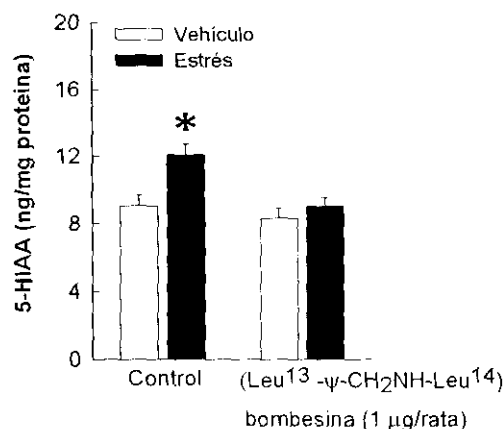
Al contrario de lo observado tras la estimulación de la activación serotoninérgica debida a un estímulo estresante, la administración icv del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rata) 20 minutos antes de la administración de GRP, no bloquea el efecto estimulador de este neuropéptido sobre la actividad serotoninérgica del NPV (figura 18).



**Fig.18: Estudio del efecto del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF sobre la actividad serotoninérgica inducida por GRP en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) 20 min antes de la administración de GRP (10 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv). Las ratas se decapitaron 30 min después de la segunda inyección. El grupo control recibió dos inyecciones de vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv), 50 y 30 min antes de decapitar. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de 5HIAA obtenidas a partir de tejidos de 5-8 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP y  $\alpha$ -helical (9-41) CRF y del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control y al grupo tratado con  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (ANOVA de dos vías seguido del test de Student Newman Keuls).

#### 4. Efecto del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la activación serotoninérgica en el núcleo paraventricular producida por estrés

De acuerdo con lo observado en la figura 17, el estrés por restricción de movimientos aumenta de forma considerable las concentraciones de 5-HIAA en el NPV (34%; figura 19). Dado que la administración icv de GRP también incrementa la actividad serotoninérgica del NPV, el objetivo del presente experimento consistió en evaluar si GRP regula la actividad de estas neuronas en situación de estrés. Como se observa en la figura 19, la administración del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (1  $\mu\text{g}$ /rata), 45 min antes de decapitar a las ratas, no modificó la actividad serotoninérgica en el NPV en situación basal. Sin embargo, la administración de este antagonista 30 min antes de someter a los animales a un periodo de 15 min de estrés bloquea el aumento de la actividad serotoninérgica en el NPV producido por estrés.



**Fig.19: Estudio del efecto del antagonista del receptor de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina sobre la actividad serotoninérgica inducida tras estrés por restricción de movimientos en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas se inyectaron con ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (1  $\mu\text{g}$ /rata; 5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) o su vehículo salino (5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) 30 min antes de ser sometidas a estrés por restricción de movimientos durante 15 min, y se decapitaron al finalizar la sesión de estrés. El grupo control recibió una inyección de ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina (1  $\mu\text{g}$ /rata; 5  $\mu\text{l}$ /rata; icv) o de su vehículo salino (5  $\mu\text{l}$ /rata; icv), 45 min antes de decapitar. Las columnas representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de las concentraciones de 5-HIAA obtenidas a partir de tejidos procedentes de 5-7 ratas. \* valores del grupo sometido a estrés que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de dos vías seguido del test de Student Newman Keuls).

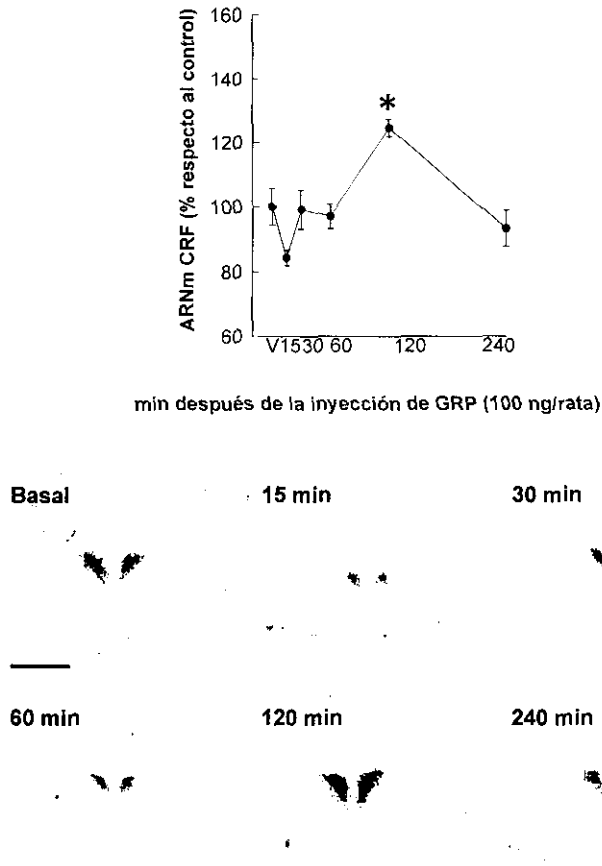
## **IV. Regulación de la expresión génica de neuropéptidos por GRP**

Como se ha descrito en la introducción de la presente tesis, la activación del eje HHA que producen tanto distintos compuestos (5-HT, DA, cannabinoides), como la aplicación de un estímulo estresante, modifica la expresión génica de neuropéptidos implicados en la síntesis y liberación de ACTH, como CRF o POMC. Asimismo, la expresión génica de PENK, precursor de los péptidos opioides leu-enkefalina y met-enkefalina, implicados en la regulación de respuestas de tipo emocional a través de distintas estructuras límbicas y en la regulación de factores hipotalámicos de liberación hormonal, aumenta tras la aplicación de un estímulo estresante.

Por todo ello, el objetivo de esta última sección de experimentos ha consistido en estudiar la regulación de la expresión génica de CRF, POMC y PENK tras la activación del eje HHA que produce la administración icv de GRP, así como la evolución de dicha expresión a lo largo del tiempo. La medida de los precursores de estos péptidos se ha realizado mediante la técnica de histoquímica de hibridación *in situ*, en distintas regiones hipotalámicas e hipofisarias, lugares donde dichos neuropéptidos se expresan en alta proporción. Los resultados obtenidos sobre la expresión génica de CRF, PENK y POMC quedan claramente reflejados por las diferencias existentes en su caso entre los grupos tratados con vehículo y con GRP.

### **1. Efecto de GRP sobre la expresión génica de CRF en el núcleo paraventricular**

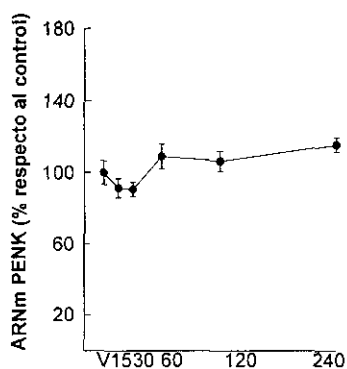
Como se muestra en la *figura 20*, la administración icv de GRP (100 ng/rata) aumenta la expresión génica de CRF en el NPV. Los niveles de ARNm de CRF permanecieron estables 15, 30 y 60 min tras la administración de GRP y se incrementaron en un 25% a los 120 min, retornando a los niveles basales al cabo de 4 h.



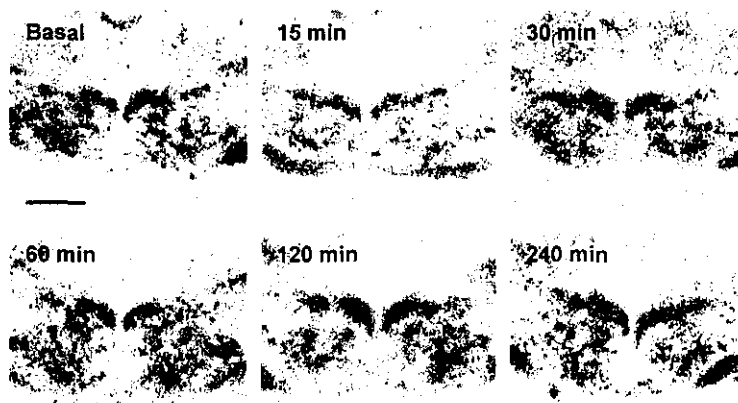
**Fig. 20: Curso temporal del efecto de GRP sobre la expresión génica de CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas fueron inyectadas con GRP (100 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitaron 15, 30, 60, 120 y 240 min después de la administración. El grupo control recibió una inyección de vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitó 2 h después. Los resultados representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de los niveles de ARNm de CRF obtenidos a partir de 5-8 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de una vía seguido del test de Student Newman Keuls). La barra representa 1 mm.

## 2. Efecto de GRP sobre la expresión génica de PENK en el núcleo paraventricular y núcleo ventromedial

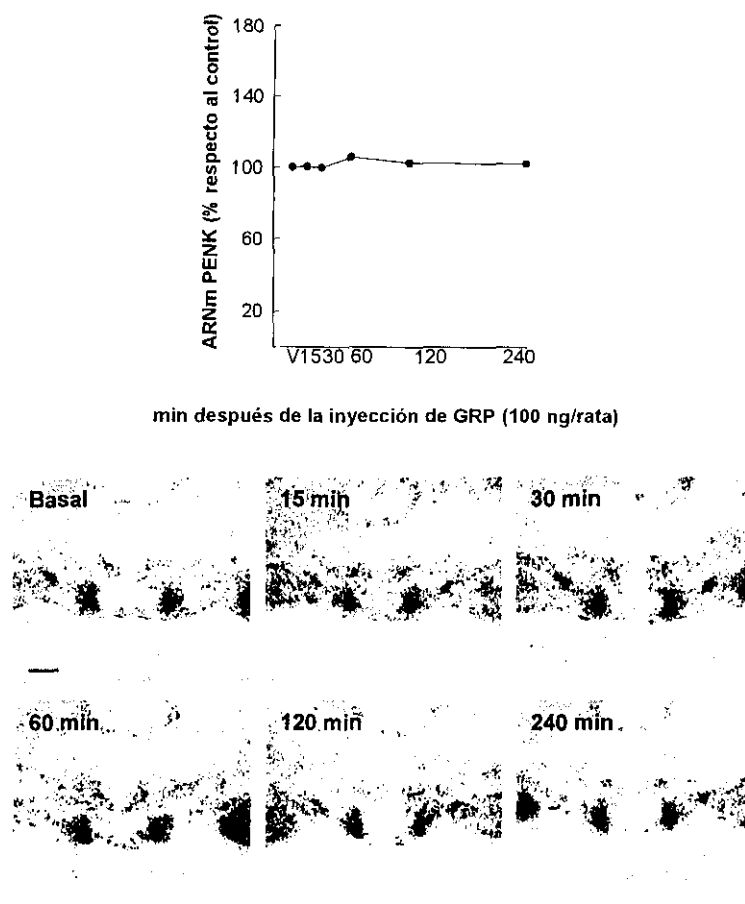
La administración icv de GRP (100 ng/rata) no modificó los niveles de ARNm ni en el NPV (figura 21) y ni en el NVM (figura 22) a ninguno de los tiempos estudiados.



min después de la inyección de GRP (100 ng/rata)



**Fig. 21: Curso temporal del efecto de GRP sobre la expresión génica de PENK en el núcleo paraventricular del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas fueron inyectadas con GRP (100 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitaron 15, 30, 60, 120 y 240 min después de la administración. El grupo control recibió una inyección de vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitó 2 h después. Los resultados representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de los niveles de ARNm de PENK obtenidos a partir de 5-8 ratas (ANOVA de una vía). La barra representa 1 mm.

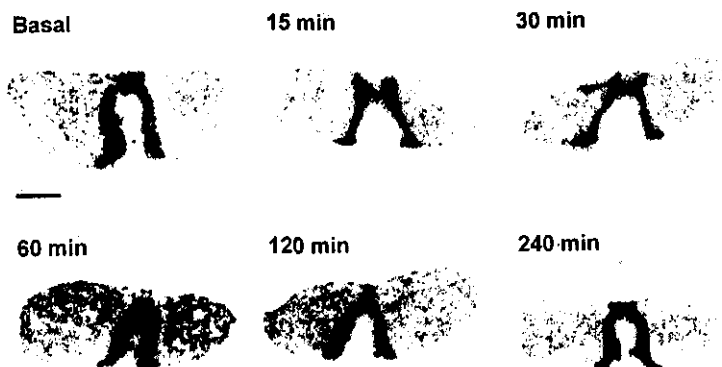
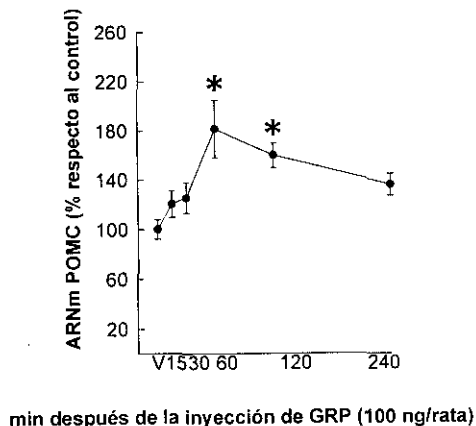


**Fig. 22: Curso temporal del efecto de GRP sobre la expresión génica de PENK en el núcleo ventromedial del hipotálamo en ratas macho.** Las ratas fueron inyectadas con GRP (100 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitaron 15, 30, 60, 120 y 240 min después de la administración. El grupo control recibió una inyección de vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitó 2 h después. Los resultados representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de los niveles de ARNm de PENK obtenidos a partir de 6-8 ratas (ANOVA de una vía). La barra representa 1 mm.

### 3. Efecto de GRP sobre la expresión génica de POMC en el lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis

#### 3.1. Lóbulo anterior

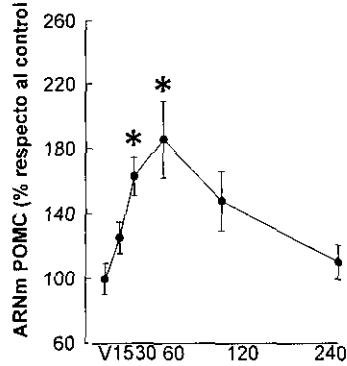
Como se muestra en la figura 23, la administración icv de GRP (100 ng/rata) aumenta la expresión génica de POMC en el lóbulo anterior de la hipófisis. Los niveles de ARNm aumentan progresivamente hasta alcanzar su punto máximo a los 60 min (82%), manteniéndose elevados durante 60 min más (60%). Cuatro horas después de la inyección de GRP, los niveles de ARNm de POMC se aproximan ya a los valores basales.



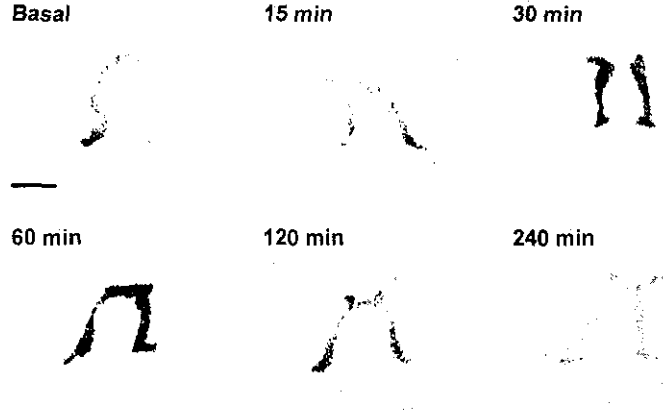
**Fig. 23: Curso temporal del efecto de GRP sobre la expresión génica de POMC en el lóbulo anterior de la hipófisis en ratas macho.** Las ratas fueron inyectadas con GRP (100 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitaron 15, 30, 60, 120 y 240 min después de la administración. El grupo control recibió una inyección de vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitó 2 h después. Los resultados representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de los niveles de ARNm de POMC obtenidos a partir de 5-8 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de una vía seguido del test de Student Newman Keuls). La barra representa 1 mm.

3.2. Lóbulo intermedio

Al igual que en lóbulo anterior, GRP eleva la expresión génica de POMC en el lóbulo intermedio de la hipófisis. La administración icv de GRP (100 ng/rata) incrementa los niveles de ARNm de POMC a los 30 min (63%), alcanzándose el máximo 60 min después de la inyección de GRP (86%). Sesenta min después, los niveles de ARNm comienzan a disminuir hasta alcanzar prácticamente el nivel basal 4 h después de la administración de este neuropéptido.



min después de la inyección de GRP (100 ng/rata)



**Fig. 24: Curso temporal del efecto de GRP sobre la expresión génica de POMC en el lóbulo intermedio de la hipófisis en ratas macho.** Las ratas fueron inyectadas con GRP (100 ng/rata; 5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitaron 15, 30, 60, 120 y 240 min después de la administración. El grupo control recibió una inyección de vehículo salino (5  $\mu$ l/rata; icv) y se decapitó 2 h después. Los resultados representan las medias y las líneas verticales 1 E.E.M. de los niveles de ARNm de POMC obtenidos a partir de 5-8 ratas. \* valores del grupo tratado con GRP que son significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) con respecto al grupo control (ANOVA de una vía seguido del test de Student Newman Keuls). La barra representa 1 mm.



## **Discusión**

---



## **I. Acción reguladora de GRP sobre el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal**

### **ESTUDIOS *IN VITRO***

Como se detalla en la introducción del presente trabajo, tanto GRP como sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos a lo largo del SNC, pero su mayor densidad se localiza en el hipotálamo (Moody y cols., 1981; Ladenheim y cols., 1992). Además, existe inmunorreactividad y receptores de GRP en la hipófisis (Houben y Deneff, 1991a; Houben y cols., 1994) así como en la línea celular secretora de GH y PRL GH<sub>4</sub>C<sub>1</sub> (Westendorf y Schonbrunn, 1983). Por otra parte, en la médula adrenal bovina se ha encontrado inmunorreactividad a GRP (Lemaire y cols., 1986), aunque hasta la fecha no existen estudios sobre la presencia de receptores. La distribución anatómica tanto de IR-GRP como de sus receptores, así como su función en la regulación de la secreción de GH y PRL (Kentroti y Mc Cann, 1985; Kentroti y cols., 1988a y b; Manzanares y cols., 1991; Kentroti y cols., 1996) sugiere que este péptido puede intervenir en la regulación de la secreción hormonal del eje HHA.

Por ello, la primera parte de este trabajo ha estado encaminada a investigar el efecto de GRP sobre la secreción de ACTH y corticosterona y a determinar a qué nivel del eje se ejerce este efecto, utilizando para ello un tipo de bioensayo descrito en la literatura y experimentado ya para el caso de otros agentes activos sobre el eje HHA (Scacianocce y cols., 1989, 1990, 1993).

Los resultados de los estudios *in vitro* aquí presentados sugieren que GRP, al menos farmacológicamente hablando, activa el eje HHA actuando sobre los tres niveles del eje: en el hipotálamo, estimulando la liberación de CRF bioactivo; en la hipófisis, aumentando la secreción de ACTH, y en la glándula adrenal, estimulando la liberación de corticosterona.

Como se detalla en el capítulo de resultados de la presente tesis, GRP aumenta la secreción de CRF bioactivo a concentraciones muy bajas (1 y 10 nM). El hecho de que GRP sea capaz de estimular esta liberación a concentraciones tan bajas, mientras que a nivel hipofisario y adrenal sean necesarias concentraciones mayores (100-1000 nM) para producir liberación de ACTH y corticosterona sugiere que el hipotálamo puede presentar una mayor sensibilidad a la estimulación por GRP que la hipófisis o la glándula adrenal. Por otra parte, GRP podría liberar CRF y/o AVP, a partir del hipotálamo, ya que: 1) Se ha observado que la administración icv de anticuerpos anti-CRF y anti-AVP atenúa el aumento de ACTH plasmático inducido por GRP (Olsen y cols., 1992). 2) Como ya se ha descrito en el capítulo de resultados, la administración icv del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF es capaz de bloquear completamente el aumento de ACTH y corticosterona plasmática inducido tras la administración icv de GRP; y 3) En otros estudios se ha comprobado que este mismo antagonista atenúa distintos efectos endocrinos (aumento de ACTH, adrenalina, NA y glucosa en plasma) y comportamentales inducidos por el péptido análogo a GRP bombesina (supresión de la ingesta de alimentos y aumento del comportamiento de acicalamiento; Merali y cols.,

1994).

Los aumentos que produce GRP sobre la secreción de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona parecen estar mediado a través de su receptor en hipotálamo, hipófisis y adrenal, ya que la adición del potente y selectivo antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina (Severi y cols., 1989) al medio de cultivo es capaz de bloquear el efecto de este neuropéptido sobre la secreción de estas hormonas. Sin embargo, este antagonista, por sí mismo, no modifica la secreción de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona, hecho que sugiere que el GRP endógeno presente en hipotálamo, hipófisis y adrenal no estaría regulando de forma tónica la liberación de estas hormonas.

Asimismo, el bloqueo que produce el antagonista del receptor de GRP sobre la secreción de CRF bioactivo, ACTH y corticosterona sugiere una acción directa de este neuropéptido sobre receptores de GRP presentes en hipotálamo, hipófisis y adrenal. De acuerdo con esta hipótesis, se han encontrado sitios de unión para CRF y ARNm que codifica para el receptor de GRP tanto en hipotálamo (Moody y cols., 1988; Battey y cols., 1991; Ladenheim y cols., 1992) como en hipófisis (Houben y cols., 1993 y 1994). Aunque no existen estudios donde se describa la presencia de receptores para GRP en la glándula adrenal, el hecho de que GRP estimule la liberación de corticosterona actuando directamente a este nivel, y que un antagonista del receptor de GRP sea capaz de bloquear este efecto son resultados que sugieren la presencia de receptores de GRP en esta glándula.

Estos estudios demuestran por tanto cómo GRP es capaz de estimular la liberación de ACTH actuando tanto sobre el hipotálamo, como sobre la hipófisis, lo que sugiere que GRP podría comportarse como un secretagogo de ACTH, al igual que el propio CRF. Algunos secretagogos de ACTH, como CRF, CCK, AVP, oxitocina y angiotensina II, liberan ACTH a nivel de la adenohipófisis de forma calcio dependiente (Reisine y cols., 1986; Abou-Samra y cols., 1987; Won y cols., 1990a y b). El hecho de que la liberación de ACTH inducida por GRP tenga lugar según un proceso calcio-dependiente, como se ha demostrado en disociados de adenohipófisis, confirma esta hipótesis y apunta a la existencia de un proceso de exocitosis por el cual GRP es capaz de liberar ACTH.

En resumen, los resultados obtenidos a través de los experimentos *in vitro* demuestran la participación de GRP en la regulación de la secreción de ACTH y corticosterona y apuntan al posible papel secretagogo de GRP sobre la secreción de ambas hormonas.

### **ESTUDIOS IN VIVO**

La marcada estimulación de las concentraciones plasmáticas de ACTH que se produce tras la administración icv de GRP está de acuerdo con estudios anteriores (Olsen y cols., 1992). Sin embargo, aún se desconocían tanto el efecto de GRP sobre la secreción de corticosterona como la duración del efecto de GRP sobre la secreción plasmática de ambas hormonas, así como cuales eran los receptores a través de los cuales se producía dicho efecto. En el presente trabajo hemos observado cómo GRP produce una elevación de ACTH y corticosterona plasmática tras administración icv, pero no tras administración iv. El hecho de

que GRP no modifique la secreción plasmática de ambas hormonas tras administración periférica sugiere que la acción estimuladora de este neuropéptido sobre la secreción hormonal del eje HHA ocurre principalmente a nivel del SNC. Este resultado confirma la hipótesis sugerida en la primera parte de este capítulo, es decir, que la secreción de ACTH producida por GRP *in vitro* está mediada principalmente a nivel hipotalámico. No obstante, diferencias en factores farmacocinéticos y metabólicos (dosis, degradación de GRP por peptidasas en sangre y líquido cerebroespinal, paso de GRP desde la sangre hacia la hipófisis) pueden explicar las discrepancias entre los distintos efectos encontrados tras la administración de GRP por vía icv e iv.

El potente efecto observado de GRP sobre la secreción plasmática de ACTH y corticosterona se confirma en el estudio tiempo-respuesta, hecho que sugiere que este péptido podría ser funcionalmente relevante en la regulación de la secreción hormonal del eje HHA. Sin embargo, la administración icv del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina no modifica la secreción de ACTH y corticosterona, hecho que está de acuerdo con lo observado *in vitro* e indica que el GRP endógeno presente a nivel cerebral no está regulando de forma tónica la secreción de ambas hormonas. Por el contrario, la administración icv de este antagonista bloquea por completo el aumento de la secreción de ACTH y corticosterona inducido por GRP, lo que indica que esta acción se produce a través del receptor de GRP.

El presente trabajo sugiere además la posible contribución de CRF en el efecto estimulador de GRP sobre la secreción de ACTH y corticosterona. Así, el antagonista de CRF α-helical (9-41) CRF (Rivier y cols., 1984b) bloquea la secreción de ambas hormonas producida por GRP, hecho que está de acuerdo con otros estudios (Merali y cols., 1994). Dado que los cuerpos celulares de las neuronas CRFérgicas que regulan la secreción de ACTH se encuentran localizados principalmente en la región parvocelular del NPV (Moody y cols., 1981; Piekut y cols., 1986) y que los dos neuropéptidos colocalizan en esta región hipotalámica, es probable que GRP estimule la secreción de ACTH y corticosterona elevando la actividad CRFérgica en este núcleo. Además, se ha demostrado también que en la EM ovina, los péptidos análogos a BBS colocalizan con neuronas CRFérgicas (Giraud y cols., 1987a) y que también potencian la liberación de ACTH producida por CRF en células de hipófisis anterior ovina y de rata (Au y cols., 1997; Hale y cols., 1984). Por otra parte, Kent y cols. (1997) han demostrado recientemente que la administración icv de BBS produce una rápida liberación de CRF en la EM. Todas estas observaciones plantean la hipótesis de que el aumento de ACTH y corticosterona producido por GRP pudiera deberse a un aumento en la liberación de CRF en la EM, o a la activación de CRF en el NPV.

En resumen, los resultados discutidos en este apartado sugieren que GRP eleva la secreción de ACTH y corticosterona en plasma actuando sobre sus receptores a nivel central, y que no obstante, los ligandos endógenos del receptor de GRP no parecen regular de forma tónica la secreción de ambas hormonas. Este efecto de GRP está mediado también a través de la activación central del sistema de CRF endógeno. Todo ello sugiere la posible función de GRP como un secretagogo de ACTH, actuando a través de la liberación de CRF. Además, y, en concordancia con estudios publicados recientemente (Kent y cols., 1998; Merali y cols., 1998), estos datos apuntan hacia la posible implicación de GRP en procesos de estrés.

## II. Regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por GRP en situación de estrés

Las neuronas de la división medial parvocelular del NPV sintetizan CRF, AVP y otros neuropéptidos, entre los que se encuentra GRP, y se proyectan hacia la zona externa de la EM, donde los péptidos, almacenados en vesículas, se liberan por exocitosis a la sangre portal hipofisaria, en respuesta a una situación de estrés.

Son muchos los trabajos presentes en la literatura en los que se emplean distintos procedimientos para provocar una situación de estrés. Entre ellos destaca el estrés por restricción de movimientos, el estrés por inhalación de éter, el estrés por administración de hipertónico salino o el estrés por frío (Harbuz y Lightman, 1989a; Harbuz y cols., 1994). La elección del modelo de estrés utilizado en la presente tesis se hizo por causa de la simplicidad del procedimiento y por ser uno de los más efectivos entre los utilizados en la literatura, ya que este modelo de estrés eleva de forma muy marcada las concentraciones plasmáticas de ACTH y corticosterona incluso a tiempos cortos (15 y 30 min) tras la aplicación del estímulo estresante (Akana y Dallman, 1992).

CRF parece ser el mayor activador del eje HHA conocido hasta el momento (Rivier y Plotsky, 1986). Su administración por vía icv reproduce efectos fisiológicos y comportamentales similares a lo que como ocurre en los procesos de estrés (Dunn y Berridge, 1990). Los resultados presentados en esta tesis corroboran la implicación de CRF en la secreción de ACTH y corticosterona inducida por este tipo de estrés, ya que la administración previa del antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF es capaz de atenuar de forma significativa el aumento de ACTH y corticosterona inducido tras someter a los animales a 15 min de estrés por restricción de movimientos. Este resultado está de acuerdo con estudios realizados por otros autores, en los que la administración de un anticuerpo anti-CRF es capaz de atenuar o bloquear, según los estudios, el aumento de ACTH inducido por diferentes estímulos estresantes (Rivier y cols., 1982b; Linton y cols., 1985; Nakane y cols., 1985; Ono y cols., 1985b). Además, Arnold y cols. describieron en 1992 cómo la administración de  $\alpha$ -helical (9-41) CRF previamente a la aplicación de un estímulo estresante es capaz de atenuar el aumento de corticosterona producido tras someter a los animales a 60 min de estrés por restricción de movimientos.

Estudios recientes relacionados con el efecto de GRP sobre la funcionalidad del eje HHA ya sugieren la posible implicación de este neuropéptido en procesos de estrés. Es bien sabido que estímulos de tipo aversivo modifican los niveles y el recambio de CRF en el núcleo central de la amígdala (Pich y cols., 1995; Rodríguez de Fonseca y cols., 1997), región cerebral implicada en distintas respuestas de tipo emocional. Asimismo, y recientemente, Merali y cols. (1998) han demostrado que el estrés por restricción de movimientos en rata produce un aumento muy rápido de los niveles de péptidos análogos a BBS y de CRF en el núcleo central de la amígdala. El estrés por restricción de movimientos también produce variaciones en el contenido de péptidos análogos a BBS y de la densidad del receptor BB2 en diferentes núcleos hipotalámicos (Kent y cols., 1998). Además, las variaciones en el contenido de CRF y péptidos análogos a BBS producidas por estrés en distintas regiones cerebrales es diferente según se

utilicen razas de ratones sensibles o refractarias al estrés (Anisman y cols., 1998). Todos estos datos sugieren que GRP puede tener una función primordial en la mediación de la respuesta al estrés.

Como se menciona en el capítulo de resultados, la administración del antagonista del receptor de GRP (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina no modifica la secreción plasmática de ACTH y corticosterona en situación basal. Sin embargo, este antagonista es capaz de reducir, de forma marcada, el aumento de ACTH y corticosterona producido tras someter a los animales a estrés por restricción de movimientos. Este resultado está de acuerdo con los estudios mencionados anteriormente y sugiere la participación de GRP en la respuesta neuroendocrina del estrés. Teniendo en cuenta que los cuerpos celulares que regulan la secreción de ACTH están localizados principalmente en las neuronas parvocelulares del NPV, y que GRP está también presente en este núcleo hipotalámico (Moody y cols., 1981; Piekut y cols., 1986), es probable que GRP estimule la secreción de ACTH y corticosterona en respuesta a un estímulo estresante incrementando la actividad CRFérgica en este núcleo. De forma alternativa, GRP podría liberar CRF a partir de la EM, de acuerdo con los datos de Kent y cols., (1997), que observaron como la administración icv de BBS es capaz de producir de forma rápida liberación de CRF a partir de la EM. Como se ha descrito en la presente tesis, el hecho de que un antagonista de CRF sea capaz de bloquear el aumento de ACTH y corticosterona producido tras la administración icv de GRP, confirma esta hipótesis.

### **III. Regulación de la actividad serotoninérgica del núcleo paraventricular del hipotálamo por GRP**

Las técnicas de microdissección de núcleos cerebrales y posterior análisis por HPLC constituyen hoy en día un método de rutina fiable utilizado en muchos laboratorios. Esta técnica fue utilizada por primera vez por Palkovits en 1973 y desde entonces son muchos los autores que la han empleado introduciendo con posterioridad distintas modificaciones (Lookingland y Moore, 1984; Manzanares y cols., 1991; Hentschel y cols., 1998).

Mediante el uso de este procedimiento, en este trabajo se han estudiado los efectos centrales de GRP sobre la actividad neuronal serotoninérgica en el NPV, tanto en situación basal como tras la aplicación de estrés, y su posible interacción con neuronas CRFérgicas. Para ello, y como índice de actividad neuronal, se ha determinado el metabolismo de 5-HT midiendo 5-HIAA, el principal catabolito de 5-HT. Las modificaciones en dicho catabolismo se reflejan en variaciones de 5-HIAA, mientras que los niveles de 5-HT permanecen constantes, como ha sido descrito por otros autores (Dunn y Kramarcy, 1984).

Distintos estudios han demostrado la implicación de BBS y GRP en la función dopaminérgica en distintas áreas cerebrales (Widerlöv y cols., 1984) y en la activación de neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares y tuberohipofisarias (Manzanares y cols., 1991; Toney y Cols., 1992; Manzanares y cols., 1994). Sin embargo, se conocía poco sobre la función que tienen los péptidos análogos a BBS en la regulación de la actividad serotoninérgica. Liposits y cols. (1987) demostraron que existe una conexión directa entre

terminales serotoninérgicos procedentes del núcleo dorsal y medial del rafe y neuronas CRFérgicas en el NPV. Este hecho sugiere la implicación del sistema serotoninérgico en la regulación de la funcionalidad del eje HHA. De hecho, existen numerosos estudios bioquímicos y fisiológicos que apuntan hacia la participación del sistema central serotoninérgico en la secreción hormonal del eje HHA (Tuomisto y Männistö, 1985; Nakagami y cols., 1986; Calogero y cols., 1990). También hay datos que son indicativos de la posible asociación entre el estrés y el incremento del metabolismo de 5-HT en diferentes regiones cerebrales (Mitchell y Thomas, 1988; De Souza y Van Loon 1986; Shimizu y cols., 1989 y 1992; Inoue, 1993; Inoue y cols., 1994; Saphier y Welch, 1995).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran cómo la administración icv de GRP produce un incremento dosis-dependiente de las concentraciones de 5-HIAA en el NPV, pero no en otras regiones cerebrales como son el ACC o los núcleos hipotalámicos ARC y NSQ. Por otra parte, las concentraciones de 5-HT permanecieron constantes en todas las regiones estudiadas. Teniendo en cuenta que la administración de BBS induce la activación de neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal del rafe de la rata (Pinnock y Woodruff, 1991), y que la activación de estas neuronas por estimulación eléctrica aumenta el metabolismo de 5-HT en el NPV (Petersen y cols., 1989; Saphier y Feldman, 1989), el aumento de la actividad serotoninérgica en el NPV observado tras administración de GRP podría ser consecuencia de la estimulación previa de neuronas serotoninérgicas del núcleo dorsal del rafe inducida por este neuropéptido. Por otra parte, se ha descrito que las neuronas serotoninérgicas del NPV intervienen en la respuesta adrenocortical que producen diferentes estímulos neurales (Feldman y cols., 1987; Fuller, 1992), y que fármacos que aumentan la función serotoninérgica incrementan la liberación de CRF, ACTH y corticosterona (Fuller, 1992), hecho que está de acuerdo con los resultados presentados, ya que, como se menciona en el capítulo de resultados, GRP aumenta de forma marcada la liberación de ACTH y corticosterona.

Se ha observado que la administración del antagonista de GRP ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesina no modifica las concentraciones de 5-HIAA en el NPV, hecho que sugiere que en condiciones basales, el GRP endógeno presente en el NPV no está regulando de forma tónica la actividad serotoninérgica en este núcleo hipotalámico. Por el contrario, este antagonista bloquea el aumento de las concentraciones de 5-HIAA inducido por GRP, lo que sugiere que este efecto está mediado a través del receptor de GRP.

En experimentos llevados a cabo subsiguientemente se caracterizó la función de CRF sobre la transmisión serotoninérgica en situación basal y de estrés, así como la implicación de CRF en la acción estimuladora de GRP sobre las neuronas serotoninérgicas del NPV. Distintos estudios neuroquímicos han demostrado que la administración tanto icv como ip de CRF incrementa las concentraciones de 5-HIAA en la corteza prefrontal y en el hipotálamo basal de la rata (Lavicky y Dunn, 1993) y sugieren que en una situación de estrés, la liberación de CRF puede activar el sistema serotoninérgico. Asimismo, en respuesta al estrés, se ha descrito el aumento del metabolismo de 5-HT en diferentes regiones cerebrales, incluyendo el hipotálamo (Mitchell y Thomas, 1988; De Souza y Van Loon 1986; Shimizu y cols., 1989; Shimizu y cols., 1992; Inoue, 1993; Inoue y cols., 1994; Saphier y Welch, 1995). Los resultados presentados en esta tesis demuestran que la administración del antagonista

del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF no modifica el metabolismo de 5-HT en el NPV en condiciones basales. Asimismo, y de acuerdo con estudios anteriores, se ha observado que el estrés por restricción de movimientos incrementa de forma marcada la actividad serotoninérgica en el NPV, aumento que se bloquea por el antagonista del receptor de CRF  $\alpha$ -helical (9-41) CRF. Este hecho demuestra que aunque CRF no regula de forma tónica la actividad de estas neuronas en esta región hipotalámica en condiciones basales, sí lo hace en procesos de estrés. Por el contrario, la misma dosis de  $\alpha$ -helical (9-41) CRF que es capaz de bloquear el efecto estimulador del estrés sobre la actividad serotoninérgica en el NPV (y de atenuar el efecto del estrés sobre la secreción de ACTH y corticosterona, como se ha descrito en el apartado II de esta discusión) no es capaz de bloquear el aumento del metabolismo de 5-HT inducido por GRP en el NPV. Este hecho que sugiere que GRP aumenta la actividad serotoninérgica en el NPV actuando a través de su receptor, pero no a través del receptor de CRF.

Por último, y para concluir el comentario correspondiente a este bloque de experimentos, decidimos evaluar, al igual que con CRF, la posible implicación de GRP en el aumento de la actividad serotoninérgica en el NPV tras someter a los animales a estrés por restricción de movimientos. La administración del antagonista de GRP (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesina no modificó las concentraciones de 5-HIAA en el PVN. Sin embargo, cuando este antagonista se administró antes de someter a los animales al estrés, bloqueó completamente el aumento de la actividad serotoninérgica en el NPV. Estos datos indican que aunque el GRP endógeno cerebral no interviene en la regulación de las neuronas serotoninérgicas en condiciones basales, sí lo hace en situación de estrés.

#### **IV. Regulación de la expresión génica de neuropéptidos por GRP en situación basal**

Los resultados correspondientes a este bloque de experimentos muestran, en primer lugar, como la administración central de GRP aumenta la expresión génica de CRF en el NPV, región hipotalámica caracterizada por presentar altos niveles de ARNm de CRF. Este hecho, unido a resultados encontrados en nuestro laboratorio y no incluidos en esta memoria según los cuales GRP aumenta los niveles de ARNm de *c-fos* en este mismo núcleo, sugieren que GRP, además de producir una activación neuronal en esta región hipotalámica, interviene en la regulación de la síntesis de CRF. Por otra parte, existen distintos trabajos publicados en los que se describen aumentos en la expresión génica de CRF entre 1 y 2 h después de la administración de distintos agentes que producen activación del eje HHA, como son CRF o 5-HT (Parkes y cols., 1993; Kageyama y cols., 1998). Concretamente, la administración de CRF eleva la expresión del gen de su precursor polipeptídico, que aumenta 1 h después de su administración y retorna a los niveles basales pasados 30 y 60 min (Parkes y cols., 1993). Además, distintos tipos de estrés (restricción de movimientos, administración de hipertónico salino, estrés por frío o natación; Harbuz y Lightman, 1989a; Imaki y cols., 1992; Harbuz y cols., 1994) aumentan la expresión génica de CRF en el NPV, 2 y 4 h después de someter a los animales a los distintos estímulos estresantes. Por lo tanto, los tiempos a los que se

normalmente se activa la expresión génica de CRF están de acuerdo con los resultados aquí obtenidos para GRP, ya que este neuropéptido eleva los niveles de ARNm de CRF 2 h después de su administración, retornando los niveles del mensajero a los valores basales 2 h después. Por otra parte, el hecho de que GRP eleve los niveles de ARNm de CRF 2 h después de su administración demuestra que existe una correlación considerable entre la secreción hormonal y el aumento de la expresión génica de CRF inducida por GRP, ya que este neuropéptido produce la liberación de ACTH y corticosterona a los 30 min de su administración, y cuando este incremento de la secreción hormonal comienza a disminuir, 120 min después de su administración, es cuando comienza la síntesis de CRF, el principal disparador de la secreción hormonal del eje HHA.

El gen de PENK codifica para la proteína precursora de los péptidos opioides met-enk y leu-enk, moléculas implicadas en la regulación de respuestas de tipo emocional y de factores hipotalámicos de liberación hormonal. Además, es sabido que la aplicación de estímulos estresantes agudos aumenta la expresión génica de PENK en el NPV (Lightman y Young, 1987a y 1988), y NVM (Larsen y Mau, 1994; García-García y cols., 1998 a y b). Es por ello que los efectos que produce el estrés sobre la transcripción del gen de PENK en el NPV son importantes desde el punto de vista de la actividad del eje HHA, ya que aunque el contenido basal del ARNm de PENK que se expresa en las neuronas parvocelulares del NPV es generalmente indetectable o mínimo (Lightman y Young, 1987b), en situaciones de estrés físico se incrementan de forma muy acusada (Harbuz y Lightman, 1989a). Estos datos sugieren que la expresión de PENK en el hipotálamo puede representar un índice de la respuesta del animal a distintos estímulos estresantes. Por ello, en su momento, consideramos interesante el estudio del efecto de GRP sobre la expresión génica de PENK en dos núcleos hipotalámicos (NPV y NVM) caracterizados por presentar gran abundancia en este gen. El hecho de que GRP no modifique los niveles de ARNm de este gen en ninguno de estos dos núcleos, sugiere que los péptidos opioides no intervienen en la activación del eje HHA producida por GRP.

Por último, hemos examinado los efectos de GRP sobre la expresión génica de ARNm de POMC en el lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis. GRP elevó de forma muy marcada la expresión génica de POMC en el lóbulo anterior de la hipófisis, 60 min después de su administración. 120 min después, los niveles de ARNm de POMC se mantienen elevados, retornando a los niveles basales a las 2 h. Este resultado concuerda con los tiempos que otros autores han encontrado aumentos en la expresión génica de POMC. Así, García-García y cols. (1997) han demostrado aumentos de los niveles de ARNm de POMC tras 2 min de estrés por éter seguidos de 60 min de estrés por restricción de movimientos, y Autelitano y cols. (1990) encontraron que la administración de CRF induce un rápido aumento en la expresión génica del transcrito primario de POMC, que permanece elevado incluso 4 h después de su administración en el lóbulo anterior. El hecho de que GRP eleve los niveles de ARNm de POMC en el lóbulo anterior entre 1 y 2 h después de su administración demuestra, al igual que ocurre con la expresión génica de CRF, que existe una gran correlación entre la secreción hormonal y el aumento de la expresión génica de POMC inducida por GRP. De este modo, GRP produce la liberación de ACTH y corticosterona de sus vesículas de almacenamiento a los 30 min, y cuando esta secreción hormonal comienza a disminuir, entre 60 y 120 min después de su administración, es cuando comienza la síntesis de POMC, precursor de ACTH. Por otra

parte, el aumento en la expresión génica de POMC en el lóbulo intermedio es un hecho más rápido que el producido en el lóbulo anterior, aunque de la misma magnitud. Esto puede deberse a que existan otros estímulos que regulen conjuntamente con GRP la expresión génica de POMC en este lóbulo hipofisario.



## **Conclusiones**

---



- 1°** La administración intracerebroventricular de GRP produce un marcado aumento en las concentraciones plasmáticas de ACTH y corticosterona. La administración previa de un antagonista selectivo del receptor de GRP o del receptor de CRF bloquea dichos aumentos hormonales. Estos hechos sugieren que GRP activando directamente receptores de GRP o indirectamente receptores de CRF estimula de manera significativa la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal.
- 2°** El factor liberador de gastrina aumenta las concentraciones de ACTH y corticosterona en explantes de hipotálamo y adenohipófisis, adenohipófisis y glándula adrenal, efecto que es bloqueado por un antagonista del receptor de GRP. Estos resultados demuestran que GRP aumenta la liberación de ACTH y corticosterona actuando a todos los niveles del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal por un mecanismo mediado a través de su receptor.
- 3°** Los estudios llevados a cabo en cultivos primario de adenohipófisis sugieren que el aumento de ACTH inducido por GRP es un proceso calcio-dependiente.
- 4°** Los estudios *in vivo* e *in vitro* demuestran que GRP no parece regular de forma tónica la liberación de ACTH y corticosterona en condiciones basales. Sin embargo, el hecho de que la administración de un antagonista de GRP atenúe el aumento de ACTH y corticosterona producido tras someter a los animales a estrés por restricción de movimientos, y que esta atenuación sea comparable a la que produce un antagonista de CRF, sugiere la posible función de GRP en la regulación del eje HHA en procesos de estrés.
- 5°** Los resultados obtenidos en las microdisecciones del núcleo paraventricular del hipotálamo sugieren que GRP, actuando sobre receptores de GRP centrales estimula la actividad serotoninérgica y esta activación es independiente de los receptores de CRF. Además, GRP o CRF endógenos parecen estar implicados de forma independiente en la regulación del aumento de la actividad serotoninérgica en animales sometidos a estrés por restricción de movimientos .
- 6°** La administración central de GRP aumenta la expresión génica de CRF en el núcleo paraventricular del hipotálamo y de POMC en el lóbulo anterior e intermedio de la hipófisis. El aumento en la expresión de estos genes directamente relacionados con la síntesis y/o liberación de ACTH confirma una vez más la importancia de este neuropéptido en la regulación del eje hipotálamo hipófisis-adrenal.
- 7°** Todos estos resultados en su conjunto apuntan que GRP podría ser un nuevo secretagogo de ACTH y corticosterona, y sugiere la eventual aplicación de antagonistas de GRP en el tratamiento de patologías relacionadas con determinados tipos de estrés que cursan con alteraciones del eje HHA como son la ansiedad y/o la depresión.



## **Bibliografía**

---



**A**

- ABE H, CHIHARA K, MINAMITANI N, IWASAKI J, CHIBA T, MATSUKURA S, FUJITA T: Stimulation by bombesin of immunoreactive somatostatin release into rat hypophysial portal blood. *Endocrinology* **1981**; 109: 229-234.
- ABOU SAMRA AB, CATT KJ, AGUILERA G: Involvement of protein kinase C in the regulation of adrenocorticotropin release from rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **1986**; 118: 212-217.
- ABOU-SAMRA AB, CATT KJ, AGUILERA G: Calcium-dependent control of corticotropin release in rat anterior pituitary cell cultures. *Endocrinology* **1987**; 121: 965-971.
- ADAMEC R, KENT P, ANISMAN H, SHALLOW T, MERALI Z: Neural plasticity, neuropeptides and anxiety in animals-implications for understanding and treating affective disorders following traumatic stress in humans. *Neurosci. Biobehav. Rev.* **1998**; 23: 301-318.
- AGHAJANIAN GK y VAN DER MAELEN CP: Alpha 2-adrenoreceptor mediated hyperpolarization of locus coeruleus neurons: intracellular studies in vivo. *Science* **1982**; 215: 1394-1400.
- AGUILERA G, HARWOOD JP, WILSON JX, MORELL J, BROWN JH, CATT KJ: Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* **1983**; 258: 8039- 8045.
- AGUILERA G, WYNN PC, HARWOOD JP, HAUGER RL, MILLAN MA, GREWE C, CATT KJ: Receptor-mediated actions of corticotrophin-releasing factor in pituitary gland and nervous system. *Neuroendocrinology* **1986**; 43: 79-88.
- AGUILERA G, LIGHTMAN SL, KISS A: Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis during water deprivation. *Endocrinology* **1993**; 132: 241-248.
- AHREN B: Effects of gastrin-releasing peptide on basal and stimulated thyroid hormone secretion in the mouse. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **1989**; 120: 245-249.
- AKANA SF y DALLMAN MF: Feedback and facilitation in the adrenocortical system: unmasking facilitation by partial inhibition of the glucocorticoid response to prior stress. *Endocrinology* **1992**; 131: 57-68.
- ALBERTS B, BRAY D, LEWIS J, RAFF M, ROBERTS K, WATSON JD: *Molecular biology of the cell*. New York, Garland, **1989**.
- ALBERS HE, LIOU SY, STOPA EG, ZOELLER RT: Interaction of colocalized neuropeptides: functional significance in the circadian timing system. *J. Neurosci.* **1991**; 11: 846-851.
- AL-DAMLUJI S, CUNNAH D, GROSSMAN A, PERRY L, ROSS G, COY DH, REES LH, BESSER GM: Effect of adrenaline on basal and ovine corticotropin-releasing-factor-stimulated ACTH secretion in man. *J. Endocrinol.* **1987a**; 112: 145-150.
- AL-DAMLUJI S, PERRY L, TOMLIN S, BOLOUX P, GROSSMAN A, REES LH, BESSER GM: Alpha-adrenergic stimulation of ACTH secretion by a specific mechanism in man. *Neuroendocrinology* **1987b**; 45: 68-76.
- AL-DAMLUJI S, WHITE A, BESSER M: Battleboro rats have deficient adrenocorticotropin responses to activation of central alpha 1-adrenoreceptors. *Endocrinology* **1990**; 127: 2849-2853.
- ALLOLIO B y REINCKE M: Adrenocorticotropin receptor and adrenal disorders. *Horm. Res.* **1997**; 47: 273-278.
- ALMEIDA OF, NIKOLARAKIS KE, HERZ A: Evidence for the involvement of endogenous opioids in the inhibition of luteinizing hormone by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* **1988**; 122: 1034-1041.
- ALPER RH: Evidence for central and peripheral serotonergic control of corticosterone secretion in the conscious rat. *Neuroendocrinology* **1990**; 51: 255-260.
- ALVARO-ALONSO I, MUÑOZ-ACEDO G, RODRIGUEZ-MARTIN E, SCHALLY AV, ARILLA E: Bombesin

induces a reduction of somatostatin inhibition of adenylyl cyclase activity, Gi function, and somatostatin receptors in rat exocrine pancreas. *Peptides* **1999**; 20: 723-730.

AMIOT F, LEIBER D, MARC S, HARBON S: GRP-preferring bombesin receptors increase generation of inositol phosphates and tension in rat myometrium. *Am. J. Physiol.* **1993**; 265: C1579-C1587.

ANASTASI A, ERSPAMER V, BUCCI M: Isolation and structure of bombesin and alytesin, two analogous active peptides from the skin of the european amphibians *Bombina* and *Alytes*. *Experientia* **1971**; 27: 166-167.

ANDERSON RA y MITCHELL R: Effects of gamma-aminobutyric acid receptor agonists on the secretion of growth hormone, luteinizing hormone, adrenocorticotropin hormone and thyroid-stimulating hormone from the rat pituitary gland in vitro. *J. Endocrinol.* **1986**; 108: 1-8.

ANISMAN H, LACOSTA S, KENT P, MC INTYRE DC, MERALI Z: Stressor-induced corticotropin-releasing hormone, bombesin, ACTH and corticosterone variations in strains of mice differentially responsive to stressors. *Stress* **1998**; 2: 209-220.

ANTONI FA, HOLMES MC, JONES MT: Oxytocin as well as vasopressin potentiate ovine CRF in vitro. *Peptides* **1983**; 4: 411-415.

ANTONI FA: Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocrine Rev.* **1986a**; 7: 351-378.

ANTONI FA: Oxytocin receptors in rat adenohypophysis: evidence for radioligand binding studies. *Endocrinology* **1986b**; 119: 2393-2395.

ANTONI FA: Hypophysiotropic neurons controlling the secretion of corticotrophin: is the hypothesis of a final common pathway correct?. Rose FC (ed). *The control of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis*. Madison CT. International University Press, **1989**.

ANTONI FA: Vasopressinergic control of pituitary adrenocorticotropin secretion comes from age. *Front. Neuroendocrinology* **1993**; 14: 76-122.

ARANA G, SANTOS AB, LARAIA MT, MC LEOD-BRYANT S, BEALE MD, RAMES LJ, ROBERTS JM, DIAS JK, MOLLOY M: Dexamethasone for the treatment of depression: a randomized, placebo controlled, double blind trial. *Am. J. Psychiat.* **1995**; 152: 265-267.

ARMARIO A y CASTELLANOS JM: A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat. *Rev. Esp. Fisiol.* **1984**; 40: 437-441.

ARNOLD FJ, DE LUCAS BUENO M, SHIERS H, HANCOCK DC, EVANT GI, HERBERT J: Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular administration of corticotropin-releasing factor in unstressed and stressed rats. *Neuroscience* **1992**; 51: 377-390.

ARRIZA JL, SIMERLY RB, SWANSON LW, EVANS RM: The neuronal mineralocorticoid receptor as a mediator of glucocorticoid response. *Neuron* **1988**; 1: 877-900.

ARTS CJ, KOPPESCHAAR HP, VEEMAN W, THIJSSSEN JH: A direct radioimmunoassay for the determination of adrenocorticotropin hormone (ACTH) and a clinical evaluation. *Ann. Clin. Biochem.* **1985**; 22: 247-256.

ASHWOOD V, BROWNHILL V, HIGGINBOTTOM M, HORWELL DC, HUGHES J, LEWTHWAITE RA, MC KNIGHT AT, PINNOCK RD, PRITCHARD MC, SUMAN-CHAUHAN N, WEBB C, WILLIAMS SC: PD-176252, the first high affinity non-peptide gastrin-releasing peptide (BB2) receptor antagonist. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**; 22: 2589-2594.

AU CL, CANNY BJ, FARNWORTH PG, GIRAUD AS: Bombesin regulation of adrenocorticotropin release from ovine anterior pituitary cells. *Peptides* **1997**; 18: 995-1000.

AUTELITANO DJ, BLUM M, LOPINGCO M, ALLEN RG, ROBERTS JL: Corticotropin-releasing factor differentially regulates anterior and intermediate pituitary lobe proopiomelanocortin gene transcription, nuclear precursor RNA and mature mRNA in vivo. *Neuroendocrinology* **1990**; 51: 123-130.

AXELROD J y REISINE TD: Stress hormones: their interaction and regulation. *Science* **1984**; 224: 452-459.

## B

---

BABU GN y VIJAYAN E: Plasma gonadotropin, prolactin levels and hypothalamic tyrosin-hidroxilase activity following intraventricular bombesin and secretin in ovariectomized conscious rats. *Brain Res. Bull.* **1983**; 11: 25-29.

BAGDY G, CALOGERO AE, MURPHY DL, SZEMEREDI K: Serotonin agonists cause parallel activation of the sympathoadrenomedullary system and the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis in conscious rats. *Endocrinology* **1989**; 165: 2664-2669.

BARBARINO A, DE MANIRIS L, TOFANI A, DELLA CASA S, D'AMICO C, MANCINI A, CORSELLO SM, SCIUTO R, BARINI A: Corticotropin-releasing hormone inhibition of gonadotropin release and the effect of opioid blockade. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **1989**; 68: 523-528.

BARDELEBEN V, HEUSER I, HOLSBOER F: Human CRH stimulation response during acute withdrawal and after medium-term abstention from alcohol abuse. *Psychoneuroendocrinology* **1989**; 14: 441-449.

BARRETT JE, ZHANG L, AHLERS ST, WOJNICKI FH: Acute and chronic effects of corticotropin-releasing factor on schedule-controlled responding and neurochemistry of pigeons. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**; 250: 788-794.

BATTEY JF, WAY JM, CORJAY MH, SHAPIRA H, KUSANO K, HARKINS R, WU JM, SLATTERY T, MANN E, FELDMAN RI: Molecular cloning of the bombesin/gastrin-releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1991**; 88: 395-399.

BAXTER JD y TYRRELL JB: The adrenal cortex. En: Felig P, Baxter JD, Broadus AE, Frohman LA (eds). *Endocrinology and metabolism*, 2<sup>nd</sup> ed, pp. 511-650. New York, **1987**.

BAUBET V, FEVRE-MONTANGE M, GAY N, DEBILLY G, BOBILLIER P, CESPUGLIO R: Effects of an acute immobilization stress upon proopiomelanocortin (POMC) mRNA levels in the mediobasal hypothalamus: a quantitative in situ hybridization study. *Mol. Brain. Res.* **1994**; 26: 163-168.

BEAULIEU S, DI PAOLO T, COTE J, BARDEN N: Participation of the central amygdaloid nucleus in the response of adrenocorticotropin secretion to immobilization stress: opposing roles of the noradrenergic and dopaminergic systems. *Neuroendocrinology* **1987**; 45: 37-46

BENARROCH EE: Neuropeptides in the sympathetic system: presence, plasticity, modulation and implications. *Ann. Neurol.* **1994**; 36: 6-13.

BENYA RV, FATHI Z, KUSUI T, PRADHAN T, BATTEY JF, JENSEN RT: Gastrin-releasing peptide receptor-induced internalization, down-regulation, desensitization and growth: possible role of cAMP. *Mol. Pharmacol.* **1994a**; 46: 235-245.

BENYA RV, AKESON M, MROZINSKI J, JENSEN RT, BATTEY JF: Internalization of the gastrin-releasing peptide receptor is mediated by both phospholipase C-dependent and independent processes. *Mol. Pharmacol.* **1994b**; 46: 495-501.

BENYA RV, KUSUI T, PRADHAN TK, BATTEY JF, JENSEN RT: Expression and characterization of cloned human bombesin receptors. *Mol. Pharmacol.* **1995a**; 47: 10-20.

BENYA RV, KUSUI T, BATTEY JF, JENSEN RT: Chronic desensitization and down regulation of the gastrin-releasing peptide receptor are mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* **1995b**; 270: 3346-3352.

BENITEZ L, MALLO F, ALVAREZ CV, BURGUERA B, SANCHEZ-FRANCO F, DIEGUEZ C: Estrogen-dependent effects of bombesin on in vivo growth hormone secretion in the rat. *Neuroendocrinology* **1990**; 52: 608-611.

- BEN-ZE'EV A: The cytoskeleton in cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**; 780: 197-202.
- BERK ML y FINKELSTEIN JA: An autoradiographic determination of the efferent projections of the supraquiasmatic nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* **1981**; 226: 1-13.
- BERTACCINI G e IMPICCIATORE M: Action of bombesin in the motility of the stomach. *Naunyn Schmiedebergs* **1975**; 289:149-156.
- BETANCUR C, AZZI M, ROSTÈNE W: Nonpeptide antagonist of neuropeptide receptors: tools for research and therapy. *Trends in Pharmacol. Sci.* **1997**; 18: 372-386.
- BEVAN JS y SCANLAN MF: En: *Clinical endocrinology*. A.Grossman (ed). Blackwell, London, **1992**.
- BEYER H, MATTA SG, SHARP BM: Regulation of the messenger ribonucleic acid for corticotropin-releasing factor in the paraventricular nucleus and other brain sites of the rat. *Endocrinology* **1988**; 123: 2117-2123.
- BICKNELL RJ y CHAPMAN C: Bombesin stimulates growth hormone secretion from cultured bovine pituitary cells. *Neuroendocrinology* **1983**; 36: 33-38.
- BIRNBERG NC, LISSITZSKY JC, HINMAN M, HERBERT E: Glucocorticoids regulate proopiomelanocortin gene expression in vivo at the levels of transcription and secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**; 80: 6982-6986.
- BITAR KN y ZHU XX: Expression of bombesin-receptor subtypes and their differential regulation of colonic smooth muscle contraction. *Gastroenterology* **1993**; 105: 1672-1680.
- BJORO T, TORJESEN PA, OSTBERG BC, SAND O, IVERSEN JG, GAUTVIK KM, HAUG E: Bombesin stimulates prolactin secretion from cultured rat pituitary tumour cells (GH4C1) via activation of phospholipase C. *Regulat. Pept.* **1987**; 19: 169-182.
- BLOOM FE, BATTENBERG EL, RIVIER J, VALE W: Corticotropin releasing factor (CRF) immunoreactive neurones and fibers in rat hypothalamus. *Regulat. Peptides* **1982**; 4: 43-48.
- BLUET-PAJOT MT, MOUNIER F, DI SCIULLO A, SCHMIDT B, KORDON C: Differential sites of action of 8-OH-DPAT, a 5HT<sub>1A</sub> agonist, on ACTH and PRL secretion in the rat. *Neuroendocrinology* **1995**; 61: 159-166.
- BOUTILLER AL, SASSONE-CORSI P, LOEFFLER JP: The protooncogene *c-fos* is induced by corticotropin-releasing factor and stimulates proopiomelanocortin gene transcription in pituitary cells. *Mol. Endocrinol.* **1991**; 5: 1301-1310.
- BRADBURY M y DALLMAN MF: Effects of hippocampal type I and type II glucocorticoids antagonists on ACTH levels in the PM. *Soc. Neurosci. Abstr.* **1989**; 15, 716.
- BRADBURY MJ, CASCIO CS, SCRIBNER KA, DALLMAN MF: Stress-induced adrenocorticotropin secretion: diurnal responses and decreases during stress in the evening are not dependent on corticosterone. *Endocrinology* **1991**; 128: 680-688.
- BROCCARDO M, FALCONIERI E, RSPAMER G, MELCHIORRI P, NEGRI L, DE CASTIGLIONE R: Relative potency of bombesin-like peptides. *Br. J. Pharmacol.* **1975**; 55: 221-227.
- BRODIE TG: The immediate action of an intravenous injection of blood serum. *J. Physiol.* **1900**; 26: 48-71.
- BROWN M, RIVIER J, VALE W: Bombesin: potent effects on thermoregulation in the rat. *Science* **1977**; 998-1000.
- BROWN M, TACHÉ Y, FISHER D: Central nervous system action of bombesin: mechanism to induce hyperglycemia. *Endocrinology* **1979**; 105: 660-665.
- BROWN KD, BLAKELEY DM, HAMON MH, LAURIE S, CORPS AN: Protein kinase C-mediated negative feedback inhibition of unstimulated and bombesin-stimulated polyphosphoinositide hydrolysis in Swiss 3T3 cells. *Biochem. J.* **1987**; 245: 631-639.

- BROWN MR y GRAY TS: Peptide injections into the amygdala of conscious rats: effects on blood pressure, heart rate and plasma catecholamines. *Regul. Pept.* **1988**; 21: 95-106.
- BROWN MR, CARVER K, FISHER LA: Bombesin: central nervous system actions to affect the autonomic nervous system. *Ann. N.Y.Acad. Sci.* **1988**; 547: 174-182.
- BROWN RE: *An introduction to neuroendocrinology*. Cambridge University Press, **1994**.
- BROWNFIELD MS, POFF BC, HOLZWARTH MA: Ultrastructural immunocytochemical co-localization of serotonin and PNMT in adrenal medullary vesicles. *Histochemistry* **1985**; 83: 41-46.
- BRUHN TO, SUTTON RE, RIVIER CL, VALE WW: Corticotropin-releasing factor regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in vivo. *Neuroendocrinology* **1984**; 39: 170-175.
- BRUHN TO, ENGELAND WC, ANTHONY EL, GANN DS, JACKSON IM: Corticotropin-releasing factor in the dog adrenal medulla is secreted in response to hemorrhage. *Endocrinology* **1987**; 120: 25-33.
- BUCKINGHAM JC y HODGES JR: The use of corticotrophin production by adenohipophysial tissue in vitro for the detection and estimation of potential corticotrophin releasing factors. *J. Endocrinol.* **1977**; 72: 187-193.
- BUCKINGHAM JC y HODGES JR: Hypothalamic receptors influencing the secretion of corticotrophin-releasing hormone in the rat. *J. Physiol. (Lond)* **1979**; 290: 421-431.
- BUFFA R, SOLOVIEVA I, FIOCCA R, GIORGINO S, RINDI G, SOLCIA E, MOCHIZUCHI T, YANAIHARA C, YANAIHARA N: Localization of bombesin and GRP (gastrin-releasing peptide) sequences in gut nerves or endocrine cells. *Histochemistry* **1982**; 76: 457-467.
- BUTLER PD, WEISS JM, STOUT JC, NEMEROFF CB: Corticotropin-releasing factor produces fear-enhancing and behavioral activating effects following infusion into the locus coeruleus. *J. Neurosci.* **1990**; 10: 176-183.

## C

---

- CAI R-Z, REILE H, ARMATIS P, SCHALLY AV: Potent bombesin antagonists with C-terminal Leu-ψ(CH<sub>2</sub>-N)Tac-NH<sub>2</sub> or its derivatives. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**; 91: 12664-12668.
- CALOGERO AE, GALLUCCI WT, CHROUSOS GP, GOLD PW: Interaction between GABAergic neurotransmission and rat hypothalamic corticotropin-releasing hormone secretion in vitro. *Brain Res.* **1988**; 463: 28-36.
- CALOGERO AE, BERNARDINI R, MARGIORIS AN, BAGDY G, GALLUCCI WT, MUNSON PJ, TAMARKIN L, TOMAI TP, BRADY L, GOLD PW: Effects of serotonergic agonists and antagonists on corticotropin-releasing hormone secretion by explanted rat hypothalami. *Peptides* **1989**; 10: 189-200.
- CALOGERO AE, BAGDY G, SZEMEREDI K, TARTAGLIA ME, GOLD PW, CHROUSOS GP: Mechanisms of serotonin receptor agonist-induced activation of hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the rat. *Endocrinology* **1990**; 126: 1888-1894.
- CALOGERO AE, BAGDY G, BURRELLO N, POLOSO P, D'AGATA R: Role of serotonin 3 receptors in the control of adrenocorticotrophic hormone release from rat pituitary cell cultures. *Eur. J. Endocrinol.* **1995**; 133: 251-254.
- CAMBLE R, COTTON R, DUTTA AS, GARNER A, HAYWARD CF, MOORE VE, SCHOLLES PB: N-isobutyryl-His-Trp-Ala-Val-D-Ala-His-Leu-NHMe (ICI 216140), a potent in vivo antagonist analogue of bombesin/gastrin-releasing peptide (BN/GRP) derived from the C-terminal sequence lacking the final methionine residue. *Life Sci.* **1989**; 45: 1521-1527.
- CAMINOS-TORRES R, MA L, SNYDER PJ: Testosterone-induced inhibition of the LH and FSH responses to gonadotropin-releasing hormone occurs slowly. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1977**; 44: 1142-1153.
- CAMPOS RV, BUCHAN AM, PEDERSON RA, MCINTOSH CH, COY DH: Inhibition of bombesin-stimulated

- gastrin release from isolated canine G cells by bombesin antagonists. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **1989**; 67: 1520-1524.
- CARVER-MOORE K, GRAY TS, BROWN MR: Central nervous system action of bombesin to elevate plasma concentrations of catecholamines. *Brain Res.* **1991**; 541: 225-231.
- CASCIO CS, SHINSAKO J, DALLMAN MF: The suprachiasmatic nuclei stimulates evening ACTH secretion in the rat. *Brain Res.* **1987**; 423: 173-178.
- CASTRO MG: Effects of corticotrophin-releasing factor and arginine-vasopressin on proopiomelanocortin (POMC) mRNA levels, release and storage of adrenocorticotrophin from mouse anterior pituitary cells. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* **1993**; 104: 105-112.
- CIVELLI O, BIRNBERG N, HERBERT E: Detection and quantitation of pro-opiomelanocortin mRNA in pituitary and brain tissues from different species. *J. Biol. Chem.* **1982**; 257: 6783-6787.
- COMB M, SEEBURG PH, ADELMAN J, EIDEN LY, HERBERT E: Primary structure of the human Met-and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature* **1982**; 295: 663-666.
- COMB M, BIRNBERG NC, SEASHOLTZ A, HERBERT E, GOODMAN HM: A cyclic AMP-and phorbol ester inducible- DNA element. *Nature* **1986**; 323: 353-356.
- CONAGLEN JV, DONALD RA, ESPINER EA, LIVESEY JH, NICHOLLS MG: Effect of naloxone on the hormone response to CRF in normal man. *Endocr. Res.* **1985**; 11: 39-44.
- CONTESSÉ V, HAMEL C, DELARUE C, LEFEBVRE H, VAUDRY H: Effect of 5-HT<sub>4</sub> receptor agonists and antagonists on steroid secretion by the adrenal gland in vitro. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**; 265: 27-33.
- COPRAY JC, TER HORST GJ, LIEM RS, VAN WILLIGEN JD: Neurotransmitters and neuropeptides within the mesencephalic trigeminal nucleus of the rat: an immunohistochemical analysis. *Neuroscience* **1990**; 37: 399-411.
- CORCHERO J, FUENTES JA, MANZANARES J: Chronic treatment with CP-55,940 regulates corticotropin-releasing factor and proopiomelanocortin gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Life Sci.* **1999a**; 64: 905-911.
- CORCHERO J, MANZANARES J, FUENTES JA: Repeated administration of  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol produces a differential time related responsiveness on proenkephalin, proopiomelanocortin and corticotropin releasing factor gene expression in the hypothalamus and pituitary gland of the rat. *Neuropharmacology* **1999b**; 38: 433-439.
- CORJAY MH, DOBRZANSKI DJ, WAY JM, VIALLET J, SHAPIRA H, WORLAND P, SAUSVILLE EA, BATTEY JF: Two distinct bombesin receptor subtypes are expressed and functional in human lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **1991**; 266: 18771-18779.
- CORPS AN, REES LH, BROWN KD: A peptide that inhibits the mitogen stimulation of Swiss 3T3 cells by bombesin and vasopressin. *Biochem. J.* **1985**; 231: 781-784.
- COSTA M, FURNESS JB, YANAIHARA N, YANAIHARA C, MOODY TW: Distribution and projections of neurons with immunoreactivity for both gastrin-releasing peptide and bombesin in the guinea pig small intestine. *Cell. Tissue Res.* **1984**; 335: 285-293.
- COSTELLO JF, BROWN MR, GRAY TS: Bombesin immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus innervate the dorsal vagal complex in the rat. *Brain Res.* **1991**; 542: 77-82.
- COWAN A, KHUNAWAT P, ZHU XZ, GMEREK DE: Current concepts in biological actions of bombesin-related peptides: Part IV. Effects of bombesin on behavior. *Life Sci.* **1985**; 37: 135-145.
- COWAN A: Behavioral effects of bombesin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 183-193.
- COWAN A, WHEELER H, COY DH: Studies in vivo with [Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesin, a proposed competitive antagonist of bombesin. *FASEB J.* **1988**; 2:A784.
- COY DH, HEINZ-ERIAN P, JIANG N-Y, MOUREAU J-P, GARDNER JD, JENSEN RT: Progress in the development of competitive bombesin antagonists. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 150-157.

COY DH, TAYLOR JE, JIANG NY, KIM SH, WANG LH, HUANG SC, MOREAU JP, GARDNER JD, JENSEN RT: Short-chain pseudopeptide bombesin receptor antagonists with enhanced binding affinities for pancreatic acinar and Swiss 3T3 cells display strong antimitotic activity. *J. Biol. Chem.* **1989**; 264: 14691-14697.

COY D, WANG LH, JIANG NY, JENSEN R: Short chain bombesin pseudopeptides with potent bombesin receptor antagonist activity in rat and guinea pig pancreatic acinar cells. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**; 190: 31-38.

COY DH, MUNGAN Z, ROSSOWSKI WJ, CHENG BL, LIN JT, MROZINSKI JE Jr, JENSEN RT: Development of a potent bombesin receptor antagonist with prolonged *in vivo* inhibitory activity on bombesin-stimulated amylase and protein release in the rat. *Peptides* **1992**; 13: 775-781.

CUBER JC, BERNARD G, COY DH, BERNARD C, CHAYVIALLE JA: Blockade of bombesin receptors with [Leu<sup>14</sup>-ψ(CH<sub>2</sub>NH)-Leu<sup>13</sup>]bombesin fails to suppress nutrient-induced CCK release from rat duodenojejenum. *Peptides* **1990**; 11: 255-258.

CUNNINGHAM ET y SAWCHENKO PE: Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **1988**; 274: 60-76.

CUTTITTA F, CARNEY DN, MULSHINE J, MOODY TW, FEDORKO J, FISCHLER A, MINNA JD: Bombesin-like peptides can function as autocrine growth factors in human small cell lung cancer. *Nature* **1985**; 316: 823-826.

CUTZ E, CHAN W, TRACK NS: Bombesin, calcitonin and leu-enkephalin immunoreactivity in endocrine cells of the human lung. *Experientia* **1981**; 37: 765-767.

## Ch

---

CHANG CH, CHEY WY, ERWAY B, COY DH, CHANG TM: Modulation of secretin release by neuropeptides in secretin-producing cells. *Am. J. Physiol.* **1998**; 275: G192-G202.

CHAPIN DS, LOOKINGLAND KJ, MOORE KE: Effects of mobile phase composition on retention times for biogenic amines and their precursor and metabolites. *Currents Separations* **1986**; 7: 68-70.

CHEITLIN R, BUCKELY DI, RAMACHANDRAN J: The role of extracellular calcium in corticotropin-stimulated steroidogenesis. *J. Biol. Chem.* **1985**; 260: 5323-5327.

CHEN CL, DIONNE FT, ROBERTS JL: Regulation of the pro-opiomelanocortin mRNA levels in rat pituitary by dopaminergic compounds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**; 80: 2211-2215.

CHEN FM, BILEZIKJIAN LM, PERRIN MH, RIVIER J, VALE W: Corticotropin-releasing factor receptor-mediated stimulation of adenylate cyclase activity in the rat brain. *Brain Res.* **1986**; 381: 49-57.

CHEN R, LEWIS KA, PERRIN MH, VALE WW: Expression cloning of a human corticotropin-releasing factor receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**; 90: 8967-8971.

CHILDS GV, MARCHETTI C, BROWN AM: Involvement of sodium channels and two types of calcium channels in the regulation of adrenocorticotropin release. *Endocrinology* **1987**; 120: 2059-2069.

CHOWEN JA, ARGENTE J, VICIAN L, CLIFTON DK, STEINER RA: Pro-opiomelanocortin messenger RNA in hypothalamic neurons is increased by testosterone through aromatization to estradiol. *Neuroendocrinology* **1990**; 52: 581-588.

CHRONWALL BM, MILLINGTON WR, GRIFFIN WS, UNNERSTALL JR, O'DONOHUE TL: Histological evaluation of the dopaminergic regulation of proopiomelanocortin gene expression in the intermediate lobe of the rat pituitary, involving *in situ* hybridization and [<sup>3</sup>H]thymidine uptake measurement. *Endocrinology* **1987**; 120: 1201-1211.

CHROUSOS PG y GOLD PW: The concept of stress and system disorders. *JAMA* **1992**; 267: 1244-1252.

CHUNG K, BRINER RP, CARLTON SM, WESTLUND KN: Immunohistochemical localization of seven different peptides in the human spinal cord. *J. Comp. Neurol.* **1989**; 280: 158-170.

## D

---

DAHLSTROM A y FUXE K: Evidence for the existence of monoamine containing-neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand.* **62**; 232: 1-55.

DALLMAN MF y JONES MT: Corticosteroid feedback control of ACTH secretion. Effect of stress-induced corticosterone secretion on subsequent stress responses in the rat. *Endocrinology* **1973**; 92: 1367-1375.

DALLMAN MF, AKANA SF, CASCIO CS, DARLINGTON DN, JACOBSON L, LEVIN N: Regulation of ACTH secretion: variations of a theme of B. *Rec. Prog. Horm. Res.* **1987**; 43: 113-173.

DALLMAN MF: Stress update: adaptation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis to chronic stress. *Trends Endocrinol. Metab.* **1993**; 4: 62-68.

DAVE JR, EIDEN LE, ESKAY RL: Corticotropin-releasing factor binding to peripheral tissue and activation of the adenylate cyclase-adenosine 3'5'-monophosphate system. *Endocrinology* **1985**; 116: 2152-2159.

DE GOEIJ DC, DIJKSTRA H, TILDERS FJ: Chronic psychosocial stress enhances vasopressin, but not corticotropin-releasing factor, in the external zone of the median eminence of male rats: relationship to subordinate status. *Endocrinology* **1992a**; 131: 847-853.

DE GOEIJ DC, JEZOVA D, TILDERS FJ: Repeated stress enhances vasopressin synthesis in corticotropin-releasing factor neurons in the paraventricular nucleus. *Brain Res.* **1992b**; 577: 165-168.

DE KLOET ER, KOVACS GL, SZABO G, TELEGDY G, BOHUS B, VERSTEEG DH: Decreased serotonin turnover in the dorsal hippocampus of brain shortly after adrenalectomy: selective normalization after corticosterone substitution. *Brain Res.* **1982**; 239: 659-663.

DE KLOET ER, VERSTEEG DH, KOVACS GL: Aldosterone blocks the response to corticosterone in the raphe-hippocampal serotonin system. *Brain Res.* **1983**; 264: 323-327.

DE KLOET ER, SYBESMA H, REUL JM: Selective control by corticosterone of serotonin 1 receptor capacity in the raphe-hippocampal system. *Neuroendocrinology* **1986**; 42: 513-521.

DE KLOET ER, RATKA A, REUL JM, SUTANTO W, VAN EEKELEN JA: Corticosteroid receptor types in brain: regulation and putative function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1987**; 512: 351-361.

DE KLOET ER y REUL JM: Feedback action and tonic influence of corticosteroids on brain function: a concept arising from the heterogeneity of brain receptor systems. *Psychoneuroendocrinology* **1987**; 12: 83-105.

DELLE FAVE G, ANNIBALE B, DE MAGISTRIS L, SEVERI C, BRUZZONE R, PUOTI M, MELCHIORRI P, TORSOLI A, ERSPAMER V: Bombesin effects on human gastrointestinal function. *Peptides* **1985**; 6: 113-116.

DESCARRIES L, WATKINS KC, GARCIA S, BEAUDET A: The serotonin neurons in the nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope radioautography study. *J. Comp. Neurol.* **1982**; 207: 239-254.

DE SOUZA E, PERRIN MH, RIVIER J, VALE WW, KUHAR MJ: Corticotropin-releasing factor receptors in rat pituitary gland: autoradiographic localization. *Brain Res.* **1984**; 296: 202-207.

DE SOUZA EB y VAN LOON GR: Corticotropin releasing factor increases the adrenocortical responsiveness to adrenocorticotropin. *Experientia* **1984**; 40: 1004-1006.

DE SOUZA EB, INSEL TR, PERRIN MH, RIVIER J, VALE WW, KUHAR MJ: Corticotropin-releasing factor receptors are widely distributed within the rat central nervous system: an autoradiographic study. *J.*

*Neurosci.* **1985**; 5: 3189-3203.

DE SOUZA EB: Serotonin and dopamine receptors in the rat pituitary gland: autoradiographic identification, characterization and localization. *Endocrinology* **1986**; 119: 1534-1542.

DE SOUZA EB y VAN LOON GR: Brain serotonin and catecholamine responses to repeated stress in rats. *Brain Res* **1986**; 367:77-86.

DEUTCHAY, CLARK WA, ROTH RM: Prefrontal cortical dopamine depletion enhances the responsiveness of the mesolimbic dopamine neurons to stress. *Brain Res.* **1990**; 521: 311-315.

DEVIN C, BERNAD N, CRISTAU M, ARTIS-NOEL AM, HEITZ A, FEHRENTZ JA, MARTINEZ J: Synthesis and biological evaluation of C-terminal hydroxamide analogues of bombesin. *J. Pept. Sci.* **1999**; 5: 176-184.

DICKINSON KEJ, UEMURA N, SEKAR MC, MC DANIEL HB, ANDERSON W, COY DH, HIRSCHOWITZ BI: Partial agonist activity of the bombesin receptor antagonist [Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesin in frog peptic cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**; 157: 1154-1158.

DINAN TG: Glucocorticoids and the genesis of the depressive illness. A psychobiological model. *Br. J. Psychiat.* **1994**; 164: 365-371.

DINAN TG: Serotonin and the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *Life Sci.* **1996**; 58: 1683-1694.

DIMALINE R, SANDVIK AK, BARCLAY G, DOCKRAY GJ: Functional control of gastrin-releasing peptide (GRP) mRNA in rat stomach. *FEBS Lett.* **1992**; 301: 291-293.

DIORIO D, VIAU V, MEANEY MJ: The role of the medial prefrontal cortex (cingulate gyrus) in the regulation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *J. Neurosci.* **1993**; 13: 3839-3847.

DI SANT'AGNESE PA: Calcitonin-like immunoreactive and bombesin-like immunoreactive endocrine-paracrine cells of the human prostate. *Arch. Pathol. Lab. Med.* **1986**; 110: 412-415.

DI SCIULLO A, BLUET-PAJOT MT, MOUNIER F, OLIVER C, SCHMIDT B, KORDON C: Changes in anterior pituitary hormone levels after serotonin 1A receptor stimulation. *Endocrinology* **1990**; 127: 567-572.

DUNN AJ y KRAMARCY NR: Neurochemical responses in stress: relationships between the hypothalamic-pituitary-adrenal and acetylcholine systems. In LL Iversen, SD Iversen, SH Snyder (eds). *Handbook of Psychopharmacology*, Plenum, New York, **1984**.

DUNN AJ y BERRIDGE CW: Corticotropin-releasing factor administration elicits a stress-like activation of cerebral catecholaminergic systems. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1987**; 27: 685-691.

DUNN AJ y BERRIDGE CW: Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses?. *Brain Res. Rev.* **1990**; 15: 71-100.

## E

---

EARNEST DJ, DI GIORGIO S, OLSCHOWKA JA: Light induces expression of fos-related proteins within gastrin-releasing peptide neurons in the rat suprachiasmatic nucleus. *Brain Res.* **1993**; 627: 205-209.

EATON MJ, CHEUNG S, MOORE KE, LOOKINGLAND KJ: Dopamine receptor-mediated regulation of corticotropin releasing hormone neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *Brain Res.* **1996**; 738: 60-66.

EBERWINE JH y ROBERTS JL: Analysis of the pro-opiomelanocortin gene structure and its function. *DNA* **1983**; 2: 1-8.

EBERWINE JH y ROBERTS JL: Glucocorticoid regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription in the rat pituitary. *J. Biol. Chem.* **1984**; 259: 2166-2170.

EDWARDS JV, MC LEAN L, WADE AC, EATON SR, CASHMAN EA, HAGAMAN KA, FANGER BO: Potent pseudopeptides bombesin-like antagonists and agonists. *Int. J. Pepti. Protein Res.* **1994**; 43: 374-383.

EHRHART-BORNSTEIN M, BORNSTEIN SR, TRZECLAK WH, USADEL H, GUSE-BEHLING H, WATERMAN MR, SCHERBAUM WA: Adrenaline stimulates cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 mRNA accumulation in bovine adrenocortical cells. *J. Endocrinol.* **1991**; 131: R5-R8.

ERNE D y SCHWYZER R: Membrane structure of bombesin studied by infrared spectroscopy. Prediction of membrane interactions of gastrin-releasing peptide, neuromedin B and neuromedin C. *Biochemistry* **1987**; 26: 6316-6319.

EVANS RM y ARRIZA JL: A molecular framework for the actions of glucocorticoids hormones in the nervous system. *Neuron* **1989**; 2: 1105-1112.

## F

---

FATHI Z, CORJAY MH, SHAPIRA H, WADA E, BENYA R, JENSEN R, VIALLET J, SAUSVILLE EA, BATTEY JF: BRS-3: a novel bombesin receptor subtype selectively expressed in testis and lung carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* **1993**; 268: 5979-5984.

FAMILIARI M, FUNDER JW, GIRAUD AS: Potentiation by bombesin of corticotropin-releasing factor-stimulated ACTH release is dependent of the presence of glucocorticoids. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 505-507.

FEDER HH: Essentials of steroid structure, nomenclature, reactions, biosynthesis and measurements. N.T. Adler (ed.) *Neuroendocrinology of Reproduction*. Plenum:New York, **1981**.

FEHM HL, VOIGT KH, LANG RE, PFEIFFER EF: Effects of neurotransmitters on the release of corticotropin-releasing hormone (CRH) by rat hypothalamic tissue in vitro. *Exp. Brain Res.* **1980**; 39: 229-234.

FELDMAN S, CONFORTI N, MELAMED E: Paraventricular nucleus serotonin mediates neurally stimulated adrenocortical secretion. *Brain Res. Bull.* **1987**; 18: 165-168.

FELDMAN RI, WU JM, JENSON JC, MANN E: Purification and characterization of the bombesin/gastrin releasing peptide receptor from Swiss 3T3 cells. *J. Biol. Chem.* **1990**; 265: 17364-17372.

FIGLEWICZ DP, STEIN LJ, WOODS SC, PORTE D Jr: Acute and chronic gastrin-releasing peptide decreases food intake in baboons. *Am. J. Physiol.* **1985**; 248: R578-R583.

FIORUCCI S y MC ARTHUR KE: Gastrin-releasing peptide directly releases pepsinogen from guinea pig chief cells. *Am. J. Physiol.* **1990**; 259: G760-G766.

FISHER LA y BROWN MR: Bombesin-induced stimulation of cardiac parasympathetic innervation. *Regul. Pept.* **1984**; 8: 335-343.

FISHER LA, CAVE CR, BROWN MR: Central nervous system cardiovascular effects of bombesin in conscious rats. *Am. J. Physiol.* **1985**; 248: H425-H431.

FISHER LA: Corticotropin-releasing factor: endocrine and autonomic integration of responses to stress. *Trends in Pharmacol. Sci.* **1989**; 10: 189-193.

FISCETTE CT, KOMISARUK BR, EDINGER HM, FEDER HH, SEGAL A: Differential fornix ablations and the circadian rhythmicity of adrenal corticosteroid secretion. *Brain Res.* **1980**; 195: 373-387.

FLETCHER DR, SHULKES A, BLADIN PH, HARDY KJ: The effect of atropine on bombesin and gastrin-releasing peptide stimulated gastrin, pancreatic polypeptide and neurotensin in man. *Regul. Pept.* **1983**; 7: 31-40.

FLOOD JF, SMITH GE, MORLEY JE: Modulation of memory processing by cholecystokinin: dependence on the vagus nerve. *Science* **1987**; 236: 832-834.

FLOOD JF y MORLEY JE: Modulation of memory retention by bombesin and gastrin-releasing peptide in mice. *Regul. Pept.* **1987**; 19: 108.

- FLOOD JF y MORLEY JE: Effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on memory processing. *Brain Res.* **1988**; 460: 314-322.
- FOLKESSON R, MONSTEIN HJ, GEIJER T, TERENIUS L: Modulation of proenkephalin A gene expression by cyclic AMP. *Mol. Brain Res.* **1989**; 5: 211-217.
- FREMEAU RT Jr, LUNDBLAD JR, PRITCHETT DB, WILCOX JN, ROBERTS JL: Regulation of pro-opiomelanocortin gene transcription in individual cell nuclei. *Science.* **1986**; 234: 1265-1269.
- FRIM DM, ROBINSON BG, PASIEKA KB, MAJZOUB JA: Differential regulation of corticotropin-releasing hormone mRNA in rat brain. *Am. J. Physiol.* **1990**; 258: E686-E692.
- FULLER RW y SNOODY HD: Serotonin-receptor subtypes involved in the elevation of serum corticosterone concentration in rats by direct- and indirect-acting serotonin agonists. *Neuroendocrinology* **1990**; 52: 206-211.
- FULLER W: The involvement of serotonin in the regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front. Neuroendocrinol.* **1992**; 13: 250-270.
- FUNDER JW, PEARCE PT, SMITH R, SMITH AI: Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* **1988**; 242: 583-585.
- FUNDER JW: *Corticosteroid receptors in the brain.* En Mota M (ed). *Brain Endocrinology.* Raven Press, New York, **1991**.
- FURNESS JB, MILLER AS, COSTA M: The presence and possible roles of bombesin-like peptides in enteric neurons. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 76-82.

## G

---

- GAGNER JP y DROUIN J: Tissue-specific regulation of pituitary proopiomelanocortin gene transcription by corticotropin-releasing hormone, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate, and glucocorticoids. *Mol. Endocrinol.* **1987**; 1: 677-682.
- GAILLARD RC, RIONDEL A, MULLER AF, HERRMANN J, BAULIEU A: RU-486: A steroid with antiglucocorticosteroid activity that only disinhibits the human pituitary-adrenal system at a specific time of the day. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**; 81: 3879-3882.
- GALLO-PAYET N y ESCHER E: Adrenocorticotropin receptors in rat adrenal glomerulosa cells. *Endocrinology* **1985**; 117: 38-46.
- GANONG WF, ALPERT LC, LEE TC: ACTH and the regulation of adrenocortical secretion. *New Eng. J. Med.* **1974**; 290: 1006-1011.
- GANONG WF, KRAMER N, REID IA, BORYCZKA AT, SHACKELFORD R: Inhibition of stress-induced ACTH secretion by norepinephrine in the dog: mechanism and site of action. *Catecholamines and stress* **1976**, pp. 139-143.
- GARCIA-GARCIA L, FUENTES JA, MANZANARES J: Differential 5-HT-mediated regulation of stress-induced activation of proopiomelanocortin (POMC) gene expression in the anterior and intermediate lobe of the pituitary in male rats. *Brain Res.* **1997**; 772: 115-120.
- GARCIA-GARCIA L, LLEWELLYN-JONES V, FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ I, FUENTES JA, MANZANARES J: Acute and repeated ECS treatment increases CRF, POMC and PENK gene expression in selected regions of the rat hypothalamus. *Neuroreport* **1998a**; 9: 73-77.
- GARCIA-GARCIA L, HARBUZ MS, MANZANARES J, LIGHTMAN SL, FUENTES JA: RU-486 blocks stress-induced enhancement of proenkephalin gene expression in the paraventricular nucleus of rat hypothalamus. *Brain Res.* **1998b**; 786: 215-218.
- GEE CE, CHEN CL, ROBERTS JL, THOMPSON R, WATSON SJ: Identification of proopiomelanocortin neurones in rat hypothalamus by in situ cDNA-mRNA hybridization. *Nature.* **1983**; 306: 374-376.

- GERTZ BJ, CONTRERAS LN, MC COMB DJ, KOVACS K, TYRRELL JB, DALLMAN MF: Chronic administration of corticotropin-releasing factor increases pituitary corticotroph number. *Endocrinology* **1987**; 120: 381-388.
- GHATEI MA, JUNG RT, STEVENSON JC, HILLYARD CJ, ADRIAN TE, LEE YC, CHRISTOFIDES ND, SARSON DL, MASHITER K, MAC INTYRE I, BLOOM SR: Bombesin: action on gut hormones and calcium in man. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1982**; 54: 980-985.
- GHATEI MA, BLOOM SR, LANGEVIN H, MC GREGOR GP, LEE YC, ADRIAN TE, O'SHAUGHNESSY DJ, BLANK MA, UTTENTHAL LO: Regional distribution of bombesin and seven other regulatory peptides in the human brain. *Brain Res.* **1984**; 293: 101-109.
- GHATEI MA, GU J, ALLEN JM, POLAK JM, BLOOM SR: Bombesin-like immunoreactivity in the female rat genito-urinary tract. *Neurosci. Lett.* **1985**; 54: 13-19.
- GIBBS J, KULKOSKY PJ, SMITH GP: Effects of peripheral and central bombesin on feeding behavior of rats. *Peptides* **1981**; 2: 179-183.
- GIBBS DM y VALE W: Presence of corticotropin-releasing factor immunoreactivity in hypophysial portal blood. *Endocrinology* **1982**; 111: 1418-1420.
- GIBBS DM y VALE W: Effect of serotonin reuptake inhibitor fluoxetine on corticotropin-releasing factor and vasopressin secretion into hypophysial portal blood. *Brain Res.* **1983**; 280: 176-179.
- GIBBS DM, VALE W, RIVIER J, YEN SS: Oxytocin potentiates the ACTH releasing activity of CRF (41) but not vasopressin. *Life Sci.* **1984**; 34: 2245-2249.
- GIBBS J: Current concepts in biological actions of bombesin-related peptides: Part V. Effect of bombesin on feeding behavior. *Life Sci.* **1985**; 37: 147-153.
- GIBBS J y SMITH GP: The actions of bombesin-like peptides on food intake. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 210-216.
- GIGUÈRE V, COTÈ J, LABRIE F: Characteristics of the alpha-adrenergic stimulation of adrenocorticotropin secretion in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **1981**; 109: 757-762.
- GIGUÈRE V, LABRIE F, COTÈ J, COY DH, SUEIRAS-DIAZ J, SCHALLY AV: Stimulation of cyclic AMP accumulation and corticotropin release by synthetic ovine corticotropin-releasing factor in rat anterior pituitary cells: site of glucocorticoid action. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1982**; 79: 3466-3469.
- GIRAUD AS, SMITH AI, RUNDLE SE: Distribution and molecular forms of immunoreactive bombesin in the ovine median eminence. *Mol. Cell. Endocrinol.* **1987a**; 53: 245-250.
- GIRAUD AS, SOLL AH, CUTTITTA F, WALSH JH: Bombesin stimulation of gastrin release from canine gastrin cells in primary culture. *Am. J. Physiol.* **1987b**; 252: G413-G420.
- GIRAUD AS, PARKER LM, RUNDLE SE, CLARKE IJ, SMITH AI: Distribution and processing of bombesin-like peptides in the ovine median eminence and hypothalamo-hypophyseal portal blood. *Proc. Lorne Protein Meeting* **1990**; p. 64.
- GLAD H, SVENDSEN P, AINSWORTH MA, OLSEN O, REHFELD JF, SCHAFFALIZKY DE MUCKADELL OB: The effect of gastrin-releasing peptide on porcine pancreaticobiliary bicarbonate secretion is mediated by secretin. *Scand. J. Gastroenterol.* **1994**; 29: 195-202.
- GLAD H, SVENDSEN P, KNUHTSEN S, OLSEN O, SCHAFFALIZKY DE MUCKADELL OB: Importance of gastrin-releasing peptide on acid-induced secretin release and pancreaticobiliary and duodenal bicarbonate secretion. *Scand. J. Gastroenterol.* **1996**; 31: 993-1000.
- GMEREK DE y COWAN A: In vivo evidence for benzomorphan-selective receptors in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984**; 230: 110-115.
- GNESSI L, ULISSE S, FABBRI A, JANNINI EA, BONIFACIO V, MORETTI C, SPERA G, ISIDORI A: Isolation of a human seminal plasma peptide with bombesin activity. *Fertil. Steril.* **1989**; 51: 1034-1039.
- GOLD PW y CHROUSOS GP: Clinical studies with corticotropin-releasing factor: implications for the

diagnosis and pathophysiology of depression, Cushing's disease, and adrenal insufficiency. *Psychoneuroendocrinology* **1985**; 10: 401-419.

GOLD PW, GWIRTSMAN H, AVGERINOS P, NIEMAN LK, GALLUCI WT, KAYE W, JIMERSON D, EBERT M, RITTMASER R, LORIAUX DL: Abnormal hypothalamic-pituitary-adrenal function in anorexia nervosa. Pathophysiologic mechanisms in underweight and weight-corrected patients. *N. Engl. J. Med.* **1986a**; 314: 1335-1342.

GOLD PW, LORIAUX DL, ROY A, KLING MA, CALABRESE JR, KELLNER CH, NIEMAN LK, POST RM, PICKAR D, GALLUCI W: Responses to corticotropin-releasing hormone in the hypercortisolism of depression and Cushing's disease. Pathophysiologic and diagnostic implications. *N. Engl. J. Med.* **1986b**; 314: 1329-1335.

GOLD PW, GOODWIN F, CHROUSOS GP: Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to neurobiology of stress, part 1. *N. Eng. J. Med.* **1988a**; 319: 348-353.

GOLD PW, GOODWIN F, CHROUSOS GP: Clinical and biochemical manifestations of depression. Relation to neurobiology of stress, part 2. *N. Eng. J. Med.* **1988b**; 319: 413-420.

GOODMAN RH: Regulation of neuropeptide gene expression. *Annu. Rev. Neurosci.* **1990**; 13: 111-127.

GORBULEV V, AKHUNDOVA A, BÜCHNER H, FAHRENHOLTZ F: Molecular cloning of a new bombesin-receptor subtype expressed in uterus during pregnancy. *Eur. J. Biochem.* **1992**; 208: 405-410.

GOTOH M, IGUCHI A, YANASE M, FUTENMA A, NAKAMURA S, KATO K, SAKAMOTO N: The roles of glucagon and epinephrine in mediated hyperglycemia induced by third cerebroventricular injection of bombesin. *Endocrinol. Jpn.* **1988**; 35: 639-645.

GOUDREAU JL, MANZANARES J, LOOKINGLAND KJ, MOORE KE: 5HT<sub>2</sub> receptors mediate the effects of stress on the activity of periventricular hypothalamic dopaminergic neurons and the secretion of alpha-melanocyte-stimulating hormone. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1993**; 265: 303-307.

GREGERSEN S y AHREN B: Studies on the mechanisms by which gastrin-releasing peptide potentiates glucose-induced insulin secretion from mouse islets. *Pancreas* **1996**; 12: 48-57.

GROSSMAN A, KRUSERMAN AC, PERRY L, TOMLIN S, SCHALLY AV, COY DH, REES LH, COMARY-SCHALLY AM, BESSER GM: New hypothalamic hormone, corticotropin-releasing factor, specifically stimulates the release of adrenocorticotropic hormone and cortisol in man. *Lancet* **1982**; 24: 921-922.

GROSSMAN A y COSTA A: The regulation of hypothalamic CRH: impact on in vitro studies on the central control of the stress response. *Funct. Neurol.* **1993**; 8: 325-334.

GUARINI S, TAGLIAVINI S, BAZZANI C, BERTOLINI A: Bombesin reverses bleeding-induced hypovolemic shock, in rats. *Life Sci.* **1989**; 45: 107-116.

GUGLIETTA A, IRONS BJ, LAZARUS LH: Interaction between bombesin and brain prostaglandins in the control of gastric secretion. *Regul. Pept.* **1987**; 19: p. 112.

GUILD S y REISINE T: Molecular mechanism of corticotropin-releasing factor stimulation of calcium mobilization and adrenocorticotropic release from anterior pituitary tumor cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1987**; 241: 125-130.

GUILLERMIN R y ROSENBERG B: Humoral hypothalamic control of anterior pituitary: a study with combined tissue cultures. *Endocrinology* **1955**; 57: 599-607.

GULLNER HG y YAJIMA H: Gastrin-releasing peptide: endocrine functions in the rat. *Pharmacol. Res. Commun.* **1983**; 15: 247-252.

GUNDLACH AL y KNOBE KE: Preprogastrin-releasing peptide messenger ribonucleic acid: neuroanatomical localization in rat brain by in situ hybridization with synthetic oligodeoxynucleotide probes. *Neurosci. Lett.* **1992**; 137: 123-128.

GUNION MW, TACHÉ Y, ROSENTHAL MJ, MILLER S, BUTLER B, ZIB B: Bombesin microinfusion into the rat hypothalamic paraventricular nucleus increases blood glucose, free fatty acids and

corticosterone. *Brain Res.* **1989**; 478: 47-58.

## H

---

HALE AC, PRICE J, ACKLAND JF, DONIACH I, RATTER S, BESSER GM, REES LH: Corticotrophin-releasing factor-mediated adrenocorticotrophin release from rat anterior pituitary cells is potentiated by C-terminal gastrin-releasing peptide. *J. Endocrinol.* **1984**; 102: R1-R3.

HAJRI A, APRAHAMIAN M, DAMGE C: Effect of a new CCK-receptor antagonist, CR 1409, on pancreatic growth induced by caerulein, CCK-8, bombesin and gastrin releasing peptide in the rat. *Digestion* **1989**; 43: 66-72.

HAMLIN KE y FISHER FE: The synthesis of 5-hydroxytryptamine. *J. Am. Chem. Soc.* **1951**; 73: 5007-5008.

HAMMER RP JR, BOGIC L, HANDA RJ: Estrogenic regulation of proenkephalin mRNA expression in the ventromedial hypothalamus of the adult male rat. *Mol. Brain Res.* **1993**; 19: 129-134.

HAMPTON LL, LADENHEIM EE, AKESON M, WAY JM, WEBER HC, SUTLIFF VE, JENSEN RT, WINE LJ, ARNHEITER H, BATTEY JF: Loss of bombesin-induced feeding suppression in gastrin-releasing peptide receptor-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**; 95: 3188-3192.

HARBUZ MS y LIGHTMAN SL: Responses of hypothalamic and pituitary mRNA to physical and psychological stress in the rat. *J. Endocrinol.* **1989a**; 122: 705-711.

HARBUZ MS y LIGHTMAN SL: Glucocorticoid inhibition of stress-induced changes in hypothalamic corticotrophin-releasing factor messenger RNA and proenkephalin A messenger mRNA. *Neuropeptides* **1989b**; 14: 17-20.

HARBUZ MS, CHOWDREY HS, JESSOP DS, BISWAS S, LIGHTMAN SL: Role of catecholamines in mediating messenger RNA and hormonal responses to stress. *Brain Res.* **1991**; 551: 52-57.

HARBUZ MS, JESSOP DS, LIGHTMAN SL, CHOWDREY HS: The effects of restraint or hypertonic saline stress on corticotrophin-releasing factor, arginine vasopressin, and proenkephalin A mRNAs in the CFY, Sprague Dawley and Wistar strains of rat. *Brain Res.* **1994**; 667: 6-12.

HARLAN RE, SHIVERS BD, ROMANO GJ, HOWELLS RD, PFAFF DW: Localization of proenkephalin mRNA in the rat brain and spinal cord by in situ hybridization. *J. Comp. Neurol.* **1987**; 258: 159-184.

HARRIS GW: Neural control of the pituitary gland. *Physiol.Rev.* **1948**; 28: 139-179.

HATALSKI CG, GUIRGUIS C, BARAM TZ: Corticotropin-releasing factor mRNA expression in the hypothalamic paraventricular nucleus and the central nucleus of the amygdala is modulated by repeated acute stress in the immature rat. *J. Neuroendocrinol.* **1998**; 10: 663-669.

HAUGER RL, MILLAN MA, CATT KJ, AGUILERA G: Differential regulation of brain and pituitary corticotropin-releasing factor receptors by corticosterone. *Endocrinology* **1987**; 120: 1527-1533.

HAUGER RL, MILLAN MA, LORANG M, HARWOOD JP, AGUILERA G: Corticotropin-releasing factor receptors and pituitary adrenal responses during immobilization stress. *Endocrinology* **1988**; 123: 396-405.

HEIMBROCK DC, BOYER ME, GARSKY VM, BALISHIN NL, KIEFER DM, OLIFF A, RIEMEN MW: Minimal ligand analysis of gastrin-releasing peptide. Receptor binding and mitogenesis. *J. Biol. Chem.* **1988**; 263: 7016-7019.

HEIMBROCK DC, SAARI WS, BALISHIN NL, FRIEDMAN A, MOORE KS, REIMEN MW, KIEFER DM, ROTBERG NS, WALLEN JW, OLIFF A: Carboxyl-terminal modification of a gastrin releasing peptide derivative generates potent antagonists. *J. Biol. Chem.* **1989**; 264: 11258-11262.

HEINZ-ERIAN P, COY DH, TAMURA M, JONES SW, GARDNER JD, JENSEN RT: [D-Phe<sup>12</sup>] bombesin analogues: a new class of bombesin receptor antagonists. *Am. J. Physiol.* **1987**; 252: G439-G442.

- HELLMICH MR, BATTEY JF, NORTHUP JK: Selective reconstitution of gastrin-releasing peptide receptor with Galf<sub>a</sub>. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1997**; 94: 751-756.
- HELLICH MR, IVES KJ, UDUPI V, SOLOFF MS, GREELEY GH Jr, CHRISTENSEN BN, TOWNSEND CM Jr: Multiple protein-kinase pathways are involved in gastrin-releasing peptide receptor-regulated secretion. *J. Biol. Chem.* **1999**; 274: 23901-23909.
- HENTSCHEL K, CHEUNG S, MOORE KE, LOOKINGLAND KJ: Pharmacological evidence that neurotensin mediates prolactin-induced activation of tuberoinfundibular dopamine neurons. *Neuroendocrinology* **1998**; 68: 71-76.
- HERMAN JP, SCHAFER MK, YOUNG EA, THOMSON R, DOUGLAS J, AKIL H, WATSON SJ: Evidence for hippocampal regulation of neuroendocrine neurons of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis. *J. Neurosci.* **1989**; 9: 3072-3082.
- HERMAN JP, WIEGAND SJ, WATSON SJ: Regulation of basal corticotropin-releasing hormone and arginine-vasopressin messenger ribonucleic acid expression in the paraventricular nucleus: effects of selective hypothalamic deafferentations. *Endocrinology* **1990**; 127: 2408-2417.
- HERMAN JP, CULLINAN WE, WATSON SJ: Involvement of the bed nucleus of the stria terminalis in tonic regulation of paraventricular hypothalamic CRH and AVP mRNA expression. *J. Neuroendocrinol.* **1994**; 6: 433-442.
- HERMANSEN K y AHREN B: Gastrin-releasing peptide stimulates the secretion of insulin, but not that of glucagon or somatostatin, from the isolated perfused dog pancreas. *Acta Physiol. Scand.* **1990**; 138: 175-179.
- HILDEBRAND P, WERTH B, BEGLINGER C, DELCO F, JANSEN JB, LAMERS CB, GYR K: Human gastrin-releasing peptide: biological potency in humans. *Regul. Pept.* **1991**; 36: 423-433.
- HINSON JP: Paracrine control of adrenocortical function: a new role for the medulla? *J. Endocrinol.* **1990**; 124: 7-9.
- HJORTH S y TAO R: The putative 5-HT<sub>1B</sub> receptor antagonist CP-93,129 supresses the rat hippocampal 5-HT release in vivo: comparison with RU-24969. *Eur. J. Pharmacol.* **1991**; 209: 249-252.
- HOFFMAN DI, KRUPP L, SCHRAG D, NILAVER G, VALIQUETTE G, KILCOYNE MM, ZIMMERMAN EA: Angiotensin immunoreactivity in vasopressin cells in rat hypothalamus and its relative deficiency in homozygous Brattleboro rats. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1982**; 394: 135-141.
- HOFFMAN GE, SMITH MS, VERBALIS JG: c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* **1993**; 14: 173-213.
- HOLLT V y HAARMANN I: Corticotropin-releasing factor differentially regulates proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels in anterior as compared to intermediate pituitary lobes of rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**; 124: 407-415.
- HOLLT V, PRZEWLOCKI R, HAARMANN I, ALMEIDA OF, KLEY N, MILLAN MJ, HERZ A: Stress-induced alterations in the levels of messenger RNA coding for proopiomelanocortin and prolactin in rat pituitary. *Neuroendocrinology* **1986**; 43: 277-282.
- HOLMES MC, ANTONI FA, AGUILERA G, CATT KJ: Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. *Nature* **1986**; 319: 326-329.
- HOLST JJ, KNUHTSEN S, ORSKOV C, SKAK-NIELSEN T, POULSEN SS, NIELSEN OV: GRP-producing nerves control antral somatostatin and gastrin secretion in pigs. *Am. J. Physiol.* **1987**; 253: G767-774.
- HOLST JJ, KNUHTSEN S, SKAK-NIELSEN T: The role of gastrin-releasing peptide in pancreatic exocrine secretion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 234-241.
- HOLST JJ, KNUHTSEN S, NIELSEN OV: Role of gastrin-releasing peptide in neural control of pancreatic exocrine secretion. *Pancreas* **1989**; 4:581-586.
- HOLST JJ, HARLING H, MESSELL T, COY DH: Identification of the neurotransmitter/neuromodulator

functions of the neuropeptide gastrin-releasing peptide in the porcine antrum, using the antagonist (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)-bombesin. *Scand. J. Gastroenterol.* **1990**; 25: 89-96.

HORNBY PJ y PIEKUT DT: Opiocortin and catecholamine input to CRF-immunoreactive neurons in rat forebrain. *Peptides* **1989**; 10:1139-1146.

HORVÁTH J, ERTL T, SCHALLY AV: Effect of atrial natriuretic peptide on gonadotropin release in superfused rat pituitary cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**; 83: 3444-3446.

HOSOTANI R, CHOWDHURY P, HUANG YS, MC KAY D, YAJIMA H, RAYFORD PL: Effect of L-364,718 on GRP stimulated pancreatic and gastric secretions and gastrointestinal peptides in conscious dogs. *Pancreas* **1989**; 4: 550-555.

HOSTETLER AM, MC HUGH PR, MORAN TH: Bombesin affects feeding independent of a gastric mechanism or site of action. *Am. J. Physiol.* **1989**; 257: R1219-R1224.

HOUBEN H y DENEŒ C: Stimulation of growth hormone and prolactin release from rat pituitary cell aggregates by bombesin-and ranatensin-like peptides is potentiated by estradiol, 5 alpha-dihydrotestosterone and dexamethasone. *Endocrinology* **1990**; 126: 2257-2266.

HOUBEN H y DENEŒ C: Evidence for the presence of gastrin-releasing peptide immunoreactivity in the rat anterior pituitary corticotrophs and lactotrophs, AtT20 and GH3 cells: Failure to demonstrate participation in local control hormone release. *Endocrinology* **1991a**; 128: 3208-3218.

HOUBEN H y DENEŒ C: Bombesin receptor antagonists and their use in the evaluation of paracrine and autocrine intercellular communication. *Front. Horm. Res.* **1991b**; 19: 176-195.

HOUBEN H, VANDENBROUCKE AT, VERHEYDEN AM, DENEŒ C: Expression of the genes encoding bombesin-related peptides and their receptors in anterior pituitary tissue. *Mol. Cell. Endo.* **1993**; 97: 159-164.

HOUBEN H, ANDRIES M, DENEŒ C: Autoradiographic demonstration of <sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>-bombesin binding sites on rat anterior pituitary cells. *Peptides* **1994**; 15: 1289-1295.

HSU DT, CHEN FL, TAKAHASHI LK, KALIN NH: Rapid stress-induced elevations in corticotropin-releasing hormone mRNA in the rat central amygdala nucleus and hypothalamic paraventricular nucleus: an in situ hybridization analysis. *Brain Res.* **1998**; 788: 305-310.

HU SB, TANNANHILL LA, BISWAS S, LIGHTMAN SL: Release of CRF-41, arginin-vasopressin and oxytocin from rat fetal hypothalamic cells in culture: response to activation of intracellular second messengers and to corticosteroids. *J. Endocrinol.* **1992**; 132: 57-65.

HUMPHREY PP, HARTIG P, HOYER D: A proposed nomenclature for 5HT-receptors. *Trends in Pharmacol. Sci.* **1993**; 14: 233-236.

HURD YL y HERKENHAM M: Influence of a single injection of cocaine, amphetamine or GBR 12909 on mRNA expression of striatal neuropeptides. *Mol. Brain Res.* **1992**; 16: 97-104.

HYMAN SE, COMB M, LIN YS, PEARLBERG J, GREEN MR, GOODMAN HM: A common trans-acting factor is involved in transcriptional regulation of neurotransmitter genes by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* **1988**; 8: 4225-4233.

HYMAN SE, COMB M, PEARLBERG J, GOODMAN HM: An AP-2 element acts synergistically with the cyclic AMP- and phorbol ester-inducible enhancer of the human proenkephalin gene. *Mol. Cell. Biol.* **1989**; 9: 321-324

## I

---

IADAROLA MJ, DOUGLASS J, CIVELLI O, NARANJO JR: Differential activation of spinal cord dynorphin and enkephalin neurons during hyperalgesia: evidence using cDNA hybridization. *Brain Res.* **1988**; 455: 205-212.

IGUCHI A, MATSUNAGA H, NOMURA T, GOTOH M, SAKAMOTO N: Glucoregulatory effects of intrahypothalamic injections of bombesin and other peptides. *Endocrinology* **1984**; 114: 2242-2246.

IMAKI T, SHIBASAKI T, HOTTA M, DEMURA H: Early induction of c-fos precedes increased expression of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus after immobilization stress. *Endocrinology* **1992**; 131: 240-246.

IMAKI T, XIAO-QUAN W, SHIBASAKI T, YAMADA K, HARADA S, CHIKADA N, NARUSE M, DEMURA H: Stress-induced activation of neuronal activity and corticotropin-releasing factor gene expression in the paraventricular nucleus is modulated by glucocorticoids in rats. *J. Clin. Invest.* **1995**; 96: 231-238.

IMPICCIATORE M, CHIAVARINI M, RAZZETTI R, OMNI C: Relationship between spasmogenic activity of bombesin and prostaglandins on the rat pylorus. *Pharmacol. Res. Commun.* **1981**; 13: 425-431.

INOUE K, MC KAY D, YAJIMA H, RAYFORD PL: Effect of synthetic porcine gastrin-releasing peptide on plasma levels of immunoreactive cholecystokinin pancreatic polypeptide and gastrin in dogs. *Peptides* **1983**; 4: 153-157.

INOUE T: Effects of condition fear stress on monoaminergic systems in the rat brain. *Hokkaido Igaku Zasshi* **1993**; 68: 3: 377-390.

INOUE T, TSUCHIYA K, KOYAMA T: Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**; 49: 911-920.

INSEL TR, KALIN NH, GUTTMACHER LB, COHEN RM, MURPHY DL: The dexamethasone suppression test in patients with primary obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr. Res.* **1982**; 6: 153-160.

INTURRISI CE, BRANCH AD, ROBERTSON HD, HOWELLS RD, FRANKLIN SO, SHAPIRO JR, CALVANO SE, YOBURN BC: Glucocorticoid regulation of enkephalins in cultured rat adrenal medulla. *Mol. Endocrinol.* **1988**; 2: 633-640.

ISOBE Y y MURAMATSU K: Day-night differences in the content of vasoactive intestinal peptide, gastrin-releasing peptide and arg-vasopressin in the suprachiasmatic nucleus of rat pups during postnatal development. *Neurosci. Lett.* **1995**; 188: 45-48.

ITOI K, HORIBA N, TOZAWA F, SAKAI Y, ABE K, DEMURA H, SUDA T: Major role of 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate-dependent protein-kinase A pathway in corticotropin-releasing factor gene expression in the rat hypothalamus in vivo. *Endocrinology* **1996**; 137: 2389-2396.

## J

---

JACOBSON L y SAPOLSKY R: The role of the hippocampus in feedback regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis. *Endocr. Rev.* **1991**; 12: 118-134.

JAWOREK J, KONTUREK PK, KONTUREK SJ, CAI RZ, SCHALLY AV: Actions of novel bombesin receptor antagonists on pancreatic secretion in rats. *Eur. J. Pharmacol.* **1992**; 214: 239-245.

JENSEN RT, MOODY T, PERT C, RIVIER JE, GARDNER JD: Interaction of bombesin and litorin with specific membrane receptors on pancreatic acinar cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**; 75: 6139-6143.

JENSEN RT, JONES SW, FOLKERS K, GARDNER JD: A synthetic peptide that is a bombesin receptor antagonist. *Nature* **1984a**; 309:61-63.

JENSEN R, JONES S, GARDNER J: Investigation of the ability of various substance P analogues to function as bombesin receptor antagonists. *Dig. Dis. Sci.* **1984b**; 29: 40S.

JENSEN RT, COY DH, SAEED ZA, HEINZ-HERIAN P, MANTEY S, GARDNER JD: Interaction of bombesin and related peptides with receptors on pancreatic acinar cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988a**; 547: 138-149.

JENSEN RT, HEINZ-HERIAN P, MANTEY S, JONES SW, GARDNER JD: Characterization of ability of various substance P antagonists to inhibit action of bombesin. *Am. J. Physiol.* **1988b**; 254: G883-G890.

- JENSEN RT y COY DH: Progress in the development of potent bombesin receptor antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* **1991**; 12: 13-19.
- JINGAMI H, MATSUKURA S, NUMA S, IMURA H: Effects of adrenalectomy and dexamethasone administration on the level of prepro-corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamus and adrenocorticotropin/beta-lipotropin precursor mRNA in the pituitary in rats. *Endocrinology* **1985**; 117: 1314-1320.
- JONES MT y HILLHOUSE EW: Neurotransmitter regulation of corticotropin-releasing factor in vitro. En "ACTH and related peptides: structure, regulation and action". Krieguer DT, Ganong WF (ed). N.Y. Acad. Sci. New York, **1977**.
- JOHNSON GL y DHANASEKARAN N: The G-protein family and their interaction with receptors. *Endocrine Rev.* **1989**; 10: 317-331.
- JOHNSTON SA y MERALI Z: Specific neuroanatomical and neurochemical correlates of locomotor and grooming effects of bombesin. *Peptides* **1988**; 9: 245-256.

## K

---

- KABAYAMA Y, KATO Y, SHIMATSU A, OHTA H, YANAIHARA N, IMURA H: Inhibition by gastrin-releasing peptide of growth hormone (GH) secretion induced by human pancreatic GH-releasing factor in rats. *Endocrinology* **1984**; 115: 649-653.
- KAGEYAMA K, TOZAWA F, HORIBA N, WATANOBE H, SUDA T: Serotonin stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in the hypothalamic paraventricular nucleus of conscious rats. *Neurosci. Lett.* **1998**; 243: 17-20.
- KALIVAS PW, DUFFY P, LATIMER LG: Neurochemical and behavioral effects of corticotropin-releasing factor in the ventral tegmental area of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1987**; 242: 757-763.
- KAMILARIS A, CALOGERO AE, JOHNSON EO, GOLD PW, CHROUSOS GP: Effects of hypothyroidism on the basal activity of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Clin. Res.* **1989**; 37: abstr. 360A
- KANT KG, LEU JR, ANDERSON SM, MOUGEY EH: Effects of chronic stress on plasma corticosterone, ACTH and prolactin. *Physiol. Behav.* **1987**; 40: 775-779.
- KARLSSON S y AHREN B: Peptide receptor antagonists in the study of insulin and glucagon secretion in mice. *Eur. J. Pharmacol.* **1990**; 191: 457-464.
- KATAKAMI H, ARIMURA A, FROHMAN LA: Involvement of hypothalamic somatostatin in the suppression of growth hormone secretion by central corticotropin-releasing factor in conscious male rats. *Neuroendocrinology* **1985**; 41: 390-393.
- KATSUNO T, PRADHAN TK, RYAN RR, MANTEY SA, HOU W, DONOHUE PJ, AKESON MA, SPINDEL ER, BATTEY JF, COY DH, JENSEN RT: Pharmacology and cell biology of the bombesin receptor subtype 4 (BB4-R). *Biochemistry* **1999**; 38: 7307-7320.
- KAWATA M, UEDA S, YAMASHITA H, SANO Y: Immunohistochemical studies on the distribution of neuropeptides and serotonin in the suprachiasmatic nucleus of the Brattleboro rat. *Arch. Histol. Jpn.* **1987**; 50: 1-14.
- KAWAI K, CHIBA Y, MUKAI H, MUNEKATA E, YAMASHITA K: Effects of neuromedin B, gastrin-releasing peptide-10 and their fragment peptides on the secretion of gastrointestinal and pancreatic hormones in dogs. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **1988**; 117: 205-213.
- KELLER-WOOD ME y DALLMAN MF: Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr. Rev.* **1984**; 5: 1-24.
- KENT P, ANISMAN H, MERALI Z: Central bombesin administration and restraint stress elicit CRF release at the median eminence. *Soc. Neurosci. Abstr.* **1997**; 23:1793.

- KENT P, ANISMAN H, MERALI Z: Are bombesin-like peptides involved in the mediation of stress response?. *Life Sci.* **1998**; 62: 103-114.
- KENTROTI S y MC CANN SM: The effect of gastrin-releasing peptide on growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **1985**; 117: 1363-1367.
- KENTROTI S, DEES WL, MC CANN SM: Evidence for a physiological role of hypothalamic gastrin-releasing peptide to suppress growth hormone and prolactin release in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1988a**; 85: 953-957.
- KENTROTI S, AGUILA MC, MC CANN SM: The inhibition of growth hormone release by gastrin-releasing peptide involves somatostatin release. *Endocrinology* **1988b**; 122: 2407-2411.
- KENTROTI S y MC CANN SM: Role of dopamine in the inhibitory control of growth hormone and prolactin release by gastrin-releasing peptide. *Brain Res. Bull.* **1996**; 39: 201-204.
- KING MS y BAERTSCHI AJ: The role of intracellular messengers in adrenocorticotropin secretion in vitro. *Experientia* **1990**; 46: 26-40.
- KIRKHAM TC, WALSH CA, GIBBS J, SMITH GP, LEBAN J, MC DERMED J: A novel bombesin receptor antagonist selectively blocks the satiety action of peripherally administered bombesin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1994**; 48: 809-811.
- KISHIMOTO T, PEARSE RV II 2nd, LIN CR, ROSENFELD MG: A sauvagine/corticotropin-releasing factor receptor expressed in heart and skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**; 92: 1108-1112.
- KISS JZ, PALKOVITS M, ZABORSZKY L, TRIBOLLET E, SZABO D, MAKARA GB: Quantitative histological studies on the hypothalamic paraventricular nucleus in rats: I. Number of cells and synaptic boutons. *Brain Res.* **1983**; 262: 217-224.
- KISS JZ, WILLIAMS TH, PALKOVITS M: Distribution and projections of cholecystokinin-immunoreactive neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of rat. *J. Comp. Neurol.* **1984**; 227:173-181
- KISS A y AGUILERA G: Regulation of the hypothalamic pituitary adrenal axis during chronic stress: responses to repeated intraperitoneal hypertonic saline injection. *Brain Res.* **1993**; 630: 262-270.
- KNIGGE U, HOLST JJ, KNUHTSEN S, PETERSEN B, KRARUP T, HOLST-PEDERSEN J, CHRISTIANSEN PM: Gastrin-releasing peptide: pharmacokinetics and effects on gastro-entero-pancreatic hormones and gastric secretion in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1984**; 59: 310-315.
- KNIGGE U, HOLST JJ, KNUHTSEN S, BACH FW, BANG P: Corticotropin-releasing activity of gastrin-releasing peptide in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1987**; 65: 1291-1295.
- KNUHTSEN S, HOLST JJ, KNIGGE U, OLESEN M, NIELSEN OV: Radioimmunoassay, pharmacokinetics, and neuronal release of gastrin-releasing peptide in anesthetized pigs. *Gastroenterology* **1984**; 87: 372-378.
- KNUHTSEN S, HOLST JJ, JENSEN SL, KNIGGE U, NIELSEN OV: Gastrin-releasing peptide: effect on exocrine secretion and release from isolated perfused porcine pancreas. *Am. J. Physiol.* **1985**; 248: G281-G286.
- KNUHTSEN S, HOLST JJ, SCHWARTZ TW, JENSEN SL, NIELSEN OV: The effect of gastrin-releasing peptide on the endocrine pancreas. *Regul. Pept.* **1987**; 17: 269-276.
- KÖNIG JFR y KLIPPEL RA: The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem. Huntington, Krieger **1963**.
- KOOB GF y BLOOM FE: Corticotropin-releasing factor and behavior. *Fed. Proc.* **1985**; 44: 259-263.
- KOSTICH WA, CHEN A, SPERLE K, LARGENT BL: Molecular identification and analysis of a novel human corticotropin-releasing factor (CRF) receptor: the CRF2 gamma receptor. *Mol. Endocrinol.* **1998**; 12: 1077-1085.
- KOVACS KJ y MEZEY E: Dexamethasone inhibits corticotropin-releasing factor gene expression in the rat paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* **1987**; 46: 365-368.

- KOVACS TOG, WELTON ML, COYD, TACHÉ Y, WALSH JH: Intravenous [Leu<sup>13</sup>-ψCH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>] bombesin antagonizes bombesin stimulated gastrin and acid secretion in dogs. *Gastroenterology* **1988**; 94: A238.
- KROWICKI ZK y SADOWSKA-KROWICKA H: The role of bombesin in inhibiting tyrotropin hormone secretion in rats. In vivo studies. *Endokrynol. Pol.* **1989**; 40:125-132.
- KROOG GS, JENSEN RT, BATTEY JF: Mammalian bombesin receptors. *Med. Res. Rev.* **1995a**; 15: 389-417.
- KROOG GS, SAINZ E, WORLAND PJ, AKESON MA, BENYA RV, JENSEN RT, BATTEY JF: The gastrin-releasing peptide receptor is rapidly phosphorylated by a kinase other than protein kinase C after exposure to agonist. *J. Biol. Chem.* **1995b**; 270: 8217-8224.
- KWAK SP, YOUNG EA, MORANO I, WATSON SJ, AKIL H: Diurnal corticotropin-releasing hormone mRNA variation in the hypothalamus exhibits a rhythm distinct from that in corticosterone. *Neuroendocrinology* **1992**; 55: 74-83.

## L

---

- LACH E, HADDAD EB, GIES JP: Contractile effect of bombesin on guinea pig lung in vitro: involvement of gastrin-releasing peptide preferring receptors. *Am. J. Physiol.* **1993**; 264: L80-L86.
- LACHUER J, GAILLET S, BARBAGLI B, BUDA M, TAPPAZ M: Differential early time course activation of the brainstem catecholaminergic groups in response to various stresses. *Neuroendocrinology* **1991**; 53: 589-596.
- LACROIX S, VALLIERES L, RIVEST S: C-fos mRNA pattern and corticotropin-releasing factor neuronal activity throughout the brain of rats injected centrally with a prostaglandin of E2 type. *J. Neuroimmunol.* **1996**; 70: 163-179.
- LADENHEIM EE, JENSEN RT, MANTEY SA, MORAN TH: Distinct distributions of two bombesin receptor subtypes in the rat central nervous system. *Brain Res.* **1992**; 593: 168-178.
- LADENHEIM EE, TAYLOR JE, COY DH, MOORE KA, MORAN TH: Hindbrain GRP receptor blockade antagonizes feeding suppression by peripherally administered GRP. *Am. J. Physiol.* **1996**; 271: R180-R184.
- LADENHEIM EE, MOORE KA, SALORIO CF, MANTEY SA, TAYLOR JE, COY DH, JENSEN RT, MORAN TH: Characterization of bombesin binding sites in the rat stomach. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**; 319: 245-251.
- LADENHEIM EE, WOHN A, WHITE WO, SCHWARTZ GJ, MORAN TH: Inhibition of gastric emptying by bombesin-like peptides is dependent upon cholecystokinin-A receptor activation. *Regul. Pept.* **1999**; 84: 101-106.
- LARSEN PJ, O'HARE MM, VANGSTED A, MIKKELSEN JD: Gastrin-releasing peptide (GRP) is present in a GRP (1-27) form in anterior pituitary cells of the guinea pig. *Peptides* **1989a**; 10: 815-818.
- LARSEN PJ, SAERMARK T, MIKKELSEN JD: An immunohistochemical demonstration of gastrin-releasing peptide (GRP) in the rat substantia nigra. *J. Chem. Neuroanat.* **1989b**; 2: 83-93.
- LARSEN PJ, JESSOP D, PATEL H, LIGHTMAN SL, CHOWDREY HS: Substance P inhibits the release of anterior pituitary adrenocorticotropin via a central mechanism involving corticotrophin-releasing factor containing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus. *J. Neuroendocrinol.* **1993**; 5: 99-105.
- LARSEN PJ y MAU SE: Effect of acute stress on the expression of hypothalamic messenger ribonucleic acid encoding the endogenous opioid precursors preproenkephalin A and proopiomelanocortin. *Peptides* **1994**; 15: 783-790.
- LAVICKY J y DUNN AJ: Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *J. Neurochem.* **1993**; 60: 602-612.

- LEBAN JJ, KULL FC Jr., LANDAVAZO A, STOCKSTILL B, MC DERMED JD: Development of potent gastrin-releasing peptide antagonists having a D-Pro- $\psi$ (CH<sub>2</sub>-NH)-Phe-NH<sub>2</sub> C terminus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1993**; 90:1922-1926.
- LEBAN JJ, LANDAVAZO A, MC DERMED JD, DILIBERTO EJ Jr., JANSEN M, STOCKSTILL B, KULL FC Jr: Potent gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists derived from GRP (19-27) with a C-terminal DPro $\psi$ [CH<sub>2</sub>NH]Phe-NH<sub>2</sub> and N-terminal aromatic residues. *J. Med. Chem.* **1994**; 37: 439-445.
- LEBACQ-VERHEYDEN AM, KRYSYAL G, MARKOWITZ S, WAY J, SAUSVILLE E, BATTEY JF: Molecular analysis of the expression of mammalian pre-pro gastrin-releasing peptide genes (abst). *Regulat. Pept.* **1987**; 19: 122.
- LEBACQ-VERHEYDEN AM, KRYSYAL G, SARTORO, WAY J, BATTEY JF: The rat prepro gastrin-releasing peptide is transcribed from two initiation sites in the brain. *Mol. Endocrinol.* **1988**; 2: 556-563.
- LEBAQC-VERHEYDEN AM, WAY J, BATTEY J: Structural characterization of a brain-specific promoter region directing transcription of the rat prepro-gastrin-releasing peptide gene. *Mol. Brain. Res.* **1990**; 7: 235-241.
- LECHNER J, LEAH JD, ZIMMERMANN M: Brainstem peptidergic neurons projecting to the medial and lateral thalamus and zona incerta in the rat. *Brain Res.* **1993**; 603: 47-56.
- LEE S, RIVIER C, TORRES G: Induction of c-fos and CRF mRNA by MK-801 in the parvocellular paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol. Brain Res.* **1994**; 24: 192-198.
- LEFEBVRE H, CONTESSE V, DELARUE C, FEUILLOLEY M, MERY F, GRISE P, RAYNAUD G, VERHOFSTAD AA, WOLF LM, VAUDRY H: Serotonin-induced stimulation of cortisol secretion from human adrenocortical tissue is mediated through activation of a serotonin 4 receptor subtype. *Neuroscience* **1992**; 47: 999-1007.
- LEFEBVRE H, CONTESSE V, DELARUE C, SOUBRANE C, LEGRAND A, KUHN JM, WOLF LM, VAUDRY H: Effect of the serotonin-4 receptor agonist zacopride on aldosterone secretion from human adrenal cortex: in vivo and in vitro studies. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **1993**; 93: 253-260.
- LE HOUX JG, MASON JI, DUCHARME L: In vivo effects of adrenocorticotropin on hamster adrenal steroidogenic enzymes. *Endocrinology* **1992**; 131: 1874-1882.
- LEMAIRE S, CHOUINARD L, MERCIER P, DAY R: Bombesin-like immunoreactivity in bovine adrenal medulla. *Regul. Pept.* **1986**; 13: 133-146.
- LENHARD L y DEPTOS LJ: Adenohypophyseal hormones in the CSF. *Neuroendocrinology* **1982**; 34: 303-308.
- LESCH KP, RUPPRECHT R, POTEN B, MULLER U, SOHNLE K, FRITZE J, SCHULTE HM: Endocrine responses to 5-hydroxytryptamine-1A receptor activation by ipsapirone in humans. *Biol. Psychiat.* **1989**; 26: 203-205.
- LESCH KP, MAYER S, DISSELKAMP-TIETZE J, HOH A, WEISMANN M, OSTERHEIDER M, SCHULTE HM: 5-HT<sub>1A</sub> receptor responsivity in unipolar depression. Evaluation of ipsapirone-induced ACTH and cortisol secretion in patients and controls. *Biol. Psychiat.* **1990a**; 28:620-628.
- LESCH KP, SOHNLE K, POTEN B, SCHOELLNHAMMER G, RUPPRECHT R, SCHULTE HM: Corticotropin and cortisol secretion after central 5-hydroxytryptamine-1A (5-HT<sub>1A</sub>) receptor activation: effects of 5-HT receptor and beta adrenoreceptor antagonists. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990b**; 70: 670-674.
- LEVIN N, SHINSAKO J, DALLMAN MF: Corticosterone acts on the brain to inhibit adrenalectomy-induced adrenocorticotropin secretion. *Endocrinology* **1988**; 122: 694-701.
- LEVIN N, BLUM M, ROBERTS JL: Modulation of basal and corticotropin-releasing factor-stimulated proopiomelanocortin gene expression by vasopressin in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* **1989**; 125: 2957-2966.
- LEVIN N, WALLACE C, BENGANI N, BLUM M, FARNWORTH P, SMITH AI, ROBERTS JL: Ovine anterior pituitary proopiomelanocortin gene expression is not increased by ACTH secretagogues in vitro.

*Endocrinology* **1993**; 132: 1692-1700.

LEWIS LD y WILLIAMS JA: Regulation of cholecystokinin secretion by food, hormones, and neural pathways in the rat. *Am. J. Physiol.* **1990**; 258: G512-G518.

L'HEREAULT S y BARDEN N: Monoaminergic regulation of proopiomelanocortin messenger RNA concentrations in primary cell cultures of rat hypothalamus. *Mol. Brain Res.* **1991a**; 9:327-332.

L'HEREAULT S y BARDEN N: Biphasic regulation of proopiomelanocortin messenger RNA concentrations by corticotropin-releasing factor in primary cultures of rat hypothalamic neurons. *Neurosci Lett.* **1991b**; 128: 207-210.

LIGHTMAN SL y YOUNG WS 3d: Changes in hypothalamic preproenkephalin A mRNA following stress and opiate withdrawal. *Nature* **1987a**; 328: 643-645.

LIGHTMAN SL y YOUNG WS: Vasopressin, oxytocin, dynorphin, enkephalin and corticotrophin-releasing factor mRNA stimulation in the rat. *J. Physiol.* **1987b**; 394:23-39.

LIGHTMAN SL y YOUNG WS 3D: Corticotrophin-releasing factor, vasopressin and pro-opiomelanocortin mRNA responses to stress and opiates in the rat. *J Physiol (Lond).* **1988**; 403: 511-523.

LIGHTMAN SL y HARBUSZ MS: Expression of corticotropin-releasing factor mRNA in response to stress. *Ciba Found. Symp.* **1993**; 172: 173-187.

LIN JY y PAN JT: Bombesin and neurotensin excite neurons in hypothalamic arcuate neurons in brain slices: an extracellular single unit study. *Brain Res.* **1993**; 30: 177-180.

LIND RW, SWANSON LW, BRUHNT O, GANTEN D: The distribution of angiotensin II-immunoreactive cells and fibers in the paraventriculo-hypophyseal system. *Brain Res.* **1985**; 338: 81-89.

LINDLEY SE, GUNNET JW, LOOKINGLAND KJ, MOORE KE: 3,4-dihydroxyphenilacetic acid concentrations in the intermediate lobe and neural lobe of the posterior pituitary gland as an index of tuberohypophysial dopaminergic neuronal activity. *Brain Res.* **1990**; 506: 133-138.

LINTON EA, TILDERS FJ, HODGKINSON S, BERKENBOSCH F, VERMES I, LOWRY PJ: Stress-induced secretion of adrenocorticotropin in rats is inhibited by administration of antisera to ovine corticotropin-releasing factor and vasopressin. *Endocrinology* **1985**; 116: 966-970.

LIPOSITS Z, PAULL WK, SÉTÁLÓ G, VIGH S: Evidence for local corticotropin-releasing factor (CRF)-immunoreactive neuronal circuits in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. An electron microscopic immunohistochemical analysis. *Histochemistry* **1985**; 83: 5-16.

LIPOSITS Z, PHELIX C, PAULL WK: Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Histochemistry* **1987**; 86:541-549.

LIPOSITS ZC y PAULL WK: Association of dopaminergic fibers with corticotropin releasing hormone (CRH)-synthesizing neurons in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Histochemistry* **1989**; 93: 119-127.

LIU F, NARUSE S, OZAKI T, SAZI T, KONDO T, TODA Y: Effect of gastrin-releasing peptide (GRP) on guinea pig gallbladder contraction in vitro. *J. Gastroenterol.* **1995**; 30: 764-767.

LLINARES M, DEVIN C, CHALOIN O, AZAY J, NOEL-ARTIS AM, BERNAD N, FEHRENTZ JA, MARTINEZ J: Synthesis and biological activities of potent bombesin receptor antagonists. *J. Pept. Res.* **1999**; 53: 275-283.

LOEFFLER JP, KLEY N, PITNIUS CW, HOLLT V: Corticotropin-releasing factor and forskolin increase proopiomelanocortin messenger RNA levels in rat anterior and intermediate cells in vitro. *Neurosci. Lett.* **1985**; 62: 383-387.

LOOKINGLAND KJ y MOORE KE: Dopamine receptor-mediated regulation of incertohypothalamic dopaminergic neurons in the male rat. *Brain Res.* **1984**; 304: 329-338.

LOUGHLIN SE, FOOTE SL, GRZANNA R: Efferent projections of nucleus coeruleus: morphologic subpopulations have different efferent targets. *Neuroscience* **1986**; 18: 307-319.

- LOVENBERG TW, CHALMERS DT, LIU C, DE SOUZA EB: CRF2 alfa and CRF2 beta receptor mRNAs are differentially distributed between the rat central nervous system and peripheral tissues. *Endocrinology* **1995**; 136: 4139-4142.
- LOWRY OH, ROSENBROUGH NJ, FARR NJ, RANDALL RJ: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**; 193: 265-275.
- LUNDBLAD JR y ROBERTS JL: Regulation of proopiomelanocortin gene expression in pituitary. *Endocr. Rev.* **1988**; 9: 135-158.
- LUNDELL L, CANTOR P, SJOVALL M, REHFELD JF, OLBE L: Factors influencing the release of cholecystokinin induced by gastrin-releasing peptide in man. *Scand. J. Gastroenterol.* **1991**; 26: 544-550.
- LYNCH DR y SNYDER SH: Neuropeptides: multiple molecular forms, metabolic pathways, and receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **1986**; 55: 773-799.
- LYNN RB, HYDE TM, COOPERMAN RR, MISELIS RR: Distribution of bombesin-like immunoreactivity in the nucleus of the solitary tract and dorsal motor nucleus of the rat and human: colocalization with tyrosine hydroxylase. *J. Comp. Neurol.* **1996**; 369: 552-570.
- LYNN RB, BECHTOLD LS, MISELIS RR: Ultrastructure of bombesin-like immunoreactive nerve terminals in the nucleus of the solitary tract and the dorsal motor nucleus. *J. Auton. Nerv. Syst.* **1997**; 62: 174-182.

---

## M

---

- MAI LM y PAN JT: Central administration of bombesin blocks the estrogen-induced afternoon prolactin surge. *Neuroendocrinology* **1993**; 57: 40-44.
- MAJZOUB JA, EMANUEL R, ADLER G, MARTINEZ C, ROBINSON B, WITTEG G: Second messenger regulation of mRNA for corticotropin-releasing factor. *Cyba Found. Symp.* **1993**; 172: 30-43, discussion 43-58.
- MAKARA GB y STARK E: Effect of gamma-aminobutyric acid (GABA) and GABA antagonist drugs on ACTH release. *Neuroendocrinology* **1974**; 16: 178-190.
- MAKHLOUF GM y SCHUBERT ML: Antral bombesin: physiological regulator of gastrin secretion. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 225-233.
- MAKINO W, GOLD PW, SCHULKIN J: Corticosterone effects on corticotropin-releasing hormone mRNA in the central nucleus of the amygdala and the parvocellular region of the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Brain Res.* **1994**; 640: 105-112.
- MALENDOWICZ LK y MISKOWIAK B: Effects of prolonged administration of neurotensin, arginine-vasopressin, NPY and bombesin on blood TSH, T3 and T4 levels in the rat. *In vivo* **1990**; 4: 259-261.
- MALENDOWICZ LK y NUSSDORFER GG: Investigations on the acute effects of neuropeptides on the pituitary-adrenocortical function in normal and cold-stressed rats. I. Bombesin and neuromedin B. *Exp. Toxicol. Pathol.* **1995**; 47: 31-34.
- MALOZOWSKI S, MUZZO S, BURROWS R, LEIVA L, LORIAUX L, CHROUSOS G, WINTERER J, CASSORLA F: The hypothalamic-pituitary-adrenal axis in infantile malnutrition. *Clin. Endocrinol.* **1990**; 32: 461-465.
- MANZANARES J, TONEY TW, LOOKINGLAND KJ, MOORE KE: Activation of tuberoinfundibular and tuberohypophysial dopamine neurons following intracerebroventricular administration of bombesin. *Brain Res.* **1991**; 565: 142-147.
- MANZANARES J, EDWARDS JV, LOOKINGLAND KJ, MOORE KE: MDL-101,562 blocks the stimulatory effects of bombesin and gastrin-releasing peptide on hypothalamic dopaminergic neurons. *Eur. J. Pharmacol.* **1994**; 257:199-202.

- MANZANARES J, CORCHERO J, ROMERO J, FERNÁNDEZ-RUIZ JJ, RAMOS JA, FUENTES JA: Chronic administration of cannabinoids regulates proenkephalin mRNA levels in selected regions of the rat brain. *Mol. Brain Res.* **1998**; 55: 126-132.
- MARTIN CR: *Endocrine physiology*. New York, Oxford University Press, 1985.
- MATTHEWS SG, HEAVENS RP, SIRINATHSINGHJI DJ: Cellular localization of corticotropin releasing factor mRNA in the ovine brain. *Mol. Brain Res.* **1991**; 11: 171-176.
- MATSUSHITA N, KATO Y, KATAKAMI H, SHIMATSU A, YANAIHARA N, IMURA H: Inhibition of prolactin secretion by gastrin-releasing peptide (GRP) in the rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **1983**; 172: 118-121.
- MC DONALD TJ, JÖRNVALL H, NILSSON G, VAGNE M, GHATEI M, BLOOM SR, MUTT V: Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1979**; 90: 227-233.
- MC DONALD TJ, JÖRNVALL H, GHATEI M, BLOOM SR, MUTT V: Characterization of an avian gastric (proventricular) peptide having a sequence homology with the porcine gastrin-releasing peptide and the amphibian peptides bombesin and alytesin. *FEBS Lett.* **1980**; 122: 45-48.
- MC DONALD TJ, GHATEI MA, BLOOM SR, TRACK NS, RADZIUK J, DUPRE J, MUTT V: A qualitative comparison of canine plasma gastroenteropancreatic hormone response to bombesin and the porcine gastrin-releasing peptide (GRP). *Regul. Pept.* **1981**; 2: 293-304.
- MC DONALD TJ, HOUGHTON P, CHALLIS JR, HRAMIAK IM: The effect of gastrin-releasing peptide on the endocrine pancreas. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 242-254.
- MC EWEN BS, DE KLOET ER, ROSTENE W: Adrenal steroid receptors and actions in the central nervous system. *Physiol.Rev.* **1986**; 66: 1121-1188.
- MC EWEN BS: Glucocorticoid receptors in the brain. *Hosp. Pract.* **1988**; 23:107-111,114,119-121.
- MEANEY MJ, VIAU V, AITKEN DH, BHATNAGAR S: Stress-induced occupancy and translocation on hippocampal glucocorticoid receptors. *Brain Res.* **1988**; 445: 198-203.
- MEISTER B, HÖKFELT T, GEFFARD M, OERTEL W: Glutamic acid decarboxylase-and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in corticotropin-releasing factor-containing parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* **1988**; 48: 516-526.
- MELTZER HY, TRICOU BJ, ROBERTSON A, LOWY M: Hormone response to 5-HTP. *Psychiat. Res.* **1983**; 10: 151-152.
- MELTZER HY y MAES M: Effects of buspirone on plasma prolactin and cortisol levels in major depressed and normal subjects. *Biol. Psychiat.* **1994**; 35: 316-323.
- MENDELSON JH, TEOH SK, LANGE U, MELLO NK, WEISS R, SKUPNY A, ELLINGBOE J: Anterior pituitary, adrenal and gonadal hormones during cocaine withdrawal. *Am. J. Psychiatry* **1988**; 145: 1094-1098.
- MERALI Z, JOHNSTON S, ZALCMAN S: Bombesin-induced behavioral changes: antagonism by neuroleptics. *Peptides* **1983**; 4: 693-697.
- MERALI Z, JOHNSTON S, SISTEK J: Role of dopaminergic sistem(s) in the mediation of the behavioral effects of bombesin. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1985**; 23: 243-248.
- MERALI Z, MERCHANT CA, CRAWLEY JN, COY DH, HEINZ-ERIAN P, JENSEN RT, MOODY TW: [D-Phe<sup>14</sup>] bombesin and substance P analogues function as central bombesin receptor antagonists. *Synapse* **1988a**; 2: 282-287.
- MERALI Z, MOODY T, KATEB P, PIGGINS H: Antagonism of satiety and grooming effects of bombesin by antiserum to bombesin and by [Tyr<sup>4</sup>, D-Phe<sup>12</sup>] bombesin: Central versus peripheral effects. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988b**; 547: 489-492.
- MERALI Z, MOODY TW, COY D: Blockade of brain bombesin/GRP receptors increases food intake in satiated rats. *Am. J. Physiol.* **1993**; 264: R1031-R1034.
- MERALI Z, PLAMONDON H, KENT P, BANKS K: Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist blocks

- the autonomic, endocrine, ingestive and behavioral effects of central bombesin (BN). *Soc. Neurosci. Abstr.* **1994**; 20, 1284.
- MERALI Z y BANKS K: Does the histaminergic system mediate bombesin/GRP-induced suppression of food intake?. *Am. J. Physiol.* **1994**; 267: R1589-R1595.
- MERALI Z, MC INTOSH J, KENT P, MICHAUD D, ANISMAN H: Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J. Neurosci.* **1996**; 18: 4758-4766.
- MEZEY E, REISINE TD, PALKOVITS M, BROWNSTEIN MJ, AXELROD J: Direct stimulation of beta2-adrenergic receptors in rat anterior pituitary induces the release of adrenocorticotropin in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**; 80: 6728-6731.
- MEZEY E, KISS JZ, SKIRBOLL LR, GOLDSTEIN M, AXELROD J: Increase of corticotropin-releasing factor staining in rat paraventricular nucleus neurons by depletion of hypothalamic adrenaline. *Nature* **1984**; 310: 140-141.
- MEZEY E, REISINE TD, SKIRBOLL L, BEINFELD M, KISS JZ: Cholecystokinin in the medial parvocellular subdivision of the paraventricular nucleus. *Ann. N.Y. Acad. Sci. USA* **1985**; 448: 152-156.
- MEZEY E, REISINE TD, SKIRBOLL L, BEINFELD M, KISS JZ: Role of cholecystokinin in corticotropin release: coexistence with vasopressin and corticotropin-releasing factor in cells of the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**; 83: 3510-3512.
- MIESFELD RL: Molecular genetics of corticosteroid action. *Am. Rev. Resp. Dis.* **1990**; 141: S11-S17.
- MIHARA SI, HARA M, NAKAMURA M, SAKURAWI K, TOKURA K, FUJIMOTO M, FUKAI T, NOMURA T: Non-peptide bombesin receptor antagonists, kuwanon G and H, isolated from mulberry. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**; 213: 594-599.
- MILOVANOVIC SR, RADULOVIC S, GROOT K, SCHALLY AV: Inhibition of growth of PC-82 human prostate cancer line xenografts in nude mice by bombesin antagonist RC-3095 or combinations of agonist [D-Trp<sup>6</sup>]-luteinizing-releasing hormone and somatostatin analog RC-160. *Prostate* **1992**; 20: 269-280.
- MINAMINO N, KANGAWA K, MATSUO H: Neuromedin B: A novel bombesin-like peptide identified in porcine spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1983**; 114: 541-548.
- MINAMINO N, KANGAWA K, MATSUO H: Neuromedin B is a major bombesin-like peptide in rat brain: regional distribution of Neuromedin B and Neuromedin C in rat brain, pituitary and spinal cord. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1984**; 124: 925-932.
- MITCHELL SN y THOMAS PJ: Effect of restraint stress and anxiolytics on 5-HT turnover in rat brain. *Pharmacology* **1988**; 37: 105-113.
- MITSUMA T, NOGIMORI T, CHAYA M: Bombesin inhibits thyrotrophin secretion in rats. *Acta Endocrinol. Copenh.* **1985**; 108: 79-84.
- MIZRAHI J, DIONS, D'ORLÉANS-JUSTE P, REGOLI D: Activities and antagonism of bombesin on urinary smooth muscles. *Eur. J. Pharmacol.* **1985**; 111: 339-345.
- MOCCHETTI I, GUIDOTTI A, SCHWARTZ JP, COSTA E: Reserpine changes the dynamic state of enkephalin stores in rat striatum and adrenal medulla by different mechanisms. *J. Neurosci.* **1985**; 5: 3379-3385.
- MOGHIMZADEH E, EKMAN R, HÅKANSON R, YANAIHARA N, SUNLER F: Neuronal gastrin-releasing peptide in the mammalian gut and pancreas. *Neuroscience* **1983**; 10: 553-563.
- MONTMINY MR, GONZALEZ GA, YAMAMOTO KK: Regulation of c-AMP-inducible genes by CREB. *Trends Neurosci.* **1990**; 13: 184-188.
- MOODY TW, PERT CB, RIVIER J, BROWN MR: Bombesin specific binding to rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1978**; 75: 5372-5376.
- MOODY TW, O'DONOHUE TL, JACOBOWITZ DM: Biochemical localization and characterization of

- bombesin-like peptides in discrete regions of rat brain. *Peptides* **1981**; 2: 75-79.
- MOODY TW, CRAWLEY JN, JENSEN RT: Pharmacology and neurochemistry of bombesin-like peptides. *Peptides* **1982**; 3: 559-563.
- MOODY TW, CARNEY DN, CUTTITA F, QUATTROCHI K, MINNA JN: High affinity receptors for bombesin/GRP on human small cell lung cancer. *Life Sci.* **1985**; 37: 105-113.
- MOODY TW, GETZ R, O'DONOHUE TL, ROSENSTEIN JM: Localization of receptors for bombesin-like peptides in the rat brain. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 114-130.
- MOORE RY y CARD JP: Visual pathways and the entrainment of circadian rhythms. *Ann. NY Acad. Sci.* **1985**; 453: 123-133.
- MORAN TH, MOODY TW, HOSTETLER AM, ROBINSON PH, GOLDRICH M, MC HUGH PR: Distribution of bombesin binding sites in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* **1988**; 9: 643-649.
- MORGAN JI y CURRAN T: Stimulus-transcription coupling in the nervous system: involvement of the inducible proto-oncogenes fos and jun. *Annu. Rev. Neurosci.* **1991**; 14: 421-451.
- MORITA TM, IMAI T, MURATA Y, KAMBE F, FUNAHASHI H, TAGAKI H, SEO H: Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) increases the expression of its own receptor gene. *Endocr. J.* **1995**; 42: 475-480.
- MORLEY JE, VARNER AA, MODLIN IM, CARLSON HE, BRAUNSTEIN GD, WALSH JH, HERSHMAN JM: Failure of bombesin to alter anterior pituitary hormone secretion in man. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* **1980**; 13: 369-373.
- MORLEY JE y LEVINE AS: Bombesin inhibits stress induced-eating. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **1981**; 14: 149-151.
- MORLEY JE, LEVINE AS, MURRAY SS, KNEIP J, GRACE M: Peptidergic regulation of stress-induced eating. *Am. J. Physiol.* **1982**; 243: R159-R163.
- MOTAMEDI F, RASHIDY-POUR A, ZARINDAST MR, BADAVIDI M: Bombesin-induced anorexia requires central bombesin receptor activation: independence from interaction with central catecholaminergic systems. *Psychopharmacology* **1993**; 110: 193-197.
- MOURA EG, SANTOS CV, SANTOS RM, PAZOS-MOURA CC: Interaction between substance P and gastrin-releasing peptide on thyrotropin secretion by rat pituitary in vitro. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **1999**; 32: 1155-1160.
- MUIR JG y MURRAY AW: Bombesin and phorbol ester stimulate phosphatidylcholine hydrolysis by phospholipase C: evidence for a role of protein kinase C. *J. Cell. Physiol.* **1987**; 130: 382-391.
- MUKAI H, KAWAI K, SUZUKI S, YAMASHITA K, MUNEKATA E: Antagonism by GRP (18-27) and substance P analogues on insulin release stimulated by GRP (18-27). *Peptides* **1990**; 11: 173-175.
- MUNCK A, MENDEL DB, SMITH LI, ORTI E: Glucocorticoid receptors and actions. *Am. Rev. Resp. Dis.* **1990**; 141: S2-S10.

## N

---

- NAGALLA SR, BARRY BJ, CRESWICK KC, EDEN P, TAYLOR JT, SPINDEL ER: Cloning of a receptor for amphibian [Phe<sup>12</sup>] bombesin distinct from the receptor for gastrin-releasing peptide: identification of a four bombesin receptor subtype (BB4). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1995**; 92: 6205-6209.
- NAKAGAMI Y, SUDA T, YAJIMA F, USHIYAMA T, TOMORI N, SUMITOMO T, DEMURA H, SHIZUME K: Effects of serotonin, cyproheptadine and reserpine on corticotropin-releasing factor release from rat hypothalamus in vitro. *Brain Res.* **1986**; 386: 232-236.
- NAKANE T, AUDHYA T, KANI N, HOLLANDER CS: Evidence for a role of endogenous corticotropin-releasing factor in cold, ether, immobilization and traumatic stress. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* **1985**; 82: 1247-1251.

- NAKANO I, MIYAZAKI K, FUNAKOSHI A, TATEISHI K, HAMAOKA T, YAJIMA H: Gastrin-releasing peptide stimulates cholecystokinin secretion in perfused rat duodenum. *Regul. Pept.* **1988**; 23: 153-159.
- NARANJO JR, MOCCHETTI I, SCHWARTZ JP, COSTA E: Permissive effect of dexamethasone on the increase of proenkephalin mRNA induced by depolarization of chromaffin cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **1986**; 83: 1513-1517.
- NAYLOR SL, SAKAGUCHI AY, SPINDEL ER, CHIN WW: Human gastrin-releasing peptide is located on chromosome 18. *Somat. Cell. Molec. Genet.* **1987**; 13:87-91.
- NICHOLLS DP, RILEY M, ELBORN JS, STANFORD CF, SHAW C, MC KILLOP JM, BUCHANAN KD: Regulatory peptides in the plasma of patients with chronic cardiac failure at rest and during exercise. *Eur. Heart J.* **1992**; 13: 1399-1404.
- NICHOLSON SA, ADRIAN TE, BACARESE-HAMILTON AJ, GILLHAM B, JONES MT, BLOOM SR: 24-hour variation in content and release of hypothalamic neuropeptides in the rat. *Regul. Pept.* **1983**; 7: 385-397.
- NIKOLARAKIS KE, ALMEIDA OF, HERTZ A: Stimulation of hypothalamic, beta-endorphin and dynorphin release by corticotropin-releasing factor (in vitro). *Brain Res.* **1986**; 399: 152-155.
- NISHI S, SEINO Y, TAKEMURA J, ISHIDA H, SENO M, CHIBA T, YANAIHARA C, YANAIHARA N, JMURA H: Vagal regulation of GRP, gastric somatostatin, and gastrin secretion in vitro. *Am. J. Physiol.* **1985**; 248: E425-E431.

## O

---

- OHKI-HAMAZAKI H, WATASE K, YAMAMOTO K, OGURA H, YAMANO M, YAMADA K, MAENO H, IMAKI J, KIKUYAMA S, WADA E, WADA K: Mice lacking bombesin-receptor subtype-3 develop metabolic defects and obesity. *Nature* **1997**; 390: 165-169.
- O'KEANE V y DINAN TG: Prolactin and cortisol responses to D-fenfluramine in major depression: evidence for diminished responsivity of central serotonergic function. *Am. J. Psychiatry.* **1991**; 148: 1009-1015.
- OLSEN L, KNIGGE U, WARBERG J: Gastrin-releasing peptide stimulation of corticotropin secretion in male rats. *Endocrinology* **1992** ;130:2710-6
- ONO N, LUMPKIN MD, SAMSON WK, MC DONALD JK, MC CANN SM: Intrahypothalamic action of corticotrophin-releasing factor (CRF) to inhibit growth hormone and LH release in the rat. *Life Sci.* **1984**; 35:1117-1123.
- ONO N, BEDRAN DE CASTRO JC, MC CANN SM: Ultrashort-loop positive feedback of corticotropin (ACTH)-releasing factor to enhance ACTH in stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985a**; 82: 3528-3531.
- ONO N, SAMSON WK, MC DONALD JK, LUMPKIN MD, BEDRAN DE CASTRO JC, MC CANN SM: Effects of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin-releasing factor on the secretion of anterior pituitary hormones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985b**; 82: 7787-7790.
- ORLOFF MS, REEVE JR Jr, BEN AVRAM CM, SHIVELY JE, WALSH JH: Isolation and sequence analyses of human bombesin-like peptides. *Peptides* **1984**; 5: 865-870.
- ORTH DN, JACKSON RV, DECHERNEY GS, DE BOLD CR, ALEXANDER AN, ISLAND DP, RIVIER J, RIVIER C, SPIESS J, VALE W: Effect of synthetic ovine corticotropin-releasing factor. Dose response of plasma adrenocorticotropin and cortisol. *J. Clin. Invest.* **1983**; 71: 587-595.
- ORTH DN, DE BOLD CR, DE CHERNEY GS, JACKSON RV, SHELDON WR Jr, NICHOLSON WE, UDERMAN H, ALEXANDER AN, ISLAND DP, RIVIER J, VALE WW: Clinical studies with syntetic ovine corticotropin-releasing factor. *Fed. Proc.* **1985**; 44: 197-202.

**P**

- PALKOVITS M: Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res.* **1973**; 59: 449-450.
- PALKOVITS M y ESKAY RL: Distribution and possible origin of beta-endorphin and ACTH in discrete brainstem nuclei of rats. *Neuropeptides* **1987**; 9: 123-137.
- PANULA P, YANG HY, COSTA E: Neuronal location of bombesin-like immunoreactivity in the central nervous system of the rat. *Regulat. Pept.* **1982**; 4: 275-283.
- PANULA P, YANG HY, COSTA E: Comparative distribution of bombesin/GRP- and substance P-like immunoreactivities in rat hypothalamus. *J. Comp. Neurol.* **1984**; 224: 606-617.
- PANULA P, NIEMINEN O, AUVINEN S, FALKENBERG M, VIRKAMÄKI A, KIVIPELTO L: Distribution of bombesin-like immunoreactivity in the rat brain and spinal cord. *Regul. Pept.* **1987**; 19: p. 131.
- PANULA P, NIEMINEN O, FALKENBERG M, AUVINEN S: Localization and development of bombesin/GRP-like immunoreactivity in the rat central nervous system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 54-69.
- PAPPAS T, HAMEL D, DEBAS H, WALSH J, TACHÉ Y: Spantide: failure to antagonize bombesin-induced stimulation of gastric secretion in dogs. *Peptides* **1985**; 6: 1001-1003.
- PARKES D, RIVEST S, LEE S, RIVIER C, VALE W: Corticotropin-releasing factor activates c-fos, NGFI-B, and corticotropin-releasing factor gene expression within the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Mol. Endocrinol.* **1993**; 7: 1357-1367.
- PAXINOS G y WATSON C: *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press Australia, **1986**.
- PELLETIER G: Regulation of proopiomelanocortin gene expression in rat brain and pituitary as studied by in situ hybridization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1993**; 680: 246-259.
- PERKINS SN, EVANS WS, THORNER MO, GIBBS DM, CRONIN MJ: Alfa-adrenergic binding and secretory responses of the anterior pituitary. *Endocrinology* **1985**; 117: 1818-1825.
- PERRIN MH, HAAS Y, RIVIER JE, VALE WW: Corticotropin-releasing factor binding to the anterior pituitary receptor is modulated by divalent cations and guanyl nucleotides. *Endocrinology* **1986**; 118: 1171-1179.
- PERT A, MOODY TW, PERT CB, DEWALD LA, RIVIER J: Bombesin: receptor distribution in brain and effects on nociception and locomotor activity. *Brain Res.* **1980**; 193: 209-220.
- PETERSEN SL, HARTMAN RD, BARRACLOUGH CA: An analysis of serotonin secretion in hypothalamic regions based on 5-hydroxytryptophan accumulation or push-pull perfusion. Effects of mesencephalic raphe or locus coeruleus stimulation and correlated changes in plasma luteinizing hormone. *Brain Res.* **1989**; 495:9-19.
- PETTERSSON M y AHREN B: Gastrin-releasing peptide (GRP): effects on basal and stimulated insulin and glucagon secretion in the mouse. *Peptides* **1987**; 8: 55-60.
- PETTERSSON M y AHREN B: Insulin and glucagon secretion in the rat: effects of gastrin releasing peptide. *Neuropeptides* **1988**; 12: 159-163.
- PICH EM, LORANG M, YEGANEH M, RODRIGUEZ DE FONSECA F, RABER J, KOOB GF, WEISS F: Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis. *J. Neurosci.* **1995**; 15: 5439-5447.
- PIEKUT DT y JOSEPH SA: Co-existence of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular paraventricular nucleus of rat hypothalamus. *Peptides* **1986**; 7: 891-898.
- PIEZZI RS y WURTMAN RJ: Pituitary serotonin content: effects on melatonin or deprivation of water. *Science* **1970**; 169: 285-286.
- PIGGINS H y MERALI Z: The effects of concurrent D-1 and D-2 dopamine receptor blockade with SCH 23390 and eticlopride, on bombesin-induced behaviors. *Prog. Neuropsychopharmacol. & Biol. Psychiatry*

1989; 13: 583-594.

PINNOCK RD y WOODRUFF GN: Bombesin excites a subpopulation of 5-hydroxytryptamine sensitive neurones in the rat dorsal raphe nucleus in vitro. *J. Physiol. (Lond)* **1991**; 440: 55-65.

PINSKI J, YANO T, SCHALLY AV: Inhibitory effects of the new bombesin receptor antagonist RC-3095 on the luteinizing hormone release in rats. *Neuroendocrinology* **1992a**; 56: 831-837.

PINSKI J, YANO T, GROOT K, CAI RZ, RADULOVIC S, SCHALLY AV: Endocrine effects of new bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists in rats. *Am. J. Physiol.* **1992b**; 263: E712-E717.

PINSKI J, SCHALLY AV, HALMOS G, SZEPESHAZI K: Effect of somatostatin analog RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of PC-3 human prostate-cancer xenografts in nude mice. *Int. J. Cancer* **1993**; 55: 963-967.

PINSKI J, SCHALLY AV, HALMOS G, SZEPESHAZI K, GROOT K, O'BYRNE K, CAI RZ: Effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonists on the growth of human small-cell and non-small-cell lung carcinomas in nude mice. *Br. J. Cancer* **1994a**; 70: 886-892.

PINSKI J, HALMOS G, YANO T, SZEPESHAZI K, QIN Y, ERTL T, SCHALLY AV: Inhibition of growth of MKN45 human gastric carcinoma xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist (RC-3095) and somatostatin analogue RC-160. *Int. J. Cancer* **1994b**; 57: 574-580.

PINSKI J, REILE H, HALMOS G, GROOT K, SCHALLY AV: Inhibitory effects of somatostatin analogue RC-160 and bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 on the growth of the androgen-independent Dunning R-3327-AT-1 rat prostate cancer. *Cancer Res.* **1994c**; 54: 169-174.

PLAMONDON H y MERALI Z: Push-pull perfusion reveals meal-dependent changes in the release of bombesin-like peptides in the rat paraventricular nucleus. *Brain Res.* **1994**; 668: 54-61.

PLAMONDON H, MOODY TW, MERALI Z: Central infusion of neuromedin B and gastrin-releasing peptide receptor antisense oligonucleotide reduce anxiety, bombesin (BN) binding and bombesin elicited behaviors. *Soc. Neurosci. Abstr.* **1996**; 22, 456.

PLAMONDON H y MERALI Z: Anorectic action of bombesin requires receptor for corticotropin-releasing factor but not for oxytocin. *Eur. J. Pharmacol.* **1997**; 340: 99-109.

PLOTSKY PM y VALE W: Hemorrhage-induced secretion of corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity into the rat hypophysial portal circulation and its inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology* **1984**; 114:164-169.

PLOTSKY PM, BRUHN TO, VALE W: Hypophysiotropic regulation of adrenocorticotropin secretion in response to insulin-induced hypoglycemia. *Endocrinology* **1985**; 117: 323-329.

PLOTSKY PM: Facilitation of immunoreactive corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial portal circulation after activation of catecholaminergic pathways or central norepinephrine injection. *Endocrinology* **1987**; 121:924-930.

PLOTSKY PM, OTTO S, SUTTON S: Neurotransmitter modulation of corticotropin-releasing factor secretion into the hypophysial-portal circulation. *Life Sci.* **1987**; 41: 1311-1317.

POLAK JM, BLOOM SR, HOBBS S, SOLCIA E, PEARSE AG: Distribution of a bombesin-like peptide in human gastrointestinal tract. *Lancet* **1976**; 1: 1109-1110.

PONTIROLI AE, ALBERETTO M, RESTELLI L, FACCHINETTI A: Effect of bombesin and ceruletide on prolactin, growth hormone, luteinizing hormone and parathyroid hormone release in normal human males. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1980**; 51: 1303-1305.

PONTIROLI AE y SCARPIGNATO C: Effect of bombesin on basal and stimulated secretion of some pituitary hormones in humans. *Horm. Res.* **1986**; 23: 129-135.

PORRECA F, BURKS TF, SHELDON RJ: Central and peripheral visceral effects of bombesin. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 194-203.

POTTER E, SUTTON S, DONALDSON C, CHEN R, PERRIN M, LEWIS K, SAWCHENKO PE, VALE W: Distribution of corticotropin-releasing factor receptor mRNA expression in the rat brain and pituitary.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**; 91: 8777-8781.

PRICE J, PENMAN E, WASS JA, REES LH: Bombesin-like immunoreactivity in human gastrointestinal tract. *Regulat. Pept.* **1984**; 9: 1-10.

PRIEST CA, ECKERSELL CB, MICEVYCH PE: Estrogen regulates preproenkephalin-A mRNA levels in the rat ventromedial nucleus: temporal and cellular aspects. *Mol. Brain Res.* **1995**; 28: 251-262.

PRIEST CA, BORSOOK D, PFAFF DW: Estrogen and stress interact to regulate the hypothalamic expression of a human proenkephalin promoter-beta-galactosidase fusion gene in a site-specific and sex specific manner. *J. Neuroendocrinol.* **1997**; 9: 317-326.

## Q

---

QIN Y, ERTL T, CAI RZ, HALMOS G, SCHALLY AV: Inhibitory effect of bombesin receptor antagonist RC-3095 on the growth of human pancreatic cancer cells in vivo and in vitro. *Cancer Res.* **1994a**; 54: 1035-1041.

QIN Y, HALMOS G, CAI RZ, SZOKE B, ERTL T, SCHALLY AV: Bombesin antagonists inhibit in vitro and in vivo growth of human gastric cancer and binding of bombesin to its receptors. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1994b**; 120: 519-528.

QIN Y, ERTL T, CAI RZ, HORVATH JE, GROOT K, SCHALLY AV: Antagonists of bombesin/gastrin-releasing peptide inhibit growth of SW-1990 human pancreatic adenocarcinoma and production of cyclic AMP. *Int. J. Cancer* **1995**; 63: 257-262.

## R

---

RAADSHEER FC, HOOGENDIJK WJ, STAM FC, TILDERS FJ, SWAAB DF: Increased numbers of corticotropin-releasing hormone expressing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of depressed patients. *Neuroendocrinology* **1994**; 60: 436-444.

RABIN D, SCHMIDT PJ, CAMPBELL G, GOLD PW, JENSVOLD M, RUBINOW DR, CHROUSOS GP: Hypothalamic-pituitary-adrenal function in patients with the premenstrual syndrome. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1990**; 71: 1158-1162.

RADULOVIC S, MILLER G, SCHALLY AV: Inhibition of growth of HT-29 human colon cancer xenografts in nude mice by treatment with bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist (RC-3095). *Cancer Res.* **1991**; 51: 6006-6009.

RADULOVIC S, SCHALLY AV, REILE H, HALMOS G, SZEPESHAZI K, GROOT K, MILOVANOVIC S, MILLER G, YANO T: Inhibitory effects of bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) and somatostatin analog (RC-160) on growth of HT-29 human colon cancers in nude mice. *Acta Oncol.* **1994**; 33: 693-701.

RAMACHANDRAN J, TSUBOKAWA M, GOHIL K: Corticotropin receptors. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1987**; 512: 415-425.

RATKA A, SUTANTO W, BLOEMERS M, DE KLOET ER: On the role of brain mineralocorticoid (type I) and glucocorticoid (type II) receptors in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* **1989**; 50: 117-123.

RAYMOND V, LEUNG PC, VEILLEUX R, LABRIE F: Vasopressin rapidly stimulates phosphatidic-acid phosphatidylinositol turnover in rat anterior pituitary cells. *FEBS Lett.* **1985**; 182: 196-200.

REEVE JR Jr, WALSH JH, CHEW P, CLARK B, HAWKE D, SHIVELY JE: Amino acid sequences of three bombesin-like peptides from canine intestine extracts. *J. Biol. Chem.* **1983**; 258: 5582-5588.

REISINE Ty JENSEN R: Cholecystokinin-8 stimulates adrenocorticotropin release from anterior pituitary cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1986**; 23: 621-626.

REUL JM y DE KLOET ER: Two receptor system for corticosterone in rat brain: microdistribution and differential occupation. *Endocrinology* **1985**; 117: 2505-2511.

- REUL JM, VAN DEN BOSCH FR, DE KLOET ER: Differential response of type I and type II corticosteroid receptors to changes in plasma steroid levels and circadian rhythmicity. *Neuroendocrinology* **1987**; 45: 407-412.
- RICHARDS JG, SAURA J, ULRICH J, DA PRADA M: Molecular neuroanatomy of monoamine oxidases in human brainstem. *Psychopharmacology* **1992**; 106:521-523.
- RICHE D, DE POMMERY J, MENETREY D: Neuropeptides and catecholamines in efferent projections of the nuclei of the solitary tract in the rat. *J. Comp. Neurol.* **1990**; 293: 399-424.
- RIVIER JE y BROWN MR: Bombesin, bombesin analogues and related peptides: effects on thermoregulation. *Biochemistry* **1978**; 17: 1766-1771.
- RIVIER C y VALE W: Modulation of stress-induced ACTH release by corticotropin-releasing factor, catecholamines and vasopressin. *Nature* **1983a**; 305: 325-327.
- RIVIER C y VALE W: Interaction of corticotropin-releasing factor and arginine-vasopressin on adrenocorticotropin secretion in vivo. *Endocrinology* **1983b**; 113: 939-942.
- RIVIER C y VALE W: Influence of corticotropin-releasing-factor on reproductive functions in the rat. *Endocrinology* **1984a**; 114: 914-921.
- RIVIER C y VALE W: Corticotropin-releasing factor acts centrally to inhibit growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **1984b**; 114: 2409-2411.
- RIVIER C y VALE W: Involvement of corticotropin-releasing factor and somatostatin in stress-induced inhibition of growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **1985a**; 117: 2478-2482.
- RIVIER C y VALE W: Effects of corticotropin-releasing factor, neurohypophyseal peptides, and catecholamines on pituitary function. *Fed. Proc.* **1985b**; 44: 189-195.
- RIVIER CL y PLOTSKY PM: Mediation by corticotropin-releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* **1986**; 48: 475-494.
- RIVIER C y LEE S: Stimulatory effect of cocaine on ACTH secretion: role of the hypothalamus. *Mol. Cell. Neurosci.* **1994**; 5: 189-195.
- RIVIER C, RIVIER J, VALE W: The effect of bombesin and related peptides on prolactin and growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* **1978**; 102: 519-522.
- RIVIER C, BROWNSTEIN M, SPIESS J, RIVIER J, VALE W: In vivo corticotropin-releasing factor-induced secretion of adrenocorticotropin, beta-endorphin, and corticosterone. *Endocrinology* **1982a**; 110: 272-278.
- RIVIER C, RIVIER J, VALE W: Inhibition of adrenocorticotropin hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science* **1982b**; 218: 377-379.
- RIVIER C, BRUHNT, VALE W: Effect of ethanol on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat: role of corticotropin-releasing factor (CRF). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1984a**; 229: 127-131.
- RIVIER J, RIVIER C, VALE W: Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effects on ACTH secretion in the rat. *Science* **1984b**; 224: 889-891.
- RIVIER C, IMAKI T, VALE W: Prolongued exposure to alcohol: effect on CRF mRNA levels, and CRF-and stress-induced ACTH secretion in the rat. *Brain Res.* **1990**; 520: 1-5.
- RODRIGUEZ DE FONSECA F, RUBIO P, MENZHAGHI F, MERLO-PICH E, RIVIER J, KOOB GF, NAVARRO M: Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist [D-Phe<sup>12</sup>, Nie<sup>21,38</sup>, C<sup>49</sup>MeLeu<sup>47</sup>] CRF attenuates the acute actions of the highly potent cannabinoid receptor agonist HU-210 on defensive withdrawal behavior in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1996**; 276: 56-64.
- RODRIGUEZ DE FONSECA F, CARRERA MRA, NAVARRO M, KOOB GF, WEISS F: Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* **1997**; 276: 2050-2054.
- ROMANO GJ, SHIVERS BD, HARLAN RE, HOWELLS RD, PFAFF DW: Haloperidol increases proenkephalin mRNA levels in the caudate-putamen of the rat: a quantitative study at the cellular level

using in situ hybridization. *Brain Res.* **1987**; 388: 33-41.

ROMANO GJ, MOBBS CV, HOWELLS RD, PFAFF DW: Estrogen regulation of proenkephalin gene expression in the ventromedial hypothalamus of the rat: temporal qualities and synergism with progesterone. *Mol. Brain Res.* **1989**; 5: 51-58.

ROMIJN HJ, SLUITER AA, POOL CW, WORTEL J, BUIJS RM: Differences in colocalization between Fos and PHL, GRP, VIP and VP in neurons of the rat suprachiasmatic nucleus after a light stimulus during the phase delay versus the phase advance period of the night. *J. Comp. Neurol.* **1996**; 372: 1-8.

ROSEN JB, CAIN CJ, WEISS SR, POST RM: Alterations in mRNA of enkephalin, dynorphin and thyrotropin releasing hormone during amygdala kindling: an in situ hybridization study. *Mol. Brain Res.* **1992**; 15: 247-255.

ROSSOWSKY WJ, MURPHY WA, JIANG NY, YEGINSU O, ERTAN A, COY DH: Effects of a novel bombesin antagonist analogue on bombesin-stimulated gastric acid secretion and growth hormone release in the pentobarbital anesthetized rat. *Scand. J. Gastroenterol.* **1989**; 24: 121-128.

ROTH KA, KATZ RJ, SIBEL M, MEFFORD IN, BARCHAS JD, CARROLL BJ: Central epineuric inhibition of corticosterone release in rat. *Life Sci.* **1981**; 28: 2389-2394.

ROTH K, WEBER E, BARCHAS JD: Distribution of gastrin-releasing peptide-bombesin-like immunostaining in rat brain. *Brain Res.* **1982**; 251: 277-282.

ROTH RH, TAM SY, IDA Y, YANG JX, DEUTCH AY: Stress and the mesocorticolimbic dopamine systems. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 537: 138-147.

ROUISSI N, RHALEB NE, NANTEL F, DION S, DRAPEAU G, REGOLI D: Characterization of bombesin receptors in peripheral contractile organs. *Br. J. Pharmacol.* **1991**; 103: 1141-1147.

ROY-BYRNE PP, UHDE TW, POST RM, GALLUCI W, CHROUSOS GP, GOLD PW: The corticotropin-releasing hormone stimulation test in patients with panic disorder. *Am. J. Psychiatr.* **1986**; 143: 896-899.

## S

---

SAARI WS, HEIMBROOK DC, FRIEDMAN A, FISCHER TW, OLIFF A: A gastrin-releasing peptide antagonist containing a  $\psi$  (CH<sub>2</sub>O) amide bond surrogate. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1989**; 165: 114-117.

SAAVEDRA JM, PALKOVITS M, KIZER JS, BROWNSTEIN M, ZIVIN JA: Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland. *J. Neurochem.* **1975**; 25: 257-260.

SABOL SL: Storage and secretion of beta-endorphin and related peptides by mouse pituitary tumor cells: regulation by glucocorticoids. *Arch. Biochem. Biophys.* **1980**; 203: 37-48.

SAEED ZA, HUANG SC, COY DH, JIANG NY, HEINZ-ERIAN P, MANTEY S, GARDNER JD, JENSEN RT: Effect of substitution in position 12 of bombesin on antagonist activity. *Peptides* **1989**; 10: 597-603.

SAFFRAN M y SCHALLY AV: The release of corticotropin by anterior pituitary tissue in vivo. *Can. J. Biochem. Physiol.* **1955**; 33: 408-415.

SAIZ RUIZ J, CARRASCO PERERA JL, HERNANZ A: Plasma neuropeptides and anxiety disorders. *Arch. Neurobiol. (Madr)* **1992**; 55: 1-5.

SAKANAKA M, MAGARI S, SHIBASAKI T, INOUE N: Co-localization of corticotropin-releasing factor and enkephalin-like immunoreactivities in nerve cells of the rat hypothalamus and adjacent areas. *Brain Res.* **1989**; 487: 357-362.

SANDER LD y PORTER JR: Influence of bombesin, CCK, secretin and CRF on corticosterone concentration in the rat. *Peptides* **1988**; 9: 113-117.

SANDER LD y THOMAS RM: Gastrin-releasing peptide, but not pentagastrin, stimulates ACTH and cortisol secretion in conscious dogs. *Regul. Pept.* **1991**; 35: 127-133.

- SANTOS CV, PAZOS-MOURA CC, MOURA EG: Effect of gastrin-releasing peptide (GRP) and GRP antagonist on TSH secretion from rat isolated pituitaries. *Life Sci.* **1995**; 57: 911-915.
- SAPHIER D y FELDMAN S: Paraventricular nucleus neuronal responses following electrical stimulation of the midbrain dorsal raphe; evidence for cotransmission. *Exp. Brain Res.* **1989**; 78: 407-414.
- SAPHIER D y WELCH JE: Effects of the serotonin <sub>1A</sub> agonist, 8-hydroxi-2-(di-n-proylamino) tetralin on neurochemical responses to stress. *J. Neurochem.* **1995**; 64: 767-776.
- SAPOLSKY RM, KREY LC, MC EWEN BS: Glucocorticoid-sensitive hippocampal neurons are involved in terminating the adrenocortical stress response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**; 81: 6174-6177.
- SARKAR DK: Does LH-RH meet the criteria for a hypothalamic releasing factor? *Psychoneuroendocrinology* **1983**; 8: 259-275.
- SAUSVILLE EA, LEBACQ-VERHEYDEN AM, SPINDEL ER, CUTTITTA F, GAZDAR AF, BATTEY JF: Expression of the gastrin-releasing peptide gene in human small cell lung cancer. *J. Biol. Chem.* **1986**; 261: 2451-2457.
- SAWCHENKO PE, SWANSON LW, STEINBUSH HW, VERHOFSTAD AA: The distribution and cells of origin of serotonergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat. *Brain Res.* **1983**; 277: 355-360.
- SAWCHENKO PE, SWANSON LW, VALE WW: Coexpression of corticotropin-releasing factor and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurosecretory neurons of the adrenalectomized rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984a**; 81: 1883-1887.
- SAWCHENKO PE, SWANSON LW, VALE WW: Corticotropin-releasing factor: co-expression with distinct subsets of oxytocin-, vasopressin-, and neurotensin-immunoreactive neurons in the hypothalamus of the male rat. *J. Neurosci.* **1984b**; 4: 1118-1129.
- SCACCIANOCE S, NAVARRA D, DI SCIULLO A, ANGELUCCI L, ENDRÖCZI E: Adenosine and pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. *Neuroendocrinology* **1989**; 50: 464-468.
- SCACCIANOCE S, DI SCIULLO A, ANGELUCCI L: Age-related changes in hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat. In vitro studies. *Neuroendocrinology* **1990**; 52: 150-155.
- SCACCIANOCE S, CIGLIANA G, NICOLAI R, MUSCOLO LA, PORCU A, NAVARRA D, PEREZ-POLO JR, ANGELUCCI L: Hypothalamic involvement in the activation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor. *Neuroendocrinology* **1993**; 58: 202-209.
- SCAPAGNINI U y NISTICO G: Serotonergic involvement in the regulation of circadian rhythms of hypothalamic-pituitary-adrenal and prolactin axis. *Ann. Ist. Super. Sanità* **1978**; 14: 163-172.
- SCARPIGNATO C, GIOFFRE M, MICALI B: Effect of bombesin on glucose-induced insulin release in humans. *Digestion* **1987**; 37: 114-124.
- SCARPIGNATO C, GIOFFRE M, GULINO FM, MICALI B: Different effects of bombesin on glucose-and tolbutamide-induced insulin release in man. *Br. J. Pharmacol.* **1988**; 94: 1023-1028.
- SCARPIGNATO C, VARGA G, DOBRONYI I, PAPP M: Effect of a new potent CCK antagonist, lorglumide, on carulein-and bombesin-induced pancreatic secretion and growth in the rat. *Br. J. Pharmacol.* **1989**; 96: 661-669.
- SCHACHTER BS, JOHNSON LK, BAXTER JD, ROBERTS JL: Differential regulation by glucocorticoids of proopiomelanocortin mRNA levels in the anterior and intermediate lobes of the rat pituitary. *Endocrinology* **1982**; 110: 1442-1444.
- SCHAFFER K, HERRMUTH H, MUELLER J, COY DH, WONG HC, WALSH JH, CLASSEN M, SCHUSDZIARRA V, SCHEPP W: Bombesin-like peptides stimulate somatostatin release from rat fundic D cells in primary cultures. *Am. J. Physiol.* **1997**; 273: G686-G695.
- SCHUBERT ML, JONG MJ, MAKHLOUF GM: Bombesin/GRP-stimulated somatostatin secretion is mediated by gastrin in the antrum and intrinsic neurons in the fundus. *Am. J. Physiol.* **1991**; 261: G885-G889.

- SEASHOLTZ AF, THOMPSON RC, DOUGLASS JO: Identification of a cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the rat corticotropin releasing hormone gene. *Mol. Endocrinol.* **1988**; 2: 1311-1319.
- SEVERI C, COY DH, JENSEN RT, BOSCHERO L, ANANIA MC, DELLE FAVE G: Pharmacological characterization of (Leu-<sup>14</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu-<sup>14</sup>) Bombesin as a specific bombesin receptor antagonist on isolated smooth muscle cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1989**; 251:713-717.
- SCHULZ DW, MANSBACH RS, SPROUSE J, BRASELTON JP, COLLINS J, CORMAN M, DUNAISKIS A, FARACI S, SCHMIDT AW, SEEGER T, SEYMOUR P, TINGLEY FD 3rd, WINSTON EN, CHEN YL, HEYM J: CP-154,526: a potent and selective nonpeptide antagonist of corticotropin releasing factor receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **1996**; 93:10477-10482.
- SHIMIZU N, OOMURA Y, AOYAGI K: Electrochemical analysis of hypothalamic serotonin metabolism accompanied by immobilization stress in rats. *Physiol. Behav.* **1989**; 46: 829-834.
- SHIMIZU N, TAKE S, HORI T, OOMURA Y: In vivo measurement of hypothalamic serotonin release by intracerebral microdialysis: significant enhancement by immobilization stress in rats. *Brain Res. Bull.* **1992**; 28: 727-734.
- SHIMOSEGAWA T, ASAKURA T, KASHIMURA J, YOSHIDA K, MEGURO T, KOIZUMI M, MOCHIZUKI T, YANAIHARA N, TOYOTA T : Neurons containing gastrin releasing peptide-like immunoreactivity in the human pancreas. *Pancreas* **1993**; 8:403-12.
- SHIODA S, NAKAI Y, KITAZAWA S, SUNAYAMA H: Immunocytochemical observations of corticotropin-releasing factor containing neurons in the rat hypothalamus with special reference to neuronal communication. *Acta Anat. (Basel)* **1985**; 124: 58-64.
- SHIRAHIGE Y, CAI RZ, SZEPESHAZI K, HALMOS G, PINSKI J, GROOT K, SCHALLY AV: Inhibitory effect of bombesin/gastrin-releasing peptide (GRP) antagonists RC-3950 II and RC-3095 on MCF-7 MII human breast cancer xenografts in nude mice. *Biomed. Pharmacother.* **1994**; 48: 465-472.
- SIEVER LJ, MURPHY DL, SLATER S, DE LA VEGA E, LIPPER S: Plasma prolactin changes following fenfluramine in depressed patients compared to controls: an evaluation of central serotonergic responsivity in depression. *Life Sci.* **1984**; 34: 1029-1039.
- SINGH B, CORLEY KC, PHAN TH, BOADLE-BIBER MC: Increase in rat cortical and midbrain tryptophan hydroxylase by intracerebroventricular infusion of corticotropin-releasing factor. *FASEBJ.* **1989**; 3: 2977 Abst.
- SIRINATHSINGHJI DJ y HEAVENS RP: Stimulation of GABA release from the rat neostriatum and globus pallidus in vivo by corticotropin-releasing factor. *Neurosci. Lett.* **1989**; 100: 203-209.
- SIRINATHSINGHJI DJ, NIKOLARAKIS KE, HERZ A: Corticotropin-releasing factor stimulates the release of methionine-enkephalin and dynorphin from the neostriatum and globus pallidus of the rat: in vitro and in vivo studies. *Brain Res.* **1989**; 490: 276-291.
- SJOVALL M, HOLST JJ, OLBE L, LUNDELL L: Somatostatin release induced by gastrin-releasing peptide in man. Effect of proximal gastric vagotomy and cholinergic blockade. *Regul. Pept.* **1990**; 29: 133-141.
- SLEIGHT AJ, BOESS FG, BOS M, BOURSON A: The putative 5-HT<sub>6</sub> receptor: localization and function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1998**; 861:91-96.
- SOBEL D y VAGNUCCI A: Angiotensin II mediated ACTH release in rat pituitary cell culture. *Life Sci.* **1982**; 30: 1281-1286.
- SONNENBERG JL, RAUSCHER FJ 3d, MORGAN JI, CURRAN T: Regulation of proenkephalin by Fos and Jun. *Science* **1989**; 246:1622-1625.
- SPIESS J, RIVIER J, RIVIER C, VALE W: Primary structure of corticotropin-releasing factor from ovine hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1981**; 78: 6517-6521.
- SPINDEL ER, CHIN WW, PRICE J, REES LH, BESSER GM, HABENER JF: Cloning and characterization of cDNAs encoding human gastrin-releasing peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**; 81: 5699-5703.
- SPINDEL ER: Mammalian bombesin-like peptides. *Trends Neurosci.* **1986**; 9: 130-133.

- SPINDEL ER, ZILBERBERG MD, HABENER JF, CHIN WW: Two prohormones for gastrin-releasing peptide are encoded by two mRNAs differing 19 nucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986**; 83: 19-23.
- SPINDEL ER, ZILBERBERG MD, CHIN WW: Analyses of the gene and multiple messenger ribonucleic acids encoding human gastrin-releasing peptide: alternate RNA splicing occurs in neural and endocrine tissue. *Molec. Endocrinol.* **1987**; 3: 224-232.
- SPINDEL ER y KRANE IM: Molecular biology of bombesin-like peptides: comparison of cDNA encoding human gastrin-releasing peptide, human neuromedin B and amphibian ranatensin. *Ann. NY Acad. Sci.* **1988**; 547: 10-20.
- SPINDEL ER, GILADI E, BREHM P, GOODMAN RH, SEGERSON TP: Cloning and functional characterization of a complementary DNA encoding the murine fibroblast bombesin/gastrin-releasing peptide receptor. *Molec. Endoc.* **1990**; 4: 1956-1963.
- SPINEDI E y NEGRO VILAR A: Serotonin and adrenocorticotropin (ACTH) release: direct effects at the anterior pituitary level and potentiation of arginine-vasopressin-induced ACTH release. *Endocrinology* **1983**; 112: 1217-1223.
- SPINEDI E y GAILLARD RC: Stimulation of the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis by the central serotonergic pathway involvement of the endogenous corticotropin-releasing hormone but not vasopressin. *J. Endocrinol. Invest.* **1991**; 14: 551-557.
- SQUIRES PE, MELOCHE RM, BUCHAN AM: Bombesin-evoked gastrin release and calcium signaling in human antral G cells in culture. *Am. J. Physiol.* **1999**; 276: G227-G237.
- STEEL JH, O'HALLORAN DJ, EMSON MA, VAN NOORDEN S, BLOOM SR, POLAK JM: Identification of bombesin-immunoreactive cells in rat, human, and other mammalian pituitaries, their ontogeny and the effect of endocrine manipulations in the rat. *Endocrinology* **1992**; 130: 2587-2596.
- STEINBUSCH HW, VERHOFSTAD AA, JOOSTEN HWJ: Localization of serotonin in the central nervous system by immunohistochemistry: description of a specific and sensitive technique and some applications. *Neuroscience* **1978**; 3: 811-819.
- STENZEL P, KESTERSON R, YEUNG W, CONE RD, RITTENBERG MB, STENZEL-POORE MP: Identification of a novel murine receptor for corticotropin-releasing hormone expressed in heart. *Mol. Endocrinol.* **1995**; 9: 637-645.
- STERBA G y SCHÖBER F: Topographie und zytologie neurosekretorischer systems. Teil 1. Das klassische neurosekretorische system der Ratte Gustav Fisher Verlag, Jena, **1979**.
- STEVENS LT y LEE FS: Action of intermittent pressure and of defibrinated blood upon blood vessels of frog and terrapin. *Johns Hopkins Biology Studies* **1884**; 3: 99.
- STJERNQUIST M, EKBLAD E, OWMAN C, SUNDLER F: Neuronal localization and motor effects of gastrin-releasing peptide (GRP) in rat uterus. *Regulat. Pept.* **1986**; 13: 197-205.
- STRATAKIS CA y CHROUSOS GP: Neuroendocrinology and pathophysiology of the stress system. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1995**; 771: 1-18.
- SUDA T, TOMORI N, TOZAWA F, MOURI T, DEMURA H, SHIZUME K: Distribution and characterization of immunoreactive corticotropin-releasing factor in human tissues. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1984**; 59: 861-866.
- SUDA T, YAJIMA F, TOMORI N, SUMIMOTO T, NAKAGAMI Y, USHIYAMA T, DEMURA H, SHIZUME K: Stimulatory effect of acetylcholine on immunoreactive corticotropin-releasing factor release from the rat hypothalamus in vitro. *Life Sci.* **1987**; 40: 673-677.
- SUNDAY ME, KAPLAN LM, MOTOYAMA E, CHIN WW, SPINDEL ER: Biology of disease: gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease. *Lab. Invest.* **1988**; 59: 5-24.
- SWANSON LW, SAWCHENKO PE, WIEGAND SJ, PRICE JL: Separate neurons in the paraventricular nucleus project to the median eminence and to the medulla or spinal cord. *Brain Res.* **1980**; 198: 190-195.
- SWANSON LW y SAWCHENKO PE: Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and

supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* **1983**; 6: 269-324.

SZAFARCZYK A, ALONSO G, IXART G, MALAVAL F, NOUGUIER-SOULE J, ASSENMACHER I: Serotonergic system and circadian rhythms of ACTH and corticosterone in rats. *Am. J. Physiol.* **1980**; 239: E482-E489.

## T

---

TACHÉ Y, BROWN M, COLLU R: Effects of neuropeptides on adenohipophyseal hormone response to acute stress in male rats. *Endocrinology* **1979**; 105: 220-224.

TACHÉ Y, MARKI W, RIVIER J, VALE W, BROWN M: Central nervous system inhibition of gastric secretion in the rat by gastrin-releasing peptide, a mammalian bombesin. *Gastroenterology* **1981a**; 81: 298-302.

TACHÉ Y, VALE W, RIVIER J, BROWN M: Brain regulation of gastric acid secretion in rats by neurogastrointestinal peptides. *Peptides* **1981b**; 2: 51-55.

TACHÉ Y y BROWN M: On the role of bombesin in homeostasis. *Trends Neurosci.* **1982**; 5: 431-433.

TACHÉ Y y GUNION M: Current concepts in biological actions of bombesin-related peptides: Part II. Central nervous system action of bombesin to inhibit gastric acid secretion. *Life Sci.* **1985**; 37: 115-123.

TACHÉ Y, ISHIKAWA T, GUNION M, RAYBOULD HE: Central nervous system actions of bombesin to influence gastric secretion and ulceration. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 183-193.

TAKAGI A, MORIGA M, UCHINO H, AONO M: Effects of anti-GRP gamma-globulin on gastrin release and gastric secretion in the rat: evidence for the physiological role of endogenous GRP in the regulation of gastric function. *Gastroenterol. Jpn.* **1987**; 22: 280-284.

TANG KC y PAN JT: Stimulatory effects of bombesin-like peptides on suprachiasmatic neurons in brain slices. *Brain Res.* **1993**; 614: 125-130.

TANIMURA SM y WATTS AG: Corticosterone can facilitate as well as inhibit corticotropin-releasing hormone gene expression in the rat hypothalamic paraventricular nucleus. *Endocrinology* **1998**; 139: 3830-3836.

TAYA K y SASAMOTO S: Inhibitory effects of corticotropin-releasing factor and beta-endorphin on LH and FSH secretion in the lactating rat. *J. Endocrinol.* **1989**; 120: 509-515.

THAKORE J y DINAN TG: Cortisol synthesis inhibition: a new treatment strategy for the clinical and endocrine manifestations of depression. *Biol. Psychiat.* **1995**; 37: 365-371.

THOMAS RM y SANDER LD: Influence of CCK and bombesin on ACTH and cortisol secretion in the conscious dog. *Peptides* **1985**; 6: 703-707.

TILDERS FJ, BERKENBOSH F, VERMES I, LINTON EA, SMELIK PG: Role of epinephrine and vasopressin in the control of the pituitary-adrenal response to stress: *Fed. Proc.* **1985**; 44: 155-160.

TODD K y LIGHTMAN SL: Vasopressin activation of phosphatidylinositol metabolism in rat anterior pituitary in vitro and its modification by changes in the hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis. *Neuroendocrinology* **1987**; 45: 212-218.

TONEY TW, MANZANARES J, MOORE KE, LOOKINGLAND KJ: Sexual differences in the stimulatory effects of bombesin on tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain Res.* **1992**; 598: 279-285.

TRAMU G, CROIX C, PILLEZ A: Ability of the CRF immunoreactive neurons of the paraventricular nucleus to produce a vasopressin-like material. Immunohistochemical demonstration in adrenalectomized guinea pigs. *Neuroendocrinology* **1983**; 37: 467-469.

TREPEL JB, MOYER JD, CUTTITA F, FRUCHT H, COY DH, NATALE RB, MULSHINE JL, JENSEN RT, SAUSVILLE EA: A novel bombesin receptor antagonist inhibits autocrine signals in a small cell lung carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1988**; 156: 1383-1389.

TSAGARAKIS S, HOLLY JM, REES LH, BESSER GM, GROSSMAN A: Acetylcholine and norepinephrine stimulate the release of corticotropin-releasing factor-41 from the rat hypothalamus in vitro. *Endocrinology* **1989**; 124: 2330-2335.

TSAI MJ y O'MALLEY BW: Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu. Rev. Biochem.* **1994**; 63: 451-486.

TUOMISTO J y MÄNNISTÖ P: Neurotransmitter regulation of anterior pituitary hormones. *Pharmacol. Rev.* **1985**; 37: 249-332.

## U

---

UDELSMAN R, HARWOOD JP, MILLAN MA, CHROUSOS GP, GOLDSTEIN DS, ZIMLICHMAN R, CATT KJ, AGUILERA G: Functional corticotropin-releasing factor receptors in the primate peripheral sympathetic nervous system. *Nature* **1986**; 319: 147-150.

## V

---

VAGNE M, COLLINET M, CUBER JC, BERNARD C, CHAVVIALLE JA, MC DONALD TJ, MUTT V: Effect of porcine gastrin-releasing peptide on gastric secretion and motility and the release of hormonal peptides in conscious cats. *Peptides* **1987**; 8: 423-430.

VALE W y RIVIER C: Substances modulating the secretion of ACTH by cultured anterior pituitary cells. *Fed. Proc.* **1977**; 36: 2094-2099.

VALE W, SPIESS J, RIVIER C, RIVIER J: Characterization of a 41-residue ovine hypothalamic peptide that stimulates the secretion of corticotropin and beta-endorphin. *Science* **1981**; 213: 1394-1397.

VALE WW, RIVIER C, SPIESS J, RIVIER J: Corticotropin releasing factor. *Brain Peptides*, John Wiley & Sons, New York, **1983a**.

VALE W, VAUGHAN J, SMITH M, YAMAMOTO G, RIVIER J, RIVIER C: Effects of synthetic ovine corticotropin-releasing factor, glucocorticoids, catecholamines, neurohypophysial peptides, and other substances on cultured corticotropin cells. *Endocrinology* **1983b**; 113: 1121-1131.

VALENTINE JJ, NAKANISHI S, HAGEMAN DL, SNIDER RM, SPENCER RW, VINICK FJ: CP-70,030 and CP-75,998: The first non-peptide antagonists of bombesin and gastrin-releasing peptide. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1992**; 2: 333-338.

VALENTINO RJ, FOOTE SL, ASTON-JONES G: Corticotropin-releasing hormone activates noradrenergic neurons of the locus coeruleus. *Brain Res.* **1983**; 270: 363-367.

VAN DEN POL AN y TSUJIMOTO KL: Neurotransmitters of the hypothalamic suprachiasmatic nucleus: immunocytochemical analysis of 25 neuronal antigens. *Neuroscience* **1985**; 15: 1049-1086.

VAN DEN POL AN: Gamma-aminobutyrate, gastrin-releasing peptide, serotonin, somatostatin, and vasopressin: ultrastructural immunocytochemical localization in presynaptic axons in the suprachiasmatic nucleus. *Neuroscience* **1986**; 17: 643-659.

VANDER AJ, SHERMAN JH, LUCIANO DS: *Human physiology: the mechanisms of body function*. McGraw-Hill, New Caledonia, **1994**.

VANDERHAEGHEN JJ, GOLDMAN S, LOTSTRA F, VAN REETH O, DESCHEPPER C, ROSSIER J, SCHIFFMANN S: Co-existence of cholecystokinin or gastrin-like peptides with other peptides in the hypophysis and the hypothalamus. *Ann. N.Y.Acad.Sci.USA* **1985**; 448: 334-344.

VAN LOON GR, SHUM A, SOLE MJ: Decreased brain serotonin turnover after short term (two hour) adrenalectomy in rats: a comparison of four turnover methods. *Endocrinology* **1981**; 108: 1392-1402.

VAN LOON GR, SHUM A, HO D: Lack of effect of corticotropin-releasing factor on hypothalamic dopamine and serotonin synthesis turnover rates in rats. *Peptides* **1982**; 3: 799-803.

- VAN OERS JW, HINSON JP, BINNEKADE R, TILDERS FJ: Physiological role of corticotropin-releasing factor in the control of adrenocorticotropin-mediated corticosterone release from the rat adrenal gland. *Endocrinology* **1992**; 130: 282-288.
- VANVUGT DA, WEBB MY, REID RL: Naloxone antagonism of corticotropin-releasing hormone stimulation of prolactin secretion in rhesus monkeys. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1989**; 68: 1060-1066.
- VARGA G, REIDELBERG RD, LIEHR R-M, BUSSJAEGER LJ, COY DH, SOLOMON TE: Effects of potent bombesin antagonists on exocrine pancreatic secretion in rats. *Peptides* **1991**; 12: 493-497.
- VARGA G, ADRIAN TE, COY DH, REIDELBERGER RD: Bombesin receptor subtype mediation of gastroenteropancreatic hormone secretion in rats. *Peptides* **1994**; 15: 713-718.
- VEBER DF y FREIDINGER RM: The design of metabolically-stable peptide analogs. *Trends in Neurosci.* **1985**; 8: 392-396.
- VERBALIS JG, STRICKER EM, ROBINSON AG, HOFFMAN GE: Cholecystokinin activates *c-fos* expression in hypothalamic oxytocin and corticotropin-releasing hormone neurons. *J. Neuroendocrinol.* **1986**; 3: 205-213.
- VERBALIS JG, MC CANN MJ, STRICKER EM: Species-specific effects of bombesin on gastric emptying and neurohypophyseal hormone secretion. *Peptides* **1988**; 9: 1289-1293.
- VERNIKOS J, DALLMAN MF, BONNER C, KATZEN A, SHINSAKO J: Pituitary-adrenal function in rats chronically exposed to cold. *Endocrinology* **1982**; 110: 413-420.
- VIALLI M y ERSPAMER V: Cellule enterocromafini e cellule basigranulose acidifile nei vertebrati. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* **1933**; 19: 743.
- VIGH J, LENARD L, FEKETE E, HENADI I: Bombesin injection into the central amygdala influences feeding behavior in the rat. *Peptides* **1999a**; 20: 437-444.
- VIGH J, LENARD L, FEKETE E: Bombesin microinjection into the basolateral amygdala influences feeding behavior in the rat. *Brain Res.* **1999b**; 847: 253-261.
- VIGNA SR, MANTYH CR, GIRAUD AS, SOLL AH, WALSH JH, MANTYH PW: Localization of specific binding sites for bombesin in the canine gastrointestinal tract. *Gastroenterology* **1987**; 93: 1287-1295.
- VIGNA SR, GIRAUD AS, SOLL AH, WALSH JH, MANTYH PW: Bombesin receptors on gastrin cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 131-137.

## W

- WADA E, WAY J, LEBACQ-VERHEYDEN AM, BATTEY JF: Neuromedin B and gastrin-releasing peptide mRNAs are differentially distributed in the rat central nervous system. *J. Neurosci.* **1990**; 10: 2917-2930.
- WADA E, WAY J, SHAPIRA H, KUSANO K, LEBACQ-VERHEYDEN AM, COY D, JENSEN R, BATTEY J: cDNA cloning, characterization and brain-region specific expression of a neuromedin-B-preferring bombesin receptor. *Neuron* **1991**; 6: 421-430.
- WAKABAYASHI I, TONEGAWA Y, SHIBASAKI T, IHARA T, HATTORI M, LING N: Effect of dopamine, bombesin and cysteamine hydrochloride on plasma growth hormone response to synthetic growth hormone-releasing factor in rats. *Life Sci.* **1985**; 36: 1437-1443.
- WALSH JH, WONG HC, DOCKRAY GJ: Bombesin-like peptides in mammals. *Fed. Proc.* **1979**; 38: 2315-2319.
- WALSH JH, KOVACS TO, MAXWELL V, CUTTITTA F: Bombesin-like peptides as regulators of gastric function. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **1988**; 547: 217-224.
- WAND GS y DOBS AS: Alterations of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis in actively drinking alcoholics. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1991**; 72: 1290-1295.
- WANG LH, COY DH, TAYLOR JE, JIANG NY, MOREAU JP, HUANG SC, IRUCHT H, HAFAR BM, JENSEN

- RT: Des-met carboxyl terminally modified analogues of bombesin function as potent bombesin receptor antagonists, partial agonists or agonists. *J. Biol. Chem.* **1990**; 265: 15695-15703.
- WANG XQ, IMAKI T, SHIBASAKI T, YAMAUCHI N, DEMURA H: Intracerebroventricular administration of beta-endorphin increases the expression of c-fos and of corticotropin-releasing factor messenger ribonucleic acid in the paraventricular nucleus of the rat. *Brain Res.* **1996**; 707: 189-195.
- WATANABE T y ORTH DN: Effects of several in vitro systems on the potencies of putative adrenocorticotropin secretagogues on rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* **1988**; 122: 2299-2308.
- WEIDENFELD J, FELDMAN S, MECHOULAM R: Effect of the brain constituent anandamide, a cannabinoid receptor agonist, on the hypothalamus-pituitary-adrenal axis in the rat. *Neuroendocrinology* **1994**; 59: 110-112.
- WEIGERT N, LI YY, LIPPL F, COY DH, CLASSEN M, SCHUSDZIARRA V: Role of endogenous bombesin-like peptides during vagal stimulation of gastric acid secretion in the rat. *Neuropeptides* **1996**; 30: 521-527.
- WESTENDORF JM y SCHONBRUNN A: Bombesin stimulates prolactin and growth hormone release by pituitary cells in culture. *Endocrinology* **1982**; 110: 352-358.
- WESTENDORF JM y SCHONBRUNN A: Characterization of bombesin receptors in a rat pituitary cell line. *J. Biol. Chem.* **1983**; 258: 7527-7535.
- WESTENDORF JM, PHILIPS MA, SCHÖNBRUNN A: Vasoactive intestinal peptide stimulates hormone release from corticotropic cells in culture. *Endocrinology* **1983**; 112: 550-557.
- WESTERMARK T, ISAKSSON T, HOLMBERG P, KJORELL U, RANTAPAA-DAHLQVIST S, FORSGREEN S: Increase in bombesin-like peptides in the spinal cord after dexamethasone treatment of adrenalectomized rats. *Neurosci. Lett.* **1999a**; 275: 179-182.
- WESTERMARK T, ISAKSSON T, HOLMBERG P, KJORELL U, RANTAPAA-DAHLQVIST S, FORSGREEN S: Dexamethasone treatment after adrenalectomy increases bombesin content in the rat spinal cord. *Acta Physiol. Scand.* **1999b**; 167: A8.
- WHARTON J, POLAK JM, BLOOM SR, GATHEI MA, SOLCIA E, BROWN MR, PEARSE AG: Bombesin-like immunoreactivity in the lung. *Nature* **1978**; 273: 769-770.
- WHITNALL MH, MEZEY E, GAINER H: Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin in median eminence neurosecretory vesicles. *Nature* **1985**; 317: 248-250.
- WIDERLOV E, MUELLER RA, FRYE GD, BREESE GR: Bombesin increases dopamine function in rat brain areas. *Peptides* **1984**; 5: 523-528.
- WHITLEY JC, MOORE C, GIRAUD AS, SHULKES A: Molecular cloning, genomic organization and selective expression of bombesin receptor subtype 3 in the sheep hypothalamus and pituitary. *J. Mol. Endocrinol.* **1999**; 23: 107-116.
- WHITNALL MH: Stress selectively activates the vasopressin-containing subset of corticotropin-releasing hormone neurons. *Neuroendocrinology* **1989**; 50: 702-707.
- WILCOX JN y ROBERTS JL: Estrogen decreases rat hypothalamic proopiomelanocortin messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* **1985**; 117: 2392-2396.
- WOLFSON B, MANNING RW, DAVIS LG, ARENTZEN R, BALDINO F Jr: Co-localization of corticotropin-releasing factor and vasopressin mRNA in neurones after adrenalectomy. *Nature* **1985**; 315: 59-61.
- WON JG y ORTH DN: Roles of intracellular and extracellular calcium in the kinetic profile of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. I. corticotropin-releasing factor stimulation. *Endocrinology* **1990a**; 126: 849-857.
- WON JG, OKI Y, ORTH DN: Roles of intracellular and extracellular calcium in the kinetic profile of adrenocorticotropin secretion by perfused rat anterior pituitary cells. II. Arginine vasopressin, oxytocin, and angiotensin-II stimulation. *Endocrinology* **1990b**; 126: 858-868.
- WOOD SM, JUNG RT, WEBSTER JD, GHATEI MA, ADRIAN TE, YANAIHARA N, YANAIHARA C, BLOOM

SR: The effect of the mammalian neuropeptide, gastrin-releasing peptide (GRP), on gastrointestinal and pancreatic hormone secretion in man. *Clin. Sci.* **1983**; 65: 365-371.

WOODS MD, SHIPSTON J, MULLENS EL, ANTONI FA: Pituitary corticotrope tumor (AtT20) cells as a model system for the study of early inhibition by glucocorticoids. *Endocrinology* **1992**; 131: 2873-2880.

WYNN PC, HARWOOD JP, CATT KJ, AGUILERA G: Regulation of corticotropin-releasing factor (CRF) receptors in the rat pituitary gland: effects of adrenalectomy on CRF receptors and corticotrophs responses. *Endocrinology* **1985**; 116: 1653-1659.

---

## X

XIE CW, LEE PH, TAKEUCHI K, OWYANG V, LI SJ, DOUGLASS J, HONG JS: Single or repeated electroconvulsive shocks alter the levels of prodynorphin and proenkephalin mRNAs in rat brain. *Mol. Brain Res.* **1989**; 6:11-19.

XIE CW, MITCHELL CL, HONG JS: Perforant path stimulation differentially alters prodynorphin mRNA and proenkephalin mRNA levels in the entorhinal cortex-hippocampal region. *Mol. Brain Res.* **1990**; 7:199-205.

---

## Y

YACHNIS AT, CRAWLEY JN, JENSEN RT, MC GRANE MM, MOODY TW: The antagonism of bombesin in the CNS by substance P analogues. *Life Sci.* **1984**; 35: 1963-1969.

YAMADA T, TAKAMI MS, GERNER RH: Bombesin-like immunoreactivity in human cerebrospinal fluid. *Brain Res.* **1981**; 223: 214-217.

YAMADA K, WADA E, IMAKI J, OHKI-HAMAZAKI H, WADA K: Hyperresponsiveness to palatable and aversive taste stimuli in genetically obese (bombesin receptor subtype-3-deficient) mice. *Physiol. Behav.* **1999**; 66: 863-867.

YANO T, PINSKI J, GROOT K, SCHALLY AV: Stimulation by bombesin and inhibition by bombesin/gastrin-releasing peptide antagonist RC-3095 of growth of human breast cancer cell lines. *Cancer Res.* **1992**; 52: 4545-4547.

YATES FE, RUSSELL SM, DALLMAN MF, HODGE GA, MC CANN SM, DHARIWALL APS: Potentiation by vasopressin of corticotropin-release induced by corticotropin-releasing factor. *Endocrinology* **1971**; 88: 3-15.

YOSHIKAWA K y SABOL SL: Glucocorticoids and cyclic AMP synergistically regulate the abundance of preproenkephalin messenger RNA in neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1986**; 139: 1-10.

YOUNG WS 3d, MEZEY E, SIEGEL RE: Quantitative in situ hybridization histochemistry reveals increased levels of corticotropin-releasing factor mRNA after adrenalectomy in rats. *Neurosci. Lett.* **1986a**; 70: 198-203.

YOUNG WS 3d, BONNER TI, BRANN MR: Mesencephalic dopamine neurons regulate the expression of neuropeptide mRNAs in the rat forebrain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1986b**; 83: 9827-9831.

---

## Z

ZABORSZKY L: Afferent connections of the medial basal hypothalamus. *Adv. Anatomy Embriol. Cell. Biol.* **1982**; 62:1-107.

ZACHARY I y ROZENGURT E: High affinity receptors for peptides of the bombesin family in Swiss 3T3 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**; 82: 7616-7620.

## Bibliografía

---

ZHU YS y PFAFF DW: DNA binding of hypothalamic nuclear proteins on estrogen response element and preproenkephalin promoter: modification by estrogen. *Neuroendocrinology* **1995**; 62: 454-466.

ZOELLER RT, LEBACQ-VERHEYDEN AM, BATTEY JF: Distribution of two distinct messenger ribonucleic acid encoding gastrin-releasing peptide in rat brain. *Peptides* **1989**; 10: 415-422.



## **Apéndice: Publicaciones**



---

---

Publicación 1

Role of CRF in gastrin-releasing-peptide (GRP)-mediated regulation of ACTH and corticosterone secretion in male rats

*Neuroendocrinology* **1998**; 68: 116-122.

---

---



Margarita M. Garrido<sup>a</sup>  
Sonsolés Martín<sup>b</sup>  
Emilio Ambrosio<sup>b</sup>  
José A. Fuentes<sup>a</sup>  
Jorge Manzanares<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia and Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid,

<sup>b</sup> Departamento de Psicobiología, Facultad de Psicología, Universidad Nacional de Educación a Distancia, Madrid, España

## Role of Corticotropin-Releasing Hormone in Gastrin-Releasing Peptide-Mediated Regulation of Corticotropin and Corticosterone Secretion in Male Rats

### Key Words

Gastrin-Releasing peptide  
Corticotropin  
Corticotropin-releasing hormone  
Corticotropin-releasing hormone antagonists  
Adrenal steroids

### Abstract

Gastrin-releasing peptide (GRP) exerts several functions within the hypothalamus and may be involved in the regulation of pituitary hormone secretion. The purpose of this study was to investigate the central effect of GRP on hypothalamic-pituitary-adrenal axis activity in the male rat. Intracerebroventricular (i.c.v.) but not intravenous administration of GRP (1, 10, 100 ng/rat) increased plasma ACTH and corticosterone concentrations in a dose-dependent manner. The highest dose (100 ng/rat) of GRP increased plasma ACTH and corticosterone 4- and 14-fold, respectively. This increase peaked at 30–60 min after i.c.v. injection, decreased gradually and returned to baseline levels 240 min after GRP administration. The i.c.v. administration of (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin, a competitive and specific GRP receptor antagonist, had no effect on ACTH and corticosterone secretion; however, a dose of 1 μg/rat completely blocked the increase of both hormones induced by GRP (10 ng). By using α-helical (9–41) corticotropin-releasing factor (CRF), a competitive antagonist of CRF, the role of CRF on GRP-induced ACTH and corticosterone secretion was also explored. α-Helical (9–41) CRF (10 μg/rat) blocked the increase in ACTH and corticosterone secretion induced by GRP (10 ng). The results obtained in this study suggest that GRP increases the secretion of ACTH and corticosterone in the plasma by acting centrally on GRP receptors, and that endogenous GRP receptor ligands do not tonically regulate ACTH and corticosterone secretion. Furthermore, the hypothalamus-pituitary-adrenal-activating effects induced by GRP appear to be mediated, at least in part, by CRF.

### Introduction

Gastrin-releasing peptide (GRP), a 27-amino acid peptide, was isolated from porcine nonantral gastric and intestinal tissue [1] and subsequently identified in the gastrointestinal tract and central nervous system of mam-

mals [2–4]. Administration of GRP produces a wide variety of effects including stimulation of gastric and pancreatic secretions in experimental animals and humans [5, 6], hypothermia [7], satiety [8] and regulation of hypothalamic and hypophysial dopaminergic neurons [9, 10]. Despite the function of GRP as a gastric transmitter

### KARGER

© 1998 S. Karger AG, Basel  
Fax +41 61 306 12 34  
E-Mail karger@karger.ch  
www.karger.com

© 1998 S. Karger AG, Basel  
0028-3835/98/0682-0116\$15.00/0

Accessible online at  
<http://BioMedNet.com/karger>

José A. Fuentes  
Instituto Pluridisciplinar, Paseo Juan XXIII, 1  
Universidad Complutense  
E-28040 Madrid (Spain)

Tel. +34 91 394 3254, Fax +34 91 394 3264, E-Mail [fuentes@reucm15.sim.ucm.es](mailto:fuentes@reucm15.sim.ucm.es)

located in the gastric vagus terminals that regulates gastrin release being well known, its role in the central nervous system remains to be ascertained.

Both GRP and bombesin (a 14-amino acid peptide isolated from frog skin) [11] contain the COOH-terminal heptapeptide which is the biologically active portion of the peptide. The distribution of GRP/bombesin-like peptides and their receptors has been identified in mammalian tissues such as the gastrointestinal tract [12, 13] and the central nervous system [14–16].

Although GRP receptors (GRP-preferring receptors) are widely distributed throughout the central nervous system, the highest density of receptors has been identified in the hypothalamus [17, 18] and anterior pituitary [19], suggesting a role of this peptide in the regulation of hypothalamic and pituitary hormone secretion. Indeed, administration of GRP inhibits growth hormone [20, 21] and prolactin secretion [22, 23] in the rat, and stimulates ACTH secretion in rat [24] and men [25]. The anatomical distribution of GRP receptors and the effects of GRP on pituitary hormone secretion suggest that this peptide may be relevant in the control of hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis.

On this basis, the present investigation was designed to examine the effects of central and peripheral administration of GRP on ACTH and corticosterone secretion in the rat. By using (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>-Leu<sup>14</sup>) bombesin, a competitive and specific GRP antagonist [26], we have also determined whether or not these effects are mediated via GRP receptors, and if endogenous GRP ligands tonically regulate ACTH or corticosterone secretion. In addition, to provide some insight into the underlying mechanisms by which GRP stimulates the HPA axis, the effect of central administration of α-helical (9–41) corticotropin-releasing factor (CRF), a competitive CRF antagonist [30], on GRP-induced ACTH and corticosterone secretion have been studied.

## Materials and Methods

### Animals

Male Sprague-Dawley rats weighing 200–250 g were obtained from Harlan Interfauna Ibérica (San Feliu de Codines, Barcelona, Spain), maintained in a temperature (23 ± 1 °C) and light-controlled (lights on between 08.00 and 20.00 h) environment and provided food (Panlab) and tap water ad libitum. All the experiments included in this study were performed following the highest standards of humane animal care, monitoring health care and minimizing pain and suffering, in accordance with national and international laws for the care and use of laboratory animals.

### Drugs

Gastrin-releasing peptide (Peninsula Laboratories, Belmont, Calif., USA), (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>-NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (Research Biochemicals International, Natick, Mass., USA) and α-helical (9–41) CRF (Sigma Chemicals Co., Madrid, Spain) were dissolved in 0.9% NaCl. Drugs were administered as indicated in the legends of the appropriate figures.

### Surgical Procedures

In animals receiving intracerebroventricular (i.c.v.) injections a stainless-steel guide cannula was implanted into the right lateral cerebral ventricle 5 days prior to the experiment. Rats were anesthetized with Equithesin (3 ml/kg, intraperitoneal) and positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, Calif., USA) with the incisor bar set 2.4 mm below the horizontal plane. A 23-gauge stainless-steel guide cannula was implanted 1.4 mm lateral to midline at bregma (0.0 mm anterior/posterior) and 3.2 mm below dura according to the atlas by König and Klippel [27], and anchored to the skull with stainless-steel screws. One day after surgery, animals were handled every day to minimize the effects of stress due to manipulation. On the day of the experiment, GRP, (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>-NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin, α-helical (9–41)CRF or vehicle were injected in a volume of 5 µl with a 10-µl Hamilton microsyringe connected to a 30-gauge stainless-steel injector which protruded 1 mm beyond the tip of the guide cannula and into the lateral ventricle. The placement of the cannulas was verified histologically and only those animals with proper i.c.v. placements were included in the study.

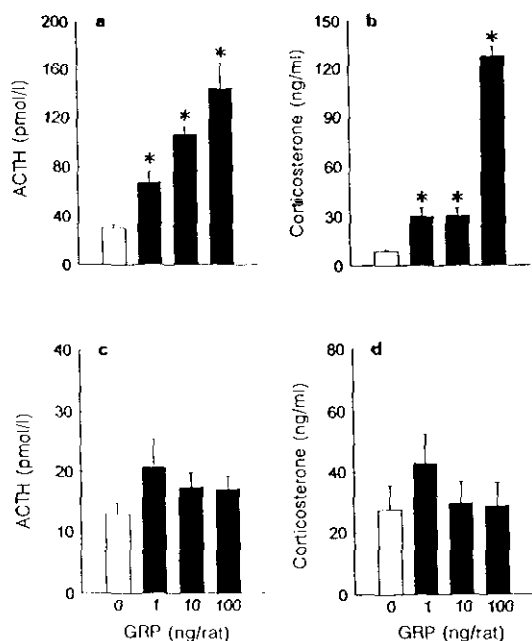
### Serial Bleeding and Blood Sampling

Indwelling right atrial catheters (PE-50 tubing, Clay Adams, Parsippany, N.J., USA) were implanted via the external jugular vein under Equithesin anesthesia 5 days prior to the experiment. On the day of the experiment, exteriorized catheters in individually caged animals were connected to extension tubing (PE-50 tubing, Clay Adams) and left undisturbed for 60 min. Blood samples (0.7 ml) were collected 0, 30, 60, 120 and 240 min relative to drug or vehicle injection. The volume of blood withdrawn at each time point was immediately replaced with an equivalent volume of resuspended red blood cells in heparinized saline (100 U/ml). In order to avoid ACTH or corticosterone changes induced by circadian rhythms that could mask our results, all experiments were performed between 09.00 and 13.00 h.

### ACTH and Corticosterone Radioimmunoassays

Trunk blood was collected following decapitation or from the jugular vein, and centrifuged (3,000 rpm, 4 °C, 15 min); plasma was stored frozen (–80 °C) until hormone assays were performed.

Corticosterone was extracted following the method of Armario and Castellanos [28]. Briefly, corticosterone binding protein transcortin was hydrolyzed by incubation with trypsin (Boehringer Mannheim, Madrid, Spain) for 60 min at room temperature. Trypsin was inactivated by trypsin inhibitor treatment (Boehringer Mannheim) for 30 min at room temperature. Corticosterone (Sigma Chemicals Co., Madrid, Spain) was used as the assay standard. Radioimmunoassays were performed by adding corticosterone antiserum (Bioclin Clinical Services Limited, Cardiff, UK) and <sup>3</sup>H-corticosterone (Amersham, Madrid, Spain) at specific activity of 88 Ci/mmol (8,000 cpm/tube) to this mixture. After incubation at 4 °C for 16–24 h, the antigen-antibody complex was separated from unbound antigen with 1% charcoal and centrifuged at 4 °C, 3,000 rpm, for



**Fig. 1.** Effect of i.c.v. and i.v. administration of GRP on plasma ACTH and corticosterone concentrations in male rats. **a, b** Rats were injected with GRP (1, 10 and 100 ng/rat) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat, i.c.v.). **c, d** Rats were injected with the same doses of GRP or its corresponding saline vehicle (200  $\mu$ l/rat, i.v.). All animals were killed by decapitation 30 min after the administration. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of plasma ACTH or corticosterone concentrations from 5–7 male rats. An asterisk indicates values from GRP-treated rats that are significantly different ( $p < 0.05$ ) from vehicle-treated controls.

10 min. Finally, the supernatant was decanted and mixed with a liquid scintillation cocktail before counting. The lower limit of sensitivity of the assay was 2 ng/ml. The intra- and interassay variability was 5.5 and 7.5%, respectively.

ACTH radioimmunoassay was performed following the method of Arts et al. [29]. Radioimmunoassays were performed by adding ACTH antiserum (ACTH-1, IgG Corp., Nashville, USA) and  $^{125}$ I-ACTH (Amersham, Madrid, Spain) at specific activity of 2,000 Ci/mmol (8,000 cpm/tube) to the sample. Human ACTH (Sigma Chemicals Co.) was used as the assay standard. After incubation at 4°C for 72 h, the antigen-antibody complex was separated from unbound antigen with a second antibody (IgG-GARGG, IgG Corp.) and after 3 h of incubation, centrifuged at 4°C, 3,000 rpm, for 25 min. Finally, the supernatant was decanted and pellets were counted in a gamma counter. The lower limit of sensitivity of the assay was 10 pmol/l. The intra- and interassay variability was 8.7 and 15%, respectively.

#### Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using one- or two-way ANOVA followed by the Student Newman Keuls test. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%.

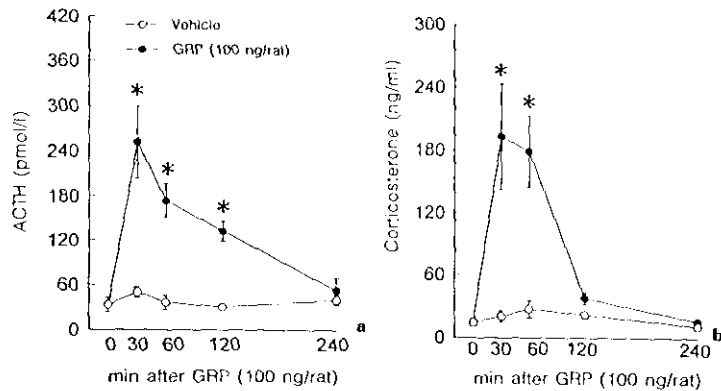
## Results

As shown in figure 1a, b, i.c.v. administration of GRP (1–100 ng/rat) 30 min before decapitation produced a dose-dependent increase in plasma ACTH and corticosterone concentrations in the rat. The maximal effect was found with the 100-ng dose, which significantly increased plasma ACTH (4-fold) and corticosterone (14-fold) concentrations. A higher (1  $\mu$ g) dose did not induce any further increase (data not shown). By contrast, intravenous (i.v.) administration of GRP at the same doses was without effect on ACTH and corticosterone concentrations in the plasma (fig. 1c, d). The potent stimulatory action of GRP on the secretion of ACTH and corticosterone was revealed again when the time course of the peptide was determined (fig. 2). A single i.c.v. injection of GRP (100 ng/rat) increased ACTH and corticosterone secretion by 30 min, an effect that was maintained for an additional 30 min for both hormones. ACTH and corticosterone plasma levels returned to control values by 240 min after drug injection.

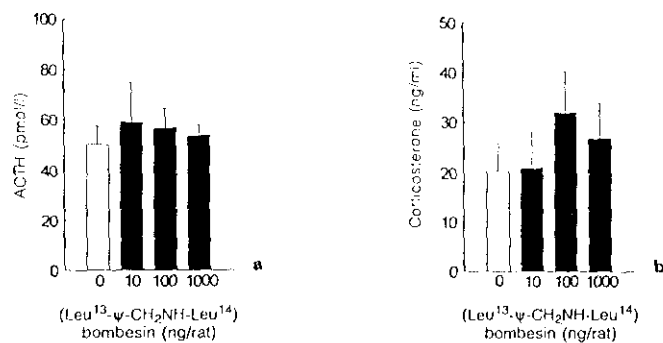
Intracerebroventricular administration of the competitive and specific GRP antagonist (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin, at doses of 10, 100 ng/rat or 1  $\mu$ g/rat, 30 min prior decapitation was without effect on the secretion of ACTH and corticosterone in the plasma (fig. 3). However, when rats were injected i.c.v. with GRP (10 ng/rat) and (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (1  $\mu$ g/rat) mixed together, 30 min before decapitation, this antagonist was able to completely block the stimulatory effects of GRP on ACTH and corticosterone concentrations in the plasma (fig. 4).

$\alpha$ -Helical (9–41) CRF has been described as a competitive CRF antagonist [30] that also shows a partial agonist effect at high doses. In order to establish whether or not this compound exhibited agonist activity on ACTH and corticosterone secretion, different doses of  $\alpha$ -helical (9–41) CRF (1, 3 and 10  $\mu$ g) were given i.c.v., 20 min before decapitation.  $\alpha$ -Helical (9–41) CRF was without effect on ACTH and corticosterone secretion at the doses administered (fig. 5). As shown in figure 6, i.c.v. administration of  $\alpha$ -helical (9–41) CRF (10  $\mu$ g/rat) 20 min before GRP administration blocked the increase in ACTH and corticosterone concentrations induced by this neuropeptide.

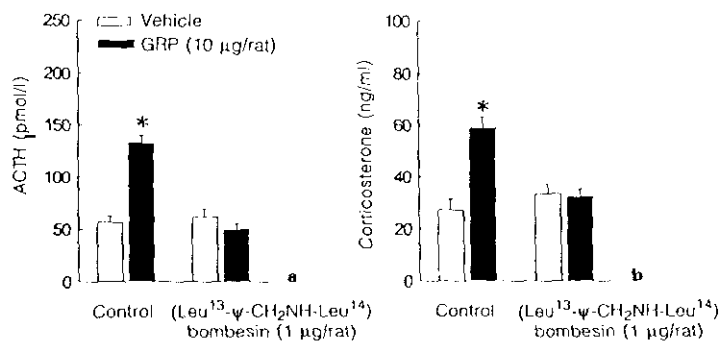
**Fig. 2.** Time course of the effects of GRP on plasma ACTH and corticosterone concentrations in male rats. Blood was collected from an exteriorized tubing implanted in the right atrium via the jugular vein before (zero time) and 30, 60, 120 and 240 min after saline vehicle or GRP administration (100 ng/5  $\mu$ l/rat, i.c.v.). The results represent the means and vertical lines  $\pm$  SEM of ACTH (a) or corticosterone (b) concentrations from 5–7 rats. An asterisk indicates values from GRP-treated rats that are significantly different ( $p < 0.05$ ) from vehicle-treated controls.



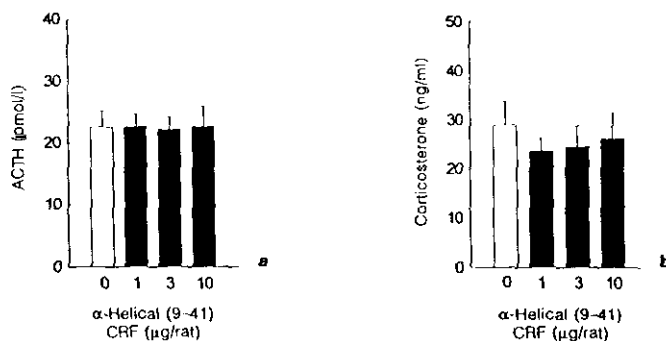
**Fig. 3.** Dose response of the effect of (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin on plasma ACTH and corticosterone concentrations in male rats. Rats were injected with (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (10, 100 and 1,000 ng/rat) or with its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat, i.c.v.) and killed by decapitation 30 min later. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of plasma ACTH (a) and corticosterone (b) concentrations of 5–6 rats.



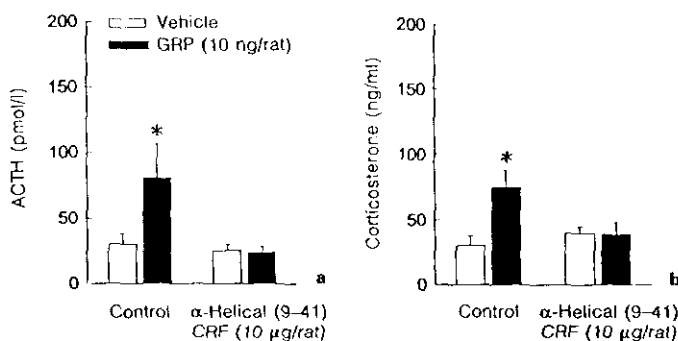
**Fig. 4.** Effect of GRP and (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin on plasma ACTH and corticosterone concentrations in male rats. Rats were injected with GRP (10 ng/rat; 5  $\mu$ l/rat, i.c.v.) and/or (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (1  $\mu$ g/rat in 5  $\mu$ l i.c.v.) mixed together and killed by decapitation 30 min later. Control rats were injected i.c.v. with saline vehicle (5  $\mu$ l/rat) 30 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of ACTH (a) or corticosterone (b) concentrations from 5–9 rats. An asterisk indicates values from GRP-treated rats that are significantly different ( $p < 0.05$ ) from vehicle-treated controls.



**Fig. 5.** Effect of  $\alpha$ -helical (9–41) CRF on plasma ACTH and corticosterone concentrations in male rats. Rats were injected with  $\alpha$ -helical CRF (1, 3 and 10  $\mu$ g/rat; 5  $\mu$ l/rat; i.c.v.) and killed by decapitation 20 min later. Control rats were injected i.c.v. with saline vehicle (5  $\mu$ l/rat) 20 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of ACTH (a) or corticosterone (b) concentrations from 6–10 rats.



**Fig. 6.** Effect of GRP and  $\alpha$ -helical (9–41) CRF on plasma ACTH and corticosterone concentrations in male rats. Rats were injected with  $\alpha$ -helical (9–41) CRF (10  $\mu$ g/rat; 5  $\mu$ l/rat; i.c.v.) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat; i.c.v.) 20 min prior to GRP (10 ng/rat; 5  $\mu$ l/rat; i.c.v.) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat; i.c.v.) administration. Trunk blood was collected 30 min after GRP injection. Control rats were injected i.c.v. with saline vehicle (5  $\mu$ l/rat) twice, 50 and 30 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of ACTH (a) or corticosterone (b) concentrations from 5–6 rats. An asterisk indicates values from GRP-treated rats that are significantly different ( $p < 0.05$ ) from vehicle-treated controls.



## Discussion

The marked stimulation of plasma concentrations of ACTH that follows i.c.v. but not i.v. administration of GRP reported in this article is consistent with the results of earlier studies [24] in which similar doses of GRP given i.c.v. increased ACTH. In addition, central but not i.v. administration of GRP also increased corticosterone secretion in the plasma. The lack of effect of i.v. administration of GRP on ACTH and corticosterone secretion suggests that the stimulatory action of GRP on HPA axis hormone secretion may occur via a central mechanism. On the other hand, differences in pharmacokinetic and/or metabolic factors (dose, differences in the peptidases

degrading GRP in the blood and cerebrospinal fluid, transfer of GRP from the blood compartment to the pituitary) may account for the discrepancies between GRP-induced increase in ACTH and corticosterone found comparing i.c.v. and i.v. administrations.

The pronounced increases in ACTH and corticosterone found after the dose-response and time course effects of i.c.v. administration of GRP suggest that this peptide may play a physiological role in the control of HPA axis hormone secretion. However, the administration of the GRP antagonist (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin was without effect on ACTH and corticosterone secretion, indicating that endogenous GRP is not tonically regulating either hormone. In contrast, the administration of this

antagonist completely blocked the stimulatory effect of GRP on both ACTH and corticosterone secretion, suggesting that this acute action is mediated via GRP receptors.

This study also provides evidence for the involvement of CRF in the stimulating effect of GRP on ACTH and corticosterone secretion. The ability of a CRF antagonist to block the secretion of both hormones induced by GRP is in keeping with other studies [32–35]. Since cell bodies of CRF neurons that regulate ACTH secretion are primarily located in the parvocellular cells of the paraventricular nucleus [13], and both neuropeptides coexist in this hypothalamic area, it is likely that GRP stimulates the secretion of ACTH and corticosterone by increasing CRF activity in this nucleus. It has also been shown that in the ovine median eminence, bombesin-like peptides colocalize with CRF neurons [32], and potentiate CRF-induced ACTH release from rat and ovine dispersed anterior pituitary cells [33, 34], suggesting that these peptides may participate in the regulation of CRF. Indeed, Kent et al. [35] have recently demonstrated that i.c.v. administration of bombesin elicits a rapid release of CRF from the median eminence. Taken together these observations led

us to hypothesize that the increase in the secretion of ACTH and corticosterone induced by GRP may involve the release of CRF from the median eminence or the activation of CRF in the paraventricular nucleus of the hypothalamus.

In summary, the results obtained in this study suggest that GRP increases the secretion of ACTH and corticosterone in the plasma by acting centrally on GRP receptors, and that endogenous GRP receptor ligands do not tonically regulate ACTH and corticosterone secretion. This effect is also mediated through activation of the endogenous CRF system in the central nervous system. These data suggest the role of GRP as an additional ACTH secretagogue acting through CRF release.

### Acknowledgments

This work was supported by a Concerted Action from the European Union grant BMH-CT-94-1108 and Spanish Ministry of Education grants SA195-0271 from CICYT and UE95-0017 from DGICYT. M. Garrido is a predoctoral supported by the Universidad Complutense de Madrid. J. Manzanares is a Senior Fellow supported by the Spanish Ministry of Education.

### References

- Mc Donald TJ, Jörnvall H, Nilsson G, Vagne M, Ghatei M, Bloom SR, Mutt V: Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue. *Biochem Biophys Res Commun* 1979;90:227–233.
- Price J, Penman E, Wass JA, Rees LH: Bombesin-like immunoreactivity in human gastrointestinal tract. *Regul Pept* 1984;9:1–10.
- Moghriavzadeh E, Ekman R, Hakanson R, Yanaihara N, Sundler F: Neuronal gastrin-releasing peptide in the mammalian gut and pancreas. *Neuroscience* 1983;10:553–563.
- Roth KA, Evans CJ, Lorenz RG, Weber E, Barchas JD, Chang JK: Identification of gastrin-releasing peptide-related substances in guinea pig and rat brain. *Biochem Biophys Res Commun* 1983;112:528–536.
- Varga G, Adrian TE, Coy DH, Reitelberger RD: Bombesin receptor subtype mediation of gastroenteropancreatic hormone secretion in rats. *Peptides* 1994;15:713–718.
- Knigge U, Holst JJ, Knudsen S, Petersen B, Krarup T, Holst-Pedersen J, Christiansen PM: Gastrin-releasing peptide: Pharmacokinetics and effects on gastroentero-pancreatic hormones and gastric secretion in normal men. *J Clin Metab* 1984;59:310–315.
- Babeock AM, Barton C: Microinfusion of bombesin into the hypothalamic paraventricular nucleus produces hypothermia in the insulin-pretreated rat. *Pharmacol Biochem Behav* 1990;36:863–867.
- McCoy JG, Avery DD: Bombesin: Potential integrative peptide for feeding and satiety. *Peptides* 1990;11:595–607.
- Manzanares J, Toney TW, Lookingland KJ, Moore KE: Activation of tuberoinfundibular and tuberohypophysial dopamine neurons following intracerebroventricular administration of bombesin. *Brain Res* 1991;565:142–147.
- Toney TW, Manzanares J, Moore KE, Lookingland KJ: Sexual differences in the stimulatory effects of bombesin on tuberoinfundibular dopamine neurons. *Brain Res* 1992;598:279–285.
- Brown M, Márki W, Rivier J: Is gastrin releasing peptide mammalian bombesin? *Life Sci* 1980;27:125–128.
- Tagaki A, Moriga M, Uchino H, Aono M: Distribution of gastrin-releasing peptide (GRP)-like immunoreactivity in the rat. *Gastroenterol Jpn* 1987;22:142–148.
- Moran TH, Moody TW, Hostetter AM, Robinson PH, Goldrich M, McHugh PR: Distribution of bombesin binding sites in the rat gastrointestinal tract. *Peptides* 1988;9:643–649.
- Moody TW, O'Donohue TL, Jacobowitz DM: Biochemical localization and characterization of bombesin-like peptides in discrete regions of rat brain. *Peptides* 1981;2:75–79.
- Moody TW, Cietz R, O'Donohue TL, Rosenstem JM: Localization of receptors for bombesin-like peptides in the rat brain. *Ann NY Acad Sci* 1988;547:114–130.
- Steel HH, O'Halloran DJ, Eanson MA, Van Noorden S, Bloom SR, Polak JM: Identification of bombesin-immunoreactive cells in rat, human and other mammalian pituitaries, their ontogeny and the effect of endocrine manipulations in the rat. *Endocrinology* 1992;130:2587–2596.
- Barley J, Wada E: Two distinct receptor subtypes for mammalian bombesin-like peptides. *TINS* 1991;14:524–528.
- Ladenheim EE, Jensen RT, Mantey SA, Moran TH: Distinct distributions of two bombesin receptor subtypes in the rat central nervous system. *Brain Res* 1992;593:168–178.
- Houben H, Andries M, Denef C: Autoradiographic demonstration of <sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>-bombesin binding sites on rat anterior pituitary cells. *Peptides* 1994;15:1289–1295.

- 20 Kentroli S, McCann SM: The effect of gastrin-releasing peptide on growth hormone secretion in the rat. *Endocrinology* 1985;117:1363-1367.
- 21 Kentroli S, Aguila MC, McCann SM: The inhibition of growth hormone release by gastrin-releasing peptide involves somatostatin release. *Endocrinology* 1988;122:2407-2411.
- 22 Matsushita N, Kato Y, Katakami H, Shimatsu A, Yanaihara N, Imura H: Inhibition of prolactin secretion by gastrin-releasing peptide (GRP) in the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 1983;172:118-121.
- 23 Kentroli S, Dees WL, McCann SM: Evidence for a physiological role of hypothalamic gastrin-releasing peptide to suppress growth hormone and prolactin release in the rat. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988;65:953-957.
- 24 Olsen L, Knigge U, Warberg J: Gastrin-releasing-peptide stimulation of corticotropin secretion in male rats. *Endocrinology* 1992;130:2710-2716.
- 25 Knigge U, Holst JJ, Knudsen S, Bach FW, Bang P: Corticotropin-releasing activity of gastrin-releasing peptide in normal men. *J Clin Endocrinol Metab* 1987;65:1291-1295.
- 26 Severi C, Coy DH, Jensen RT, Boschero L, Anania MC, Delle Fave G: Pharmacological characterization of (Leu<sup>1</sup>-p-CH<sub>2</sub>-NH<sup>1</sup>-Leu<sup>1</sup>) bombesin as a specific bombesin receptor antagonist on isolated smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther* 1989;251:713-717.
- 27 König JFR, Klippel RA: *The Rat Brain: A Stereotaxic Atlas of the Forebrain and Lower Parts of the Brain Stem*. Huntington, Krieger, 1963.
- 28 Armario A, Castellanos JM: A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat. *Rev Esp Fisiol* 1984;40:437-441.
- 29 Arts CJ, Koppeschaar HP, Veeman W, Thijsen JH: A direct radioimmunoassay for the determination of adrenocorticotrophic hormone (ACTH) and a clinical evaluation. *Ann Clin Biochem* 1985;22:247-256.
- 30 Rivier J, Rivier C, Vale W: Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: Effect on ACTH secretion in the rat. *Science* 1984;224:889-891.
- 31 Piekut DT, Joseph SA: Co-existence of CRF and vasopressin immunoreactivity in parvocellular neurons of rat hypothalamus. *Peptides* 1986;7:891-898.
- 32 Giraud AS, Smith AJ, Rundle SE: Distribution and molecular forms of immunoreactive bombesin in the ovine median eminence. *Mol Cell Endocrinol* 1987;53:245-250.
- 33 Hale AC, Price J, Ackland JF, Doniach I, Ratter S, Besser GM, Rees LH: Corticotrophin-releasing factor-mediated adrenocorticotrophin release from rat anterior pituitary cells is potentiated by C-terminal gastrin-releasing peptide. *J Endocrinol* 1984;102:R1-R3.
- 34 Au CL, Canny BJ, Fawcorth PG, Giraud AS: Bombesin regulation of adrenocorticotropin release from ovine anterior pituitary cells. *Peptides* 1997;18:995-1000.
- 35 Kent P, Anisman H, Merati Z: Central bombesin administration and restraint stress elicit CRF release at the median eminence. *Soc Neurosci Abstr* 1997;23:1793.



---

---

Publicación 2

Hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland involvement in the activation of ACTH and corticosterone secretion by gastrin-releasing peptide (GRP)

*Brain Research* **1999**; 828: 20-26.

---

---



Research report

## Hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland involvement in the activation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion by gastrin-releasing peptide

Margarita M. Garrido, Jorge Manzanares<sup>\*</sup>, José A. Fuentes

*Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia, and Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, Paseo de Juan XXIII 1, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain*

Accepted 23 February 1999

### Abstract

This study was designed to investigate the contribution of the hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland in the increase of adrenocorticotropin (ACTH) and corticosterone secretion induced by gastrin-releasing peptide (GRP) on in vitro isolated hypothalamus, pituitary and adrenal gland. Furthermore, we have examined in dispersed anterior pituitary cells whether the ACTH release induced by GRP is a  $Ca^{2+}$ -dependent process. Moderate concentrations of GRP (1 and 10 nM) were able to increase the release of corticotropin-releasing factor (CRF)-like material in the medium of isolated hypothalami, whereas higher concentrations (100 and 1000 nM) were needed to elevate ACTH and corticosterone secretion in pituitary and adrenal quarters, respectively. The competitive and specific GRP receptor antagonist (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (10, 100 and 1000 nM) was without effect on basal secretion of CRF-like material, ACTH and corticosterone in isolated hypothalamus, pituitary and adrenal quarters respectively. However, this antagonist (100 nM) completely blocked the stimulatory effects of GRP (100 nM) on bioactive CRF, ACTH and corticosterone release. In addition, in dispersed anterior pituitary cells which medium contained  $Ca^{2+}$  (1.5 mM), GRP stimulated the secretion of ACTH, but was without effect when the concentration of  $Ca^{2+}$  in the medium was lower (200 nM). These results suggest that: (1) the hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland seem to contribute to the elevation of ACTH and corticosterone secretion induced by GRP by a mechanism mediated through GRP receptors and (2) the stimulation of ACTH by GRP in the anterior pituitary appears to be dependent upon the presence of physiological concentrations of extracellular  $Ca^{2+}$ . © 1999 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

**Keywords:** GRP; ACTH; Corticosterone; Hypothalamus–pituitary–adrenal axis; GRP antagonist; Extracellular calcium

### 1. Introduction

Gastrin-releasing peptide (GRP), a 27-aminoacid peptide, belongs to a family of mammalian peptides related to the amphibian 14-amino acid peptide bombesin (BBN) [16]. Both GRP and BBN contain a common COOH-terminal heptapeptide sequence which is the biologically active portion of the peptide [6]. These peptides are present in several mammalian tissues and exert a wide variety of effects on the central nervous system as well as on peripheral tissues [3,12,15,27,28].

The highest density of GRP receptors is present in the hypothalamus, mainly in the arcuate, paraventricular,

supraoptic and suprachiasmatic nuclei [4,13,19]. BBN specific binding sites have also been detected in rat anterior pituitary reaggregate cell cultures [10] as well as in the growth hormone (GH) and prolactin (PRL)-secreting GH4C1 cell line [29]. Although high concentrations of immunoreactive BBN were found in bovine adrenal medulla associated with noradrenaline-containing cells [14]. BBN receptors have not been described yet in the adrenal gland. The anatomical distribution of GRP immunoreactivity and its receptors suggests that this peptide may be relevant in the control of hypothalamic–pituitary–adrenal hormone secretion. Indeed, Garrido et al. [8] have recently demonstrated that intracerebroventricular (i.c.v.) but not intravenous (i.v.) administration of GRP (10–100 ng/rat) elicits a marked increase in ACTH and corticosterone secretion, an action mediated via GRP and CRF receptors.

<sup>\*</sup> Corresponding author. Fax: +34-1-394-3264; E-mail: jorgemr@cucmax.sim.ucm.es

In recent experiments, Merali et al. [18] and Kent et al. [11] have shown that restraint stress produces a simultaneous increase in the extracellular levels of both CRF and BBN-like peptides in the central nucleus of the amygdala, as well as an elevation of BBN-like immunoreactivity in different hypothalamic nuclei. It is also known that various aversive conditions influence the levels and turnover of CRF at the central nucleus of the amygdala [21,22]. These data indicate that like CRF, BBN-like peptides also appear to be involved in the central response to stress.

On this basis, the present experiments were designed to investigate which component of the HPA axis mainly contributes to the increase of ACTH and corticosterone secretion induced by GRP. To this aim, the effects of GRP on CRF-like material, ACTH and corticosterone were examined *in vitro* on isolated hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland. In addition, as a preliminary approach and in order to explore whether the ACTH release induced by GRP is a  $Ca^{2+}$ -dependent process, we have examined the role of calcium on the GRP-mediated regulation of ACTH release in dispersed anterior pituitary cells.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

Male Sprague–Dawley rats weighing 200–250 g were obtained from Harlan Interfauna Ibérica (San Feliú de Codines, Barcelona, Spain), maintained in a temperature- (23°C) and light- (lights on between 0800 and 2000 h) controlled environment and provided food (Panlab) and tap water *ad libitum*. Experiments were performed following the highest standards of humane animal care, monitoring health care and minimizing pain and suffering, in accordance to National and International Laws for the Care and Use of Laboratory Animals.

### 2.2. Drugs

Gastrin-releasing peptide (GRP; Peninsula Laboratories, Belmont, CA, USA) and (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA) were dissolved in 0.9% NaCl.

### 2.3. *In vitro* studies

These *in vitro* experiments were carried out by a modification of the method described by Scaccianoce et al. [23–25].

#### 2.3.1. Isolated hypothalami

Rats were killed by decapitation. The hypothalami were rapidly removed and bound anteriorly by the optic chiasm, laterally by the optic tract, posteriorly by the mammillary

bodies and dorsally 1 mm from the top of the third ventricle. After removing the posterior lobe, each half of the anterior pituitary was divided in two equal quarters. Hypothalami and pituitaries were preincubated individually for 2 h in 1 ml of a medium pH 7.4 as described by Bradbury et al. [5], at 37°C, changing the medium every 30 min. After two 30-min preincubation periods, the medium was replaced with 1 ml fresh medium to establish basal release for 20 min. The medium was then changed with one containing test agents and hypothalami were incubated for another 20 min. The CRF-like material released was determined by its ability to cause ACTH release from anterior pituitary quarters incubated *in vitro*, as described by Buckingham and Hodges [7] and Scaccianoce et al. [24,25]. The interval between hypothalamic incubation and testing for CRF-like activity from anterior pituitary quarters was 20 min. The medium was then removed and centrifuged at 3000 rpm, 4°C, 10 min, to pellet any cellular material and was stored frozen in aliquots at –80°C. The ACTH released into the medium was measured by radioimmunoassay.

#### 2.3.2. Anterior pituitary quarters

After removing the posterior lobe, each half of the anterior pituitary was divided into two equal quarters and was preincubated individually at 37°C in the same medium described for the hypothalami. The medium was changed every 30 min, and then exposed for 20 min to 1 ml of fresh medium with or without test agents. The medium was then removed and centrifuged at 3000 rpm, 4°C, 10 min, to pellet any cellular material and was stored frozen in aliquots at –80°C. The ACTH released into the medium was measured by radioimmunoassay.

#### 2.3.3. Adrenal gland quarters

The adrenal glands were removed by ventral approach, cleaned from adipose tissue, quartered into four pieces and preincubated individually for 2 h in 1 ml of Krebs-bicarbonate medium pH 7.4 containing D-glucose (11 mM) and bovine serum albumin (0.25%), as described by Scaccianoce et al. [24], at 37°C, changing the medium every 30 min and then exposed for 1 h to 1 ml of fresh medium with or without test agents. The medium was then removed and centrifuged at 3000 rpm, 4°C, 10 min, to pellet any cellular material and was stored frozen in aliquots at –80°C. The corticosterone released into the medium was measured by radioimmunoassay.

#### 2.3.4. Dispersed anterior pituitary cell cultures

Rats were killed by decapitation and pituitaries were removed under sterile conditions. The anterior lobes were dissected free from the posterior lobes and minced with a sterile surgical blade. The pituitary cells were incubated at 37°C in 4% trypsin (Sigma, Madrid, Spain) for 20 min. Trypsin was inactivated by trypsin inhibitor treatment (Sigma, Madrid, Spain) and dispersion of cells was aug-

mented by triturating the fragments through a sterile pipette tip. Cells were pellet by centrifugation, and plated at a density of 200,000–250,000 cells/well in 24-well plastic cluster dishes (Falcon, Beckton Dickinson Labware, MA, USA) in DMEM (4500 mg of glucose/l) supplemented with 10% fetal calf serum (Reactiva, Barcelona, Spain), streptomycin (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) and penicillin (50 U/ml). Cell cultures were incubated at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air–5%  $\text{CO}_2$  for 4 days. On the day of the experiment (4 days after cell plating), the medium in the wells was removed and 0.5 ml of fresh DMEM, containing 0.6% HEPES and 0.25% bovine serum albumin (pH 7.4) were added to the cells for 60 min. During the incubation period, cells were placed in an humidified atmosphere at 37°C. The medium was then removed and cells were preincubated in 0.5 ml of complete  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium ( $\text{Ca}^{2+}$  1.5 mM) or low  $\text{Ca}^{2+}$ -containing medium ( $\text{Ca}^{2+}$  200 nM), at 37°C, changing the medium every 30 min. After two 30-min preincubation periods, the medium was removed from the cells and fresh medium without (basal secretion) or with test agents were added to the cells for 30 min. Medium was then removed and centrifuged at 3000 rpm, 4°C, 10 min, to pellet any cellular material and was stored in aliquots frozen at  $-80^\circ\text{C}$ . The ACTH released into the medium was measured by radioimmunoassay.

#### 2.4. ACTH and corticosterone radioimmunoassays

Corticosterone was extracted following the method of Armario and Castellanos [1]. Briefly, corticosterone binding protein transcortin was hydrolyzed by incubation with trypsin (Boehringer Mannheim, Madrid, Spain) for 60 min at room temperature. Trypsin was inactivated by

trypsin inhibitor treatment (Boehringer Mannheim, Madrid, Spain) for 30 min at room temperature. Corticosterone (Sigma, Madrid, Spain) was used as the assay standard. Radioimmunoassays were performed by adding corticosterone antiserum (Bioclin Clinical Services, Cardiff, UK) and  $^3\text{H}$ -corticosterone (Amersham, Madrid, Spain) at specific activity of 88 Ci/mmol (8000 c.p.m./tube) to this mixture. After incubation at 4°C for 16–24 h, the antigen–antibody complex was separated from unbound antigen with 1% charcoal and centrifuged at 4°C, 3000 rpm, for 10 min. Finally, the supernatant was decanted and mixed with a liquid scintillation cocktail before counting. Corticosterone antiserum cross-reacts with corticosterone (100%), 11-deoxycorticosterone (9%), progesterone (0.2%) and  $17\alpha$ -hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, estradiol and testosterone ( $<0.01\%$ ). The lower limit of sensitivity of the assay was 2 ng/ml. The intra and inter-assay variability was 5.5 and 7.5%, respectively.

ACTH radioimmunoassay was performed following the method of Arts et al. [2]. Radioimmunoassays were performed by adding ACTH antiserum (ACTH-1, IgG Corporation, Nashville, USA) and  $^{125}\text{I}$ -ACTH (Amersham, Madrid, Spain) at specific activity of 2000 Ci/mmol (8000 c.p.m./tube) to the sample. Human ACTH (Sigma, Madrid, Spain) was used as the assay standard. After incubation at 4°C for 72 h, the antigen–antibody complex was separated from unbound antigen with a second antibody (IgG-GARGG, IgG Corporation, Nashville, USA) and after 3 h of incubation, centrifuged at 4°C, 3000 rpm, for 25 min. Finally, the supernatant was decanted and pellets were counted in a gamma counter. ACTH antiserum cross-reacts with ACTH (1–39), 100%;  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ MSH),  $<0.2\%$ ;  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\beta$ MSH), 0.4%;  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ END),  $<0.5\%$

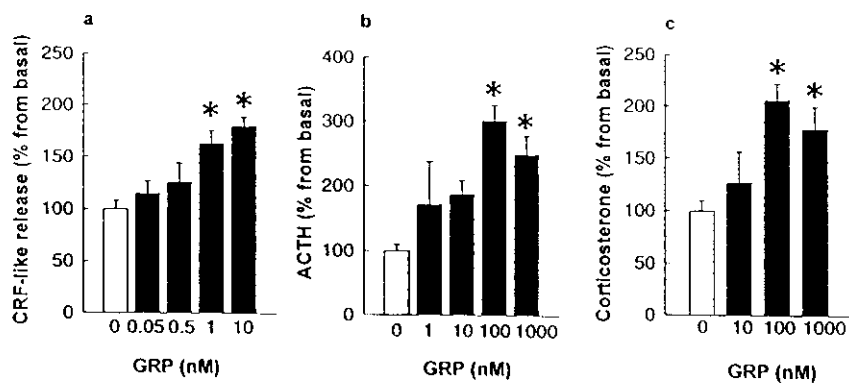


Fig. 1. Effect of different concentrations of GRP on the release of CRF-like material, ACTH and corticosterone in isolated hypothalamic, pituitary and adrenal quarters. (a) Isolated hypothalami, (b) pituitary quarters and (c) adrenal quarters were exposed to GRP. CRF-like material released was determined by its ability to cause ACTH release from anterior pituitary quarters incubated *in vitro*. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of CRF-like release, ACTH or corticosterone concentrations from 5–7 determinations per group. \* values from GRP-treated groups that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from controls. Basal hypothalamic release:  $6.5 \pm 0.5$  ng/ml/mg wet tissue of CRF-like material as ACTH; basal pituitary release:  $5.0 \pm 0.4$  ng/ml ACTH/ $\mu\text{g}$  wet tissue; basal adrenal release:  $3.7 \pm 0.3$  ng/ml corticosterone/ $\mu\text{g}$  wet tissue.

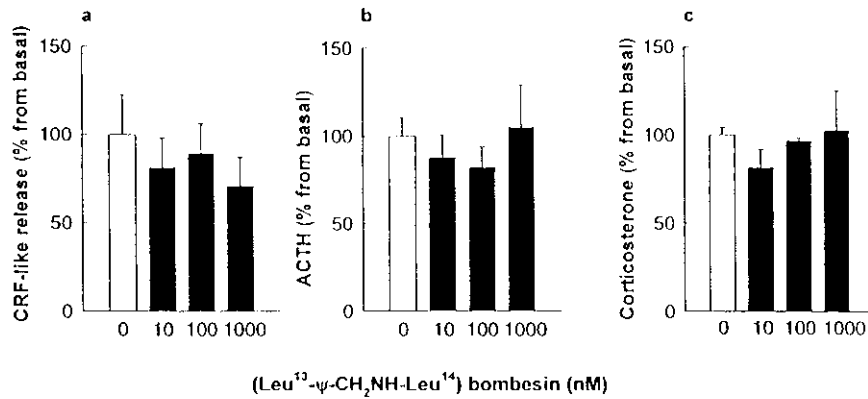


Fig. 2. Effect of different concentrations of (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin on the release of CRF-like material, ACTH and corticosterone in isolated hypothalamic, pituitary and adrenal quarters. (a) Isolated hypothalami, (b) pituitary quarters and (c) adrenal quarters were exposed to (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin. CRF-like material released from the hypothalami was determined by its ability to cause ACTH release from anterior pituitary quarters incubated in vitro. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of plasma ACTH or corticosterone concentrations from 5–8 determinations per group. Basal hypothalamic release:  $7.6 \pm 1.1$  ng/ml/mg wet tissue of CRF-like material as ACTH; basal pituitary release:  $2.8 \pm 0.2$  ng/ml ACTH/mg wet tissue; basal adrenal release:  $3.3 \pm 0.1$  ng/ml corticosterone/mg wet tissue.

and  $\beta$ -lipotropin ( $\beta$ LPH),  $< 1.3\%$ . The lower limit of sensitivity of the assay was 10 pmol/l. The intra and inter-assay variability was 8.7 and 15%, respectively.

### 2.5. Statistical analyses

Statistical analyses were performed using one or two ways ANOVA followed by the Student–Newman–Keul's test or Student's paired *t*-test, as appropriate. Differences

were considered significant if the probability of error was less than 5%.

### 3. Results

As shown in Fig. 1 (a–c), GRP produces a dose dependent increase in the release of CRF-like material in isolated hypothalami, and an increase in ACTH release from pituitary quarters and corticosterone release in adrenal

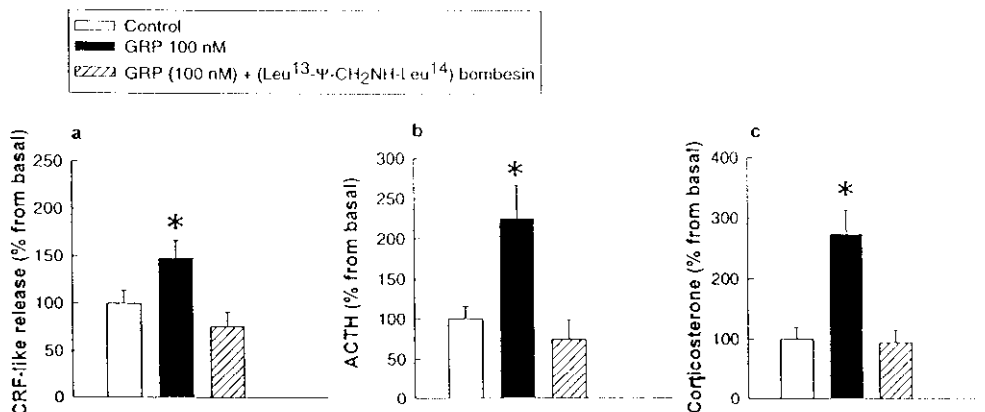


Fig. 3. Effect of GRP and (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin on the release of CRF-like material, ACTH and corticosterone in isolated hypothalamic, pituitary and adrenal quarters. (a) Isolated hypothalami, (b) pituitary quarters and (c) adrenal quarters were exposed to GRP or GRP + (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin. CRF-like material released from the hypothalami was determined by its ability to cause ACTH release from anterior pituitary quarters incubated in vitro. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of plasma ACTH or corticosterone concentrations from 5–8 determinations per group. \*, values from GRP-treated groups that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from control and GRP + (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin-treated groups. Basal hypothalamic release:  $5.5 \pm 0.8$  ng/ml/mg wet tissue of CRF-like material as ACTH; basal pituitary release:  $3.6 \pm 0.5$  ng/ml ACTH/mg wet tissue; basal adrenal release:  $3.1 \pm 0.6$  ng/ml corticosterone/mg wet tissue.

quarters. Low concentrations of GRP (1 and 10 nM) were able to increase the release of CRF-like material in isolated hypothalami, whereas higher concentrations of GRP (100 and 1000 nM) were necessary to increase ACTH and corticosterone in pituitary and adrenal quarters, respectively. The maximal effect on ACTH and corticosterone concentrations was found with the 100 nM dose.

The competitive and specific GRP receptor antagonist (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin [26], at concentrations of 10, 100 nM or 1 μM was without effect on the secretion of CRF-like material in isolated hypothalami and on the secretion of ACTH and corticosterone in pituitary and adrenal quarters, respectively (Fig. 2 a–c). However, when this antagonist (100 nM) was mixed together with GRP (100 nM), it completely blocked the stimulatory effects of GRP on the release of CRF-like material in isolated hypothalami and on the secretion of ACTH in pituitary quarters and corticosterone in adrenal quarters (Fig. 3 a–c).

As shown in Fig. 4, the effect of reducing extracellular Ca<sup>2+</sup> on the secretion of ACTH induced by GRP was also characterized in dispersed anterior pituitary cells after a 30 min incubation period. In complete Ca<sup>2+</sup>-containing medium (1.5 mM), GRP induced a dose-dependent increase in ACTH secretion, which peaked at 100 nM dose. In contrast, under low Ca<sup>2+</sup>-containing medium, GRP was without effect on ACTH secretion. The same results were obtained after a 60 min incubation period (data not shown).

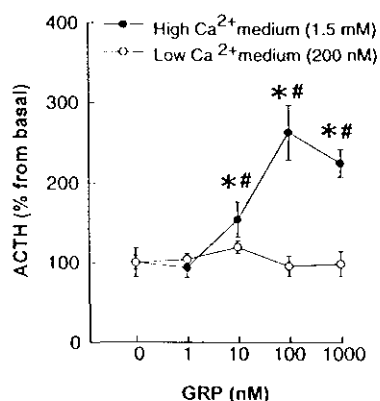


Fig. 4. Calcium dependency of ACTH release as a response to GRP in dispersed anterior pituitary cells. Four days culture cells were incubated with different concentrations of GRP in complete Ca<sup>2+</sup>-containing medium (Ca<sup>2+</sup> 1.5 mM) or in low Ca<sup>2+</sup>-containing medium (Ca<sup>2+</sup> 200 nM) for 30 min. The results shown are representative data of three independent experiments each performed in quadruplicate. \*, values from GRP-treated groups that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from controls (Student–Newman–Keul's test); #, values from GRP-treated groups in complete Ca<sup>2+</sup>-containing medium that are significantly different ( $P < 0.01$ ) from GRP-treated groups in low Ca<sup>2+</sup>-containing medium (Student's *t*-test). Basal release:  $21.2 \pm 1.8$  pmol/l ACTH in complete Ca<sup>2+</sup>-containing medium;  $19.5 \pm 3.5$  pmol/l ACTH in low Ca<sup>2+</sup>-containing medium.

#### 4. Discussion

The results of the present study show the contribution of the hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland in the release of CRF-like material, ACTH and corticosterone *in vitro* induced by GRP, by using a validated bioassay [23–25]. The fact that concentrations of 1 and 10 nM of GRP significantly increased the secretion of CRF-like material in isolated hypothalami, while higher concentrations (100–1000 nM) were required to elevate the levels of ACTH and corticosterone in anterior pituitary and adrenal quarters, respectively, suggests a greater responsiveness of the hypothalamus to the action of GRP in the secretion of ACTH. These results may support the hypothesis that the stimulatory action of GRP on hypothalamus–pituitary–adrenal axis (HPA) hormone secretion *in vivo* occurs predominantly via a central mechanism, and it is consistent with the observation that low doses of GRP increased the secretion of both hormones given *i.c.v.* but not *i.v.* [8,20]. As an alternative interpretation, the agonist properties of Arginine/Vasopressin (AVP) contained in the medium from the hypothalamus that was bioassayed by measuring ACTH release in pituitary quarters may play a role in such difference. Although the precise elements involved in the stimulatory effects of GRP in the hypothalamus remain to be determined, the following evidences suggest that this action may be mediated via hypothalamic factors such as CRF and/or AVP: (1) *I.c.v.* pretreatment with either CRF or AVP antiserum significantly attenuates GRP-induced increase in plasma ACTH [20] (2) Our laboratory has recently reported that *i.c.v.* administration of the selective CRF receptor antagonist  $\alpha$ -helical (9–41) CRF completely blocked the increase of ACTH and corticosterone secretion in the plasma induced by *i.c.v.* administration of GRP [8] and (3) This same CRF receptor antagonist significantly attenuates *i.c.v.* bombesin-induced endocrine (increases in plasma ACTH, norepinephrine, epinephrine and glucose) and behavioral effects including suppression of food intake, and increase of grooming behavior [17].

Apparently, the stimulation elicited by GRP on the release of CRF-like material, ACTH or corticosterone in isolated hypothalami, pituitary and adrenal quarters is mediated through GRP receptors, since the competitive and specific GRP receptor antagonist (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin completely blocked the effects of this neuropeptide on hormone secretion. In contrast, this antagonist by itself was without effect on the release of CRF-like material, ACTH or corticosterone in these *in vitro* preparations suggesting that endogenous GRP is not tonically regulating the secretion of these hormones in the hypothalamus, anterior pituitary or adrenal gland. This observation is consistent with the results that we have previously reported for the *in vivo* studies [8].

The blockade of the stimulatory effects of GRP on the release of bioactive CRF, ACTH and corticosterone in the

different preparations used suggests a direct action of this peptide upon hypothalamic, anterior pituitary and adrenal GRP receptors. Consistent with this hypothesis, GRP-binding sites and mRNAs encoding the GRP receptor have been described in the hypothalamus [4,13,19] and anterior pituitary [9,10]. Although there are no reports indicating the presence of these receptors in the adrenal gland, the fact that GRP stimulates the secretion of corticosterone by the adrenals and that the GRP antagonist blocked this action may be considered as an indication for the presence of GRP receptor in adrenal tissue.

GRP concentrations (10 nM; Fig. 4) required to release ACTH in dispersed pituitary cell were an order of magnitude lower than in the case of pituitary quarters (100 nM, Fig. 1). This might point to a secretagogue role for GRP in pituitary corticotrophs that in vivo may be acting as a hypothalamic releasing factor. Therefore, GRP may activate the HPA axis both through CRF [8] and directly by acting upon its receptors at the pituitary corticotrophs. This action appears to be supported by the fact that the GRP-evoked ACTH release was found to be a calcium dependent process in dispersed anterior pituitary cells and suggests the existence of an exocytotic-like mechanism.

In summary, in agreement with results published by Merali et al. [18] and Kent et al. [11], our data related to the effects of GRP on the HPA axis functioning suggest that BBN-like peptides may work in parallel to CRF as part of a constellation of responses to stressors. In fact, the results obtained in this study indicate that GRP, by acting on GRP receptors, increases the release of ACTH and corticosterone. Furthermore, it appears that in the anterior pituitary, the GRP-induced increase of ACTH release is a  $Ca^{2+}$  dependent process. Further experiments are required to characterize this secretagogue role of GRP in the HPA axis.

#### Acknowledgements

This work was supported by Concerted Action from the European Union grant BMH1-CT-94-1108 and Spanish Ministry of Education grants SAF95-0271 from CICYT and UE95-0017 from DGICYT. Margarita M. Garrido is a predoctoral fellow supported by the Universidad Complutense de Madrid. Jorge Manzanares is a Senior Fellow supported by the Spanish Ministry of Education.

#### References

- [1] A. Armario, J.M. Castellanos, A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat, *Rev. Esp. Fisiol.* 40 (1984) 437–441.
- [2] C.J. Arts, H.P. Koppeschaar, W. Veerman, J.H. Thijssen, A direct radioimmunoassay for the determination of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and a clinical evaluation, *Ann. Clin. Biochem.* 22 (1985) 247–256.
- [3] A.M. Babcock, C. Barton, Microinfusion of bombesin into the hypothalamic paraventricular nucleus produces hypothermia in the insulin-pretreated rat, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 36 (1990) 863–867.
- [4] J. Battey, E. Wada, Two distinct receptor subtypes for mammalian bombesin-like peptides, *Trends Neurosci.* 14 (1991) 524–528.
- [5] M.W.B. Bradbury, J. Burden, E.W. Hillhouse, Stimulation electrically and by acetylcholine of the rat hypothalamus in vitro, *J. Physiol.* 239 (1974) 269–283.
- [6] M. Brown, W. Märki, J. Rivier, Is gastrin releasing peptide mammalian bombesin?, *Life Sci.* 27 (1980) 125–128.
- [7] J.C. Buckingham, J.R. Hodges, The use of corticotrophin production by adenohypophysial tissue in vitro for the detection and estimation of potential corticotrophin releasing factors, *J. Endocrinol.* 72 (1977) 187–193.
- [8] M.M. Garrido, S. Martin, E. Ambrosio, J.A. Fuentes, J. Manzanares, Role of corticotropin-releasing hormone in gastrin-releasing peptide-mediated regulation of corticotropin and corticosterone secretion in male rats, *Neuroendocrinology* 68 (1998) 116–124.
- [9] H. Houben, A.T. Vandenbroucke, A.M. Verheyden, C. Deneef, Expression of the genes encoding bombesin-related peptides and their receptors in anterior pituitary tissue, *Mol. Cell. Endocrinol.* 97 (1993) 159–164.
- [10] H. Houben, M. Andries, C. Deneef, Autoradiographic demonstration of  $^{125}I$ -Tyr<sup>4</sup>-bombesin binding sites on rat anterior pituitary cells, *Peptides* 15 (1994) 1289–1295.
- [11] P. Kent, H. Anisman, Z. Merali, Are bombesin-like peptides involved in the mediation of stress response?, *Life Sci.* 62 (1998) 103–114.
- [12] U. Knigge, J.J. Holst, S. Knudsen, B. Petersen, T. Krarup, J. Holst-Pedersen, P.M. Christiansen, Gastrin-releasing peptide: Pharmacokinetics and effects on gastroentero-pancreatic hormones and gastric secretion in normal men, *J. Clin. Metab.* 59 (1984) 310–315.
- [13] E.E. Ladenheim, R.T. Jensen, S.A. Mantey, T.H. Moran, Distinct distributions of two bombesin receptor subtypes in the rat central nervous system, *Brain Res.* 593 (1992) 168–178.
- [14] S. Lemaire, L. Chouinard, P. Mercier, R. Day, Bombesin-like immunoreactivity in bovine adrenal medulla, *Regul. Pept.* 13 (1986) 133–146.
- [15] J.G. McCoy, D.D. Avery, Bombesin: potential integrative peptide for feeding and satiety, *Peptides* 11 (1990) 595–607.
- [16] T.J. McDonald, H. Jörnvall, G. Nilsson, M. Vagne, M. Ghatei, S.R. Bloom, V. Mutt, Characterization of a gastrin releasing peptide from porcine non-antral gastric tissue, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 90 (1979) 227–233.
- [17] Z. Merali, H. Plamondon, P. Kent, K. Banks, Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist blocks the autonomic, endocrine, ingestive and behavioral effects of central bombesin (BN), *Soc. Neurosci. Abstr.* 20 (1994) 1984.
- [18] Z. Merali, J. McIntosh, P. Kent, D. Michaud, H. Anisman, Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala, *J. Neurosci.* 18 (1998) 4758–4766.
- [19] T.W. Moody, R. Getz, T.L. O'Donohue, J.M. Rosenstein, Localization of receptors for bombesin-like peptides in the rat brain, *Ann. New York Acad. Sci.* 547 (1988) 114–130.
- [20] L. Olsen, U. Knigge, J. Warberg, Gastrin-releasing-peptide stimulation of corticotropin secretion in male rats, *Endocrinology* 130 (1992) 2710–2716.
- [21] E.M. Pich, M. Lorang, M. Yeganeh, F. Rodriguez de Fonseca, J. Raber, G.F. Koob, F. Weiss, Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis, *J. Neurosci.* 15 (1995) 5439–5447.
- [22] F. Rodriguez de Fonseca, M.R.A. Carrera, M. Navarro, G.F. Koob, F. Weiss, Activation of corticotropin releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal, *Science* 276 (1997) 2050–2054.

- [23] S. Scaccianoce, D. Navarra, A. Di Sciullo, L. Angelucci, E. Endrőczy, Adenosine and pituitary-adrenocortical axis activity in the rat, *Neuroendocrinology* 50 (1989) 464–468.
- [24] S. Scaccianoce, A. Di Sciullo, L. Angelucci, Age-related changes in hypothalamo-pituitary-adrenocortical axis activity in the rat, *Neuroendocrinology* 52 (1990) 150–155.
- [25] S. Scaccianoce, G. Cigliana, R. Nicolai, L.A.A. Muscolo, A. Porcu, D. Navarra, J.R. Perez-Polo, L. Angelucci, Hypothalamic involvement in the activation of the pituitary-adrenocortical axis by nerve growth factor, *Neuroendocrinology* 58 (1993) 202–209.
- [26] C. Severi, D.H. Coy, R.T. Jensen, L. Boscherio, M.C. Anania, G. Delle Fave, Pharmacological characterization of (Leu<sup>14</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin as a specific bombesin receptor antagonist on isolated smooth muscle cells, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 251 (1989) 713–717.
- [27] M.E. Sunday, J.M. Kaplan, E. Motoyama, W.W. Clün, E.R. Spindel, Gastrin-releasing peptide (mammalian bombesin) gene expression in health and disease, *Lab. Invest.* 59 (1988) 5–24.
- [28] G. Varga, T.E. Adrian, D.H. Coy, R.D. Reidelberger, Bombesin receptor subtype mediation of gastroenteropancreatic hormone secretion in rats, *Peptides* 15 (1994) 713–718.
- [29] J.M. Westendorf, A. Schonbrunn, Characterization of bombesin receptors in a rat anterior pituitary cell line, *J. Biol. Chem.* 258 (1983) 7527–7535.



---

Publicación 3

Gastrin-releasing peptide mediated regulation of 5-HT neuronal activity in the hypothalamic paraventricular nucleus under basal and restraint stress

{enviado Marzo 2000}

---



**Gastrin-releasing peptide mediated regulation of 5-HT neuronal activity in the hypothalamic paraventricular nucleus under basal and restraint stress**

Margarita M. Garrido, José A. Fuentes and Jorge Manzanares

Departamento de Farmacología, Facultad de Farmacia and Unidad de Cartografía Cerebral, Instituto Pluridisciplinar, Universidad Complutense de Madrid, 28040 Madrid, Spain.

Financial Support: This work was supported by Concerted Action from the European Union grant BMH1-CT-94-1108 and Spanish Ministry of Education grants SAF95-0271 from CICYT and UE95-0017 from DGICYT.

a) Running title: GRP-mediated regulation of 5-HT neuronal activity

b) Author to whom correspondence should be addressed:

José A. Fuentes, PhD  
Instituto Pluridisciplinar  
Paseo Juan XXIII, 1  
Universidad Complutense  
28040 Madrid  
SPAIN  
Phone: 34-1-394-3254  
Fax: 34-1-394-3264  
e-mail: fuentes@eucmax.sim.ucm.es

c) Number of text pages: 31

Number of tables: 1

Number of figures: 6

Number of references: 43

Number of words in Abstract: 247

Number of words in Introduction: 588

Number of words in Discussion: 1208

**Abstract**

This study examines the effects of gastrin-releasing peptide (GRP) on 5-HT neuronal activity in basal and under stress conditions, and its interaction with corticotropin releasing factor (CRF) neurons. Intracerebroventricular (icv) administration of GRP (1, 10, 100 ng/rat) increased 5-HIAA concentrations in the paraventricular nucleus (PVN) of the hypothalamus, but was without effect in the accumbens, suprachiasmatic and arcuate nuclei. Administration of (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin (10, 100 and 100 ng/rat; icv), a GRP antagonist had no effect by itself on PVN serotonergic activity; however, a dose of 1 µg/rat of this compound, completely blocked the increase of 5-HIAA concentrations induced by GRP (10 ng). The administration of α-helical (9-41) CRF (1,3 and 10 µg/rat), a CRF antagonist was without effect on 5-HIAA concentrations in the PVN in basal conditions. Although this antagonist (10 µg/rat) attenuated the stress-induced increase of PVN 5-HIAA and ACTH and corticosterone plasma concentrations, it did not block the increase in 5-HT neuronal activity induced by GRP. By contrast, (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin (1 µg/rat) blocked the increase of PVN 5-HIAA concentrations and reduced the ACTH and corticosterone secretion induced by restraint stress.

Our data suggest that GRP, by acting on GRP receptors but not via CRF receptors, increases 5-HT neuronal activity in the PVN. Furthermore, under stress conditions endogenous GRP or CRF receptor ligands seem to be independently involved in the regulation of the increase in 5-HT neuronal activity, ACTH and corticosterone secretion.

## Introduction

Gastrin-releasing peptide (GRP), a 27-aminoacid peptide, was isolated from porcine non antral gastric and intestinal tissue and is present in many mammalian tissues, including the gastrointestinal tract and brain (Price et al., 1984). GRP is the mammalian counterpart of amphibian bombesin (BBS) and shares most of the carboxyl terminal decapeptide sequence with this peptide except for the substitution of a *His* residue instead of a *Gln* at position 8 (Brown et al., 1980). BBS-like immunoreactivity is widely distributed in the mammalian CNS, with the highest content found in the arcuate, suprachiasmatic and paraventricular nuclei and in the anterior pituitary (Steel et al., 1992). By using radiolabeled BBS ligand, receptor binding studies have identified a high density of receptors in the suprachiasmatic, periventricular and paraventricular nuclei of rat hypothalamus (Ladenheim et al., 1992) and in the anterior lobe of the pituitary gland (Houben et al., 1994), suggesting that this peptide may play a relevant role in the regulation of the hypothalamus-pituitary-adrenal axis hormone secretion. Indeed, we have recently shown that GRP increases CRF-like material, ACTH and corticosterone in isolated hypothalamus, pituitary and adrenal gland (Garrido et al., 1999). Indeed, intracerebroventricular administration of GRP, acting via GRP receptors (Garrido et al., 1998), increases plasma ACTH and corticosterone concentrations (Olsen et al., 1992, Garrido et al., 1998). In addition, the increase of both hormones induced by GRP, can be blocked by pretreatment with a CRF receptor antagonist (Garrido et al., 1998, Merali et al., 1994), suggesting that the stimulatory action of this neuropeptide on these pituitary hormones may involve the activation of the endogenous CRF system.

A number of studies have shown that bombesin increases dopamine function in different rat brain areas (Manzanares et al., 1991, Toney et al., 1992). However, little is known about the involvement of bombesin-like peptides in the regulation of serotonergic (5-HT) neurons in the

brain. Liposits et al. (1987) demonstrated a direct synaptic connection between serotonergic nerve terminals and CRF containing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (PVN). Moreover, a number of studies (Nagakami et al., 1986, Calogero et al., 1990) support the notion of an excitatory influence of central serotonergic systems upon the HPA axis hormone secretion and the association between stress and increase of serotonin metabolism in different brain regions, including the hypothalamus (Inoue et al., 1994, Shimizu et al., 1992). Recently, Merali et al. (1998, Kent et al., 1998) have reported that in vivo release of BBS-like peptides at the central nucleus of the amygdala was markedly increased by stress exposure and that stress is associated with fluctuation in endogenous regional levels of BBS-like peptides and in receptor density in several brain regions. Taken together, these data led us to hypothesize that GRP, as a potent activator of the HPA axis, may be potentially involved in the regulation of serotonergic activity and in the regulation of stress response.

On these basis, the present investigation was designed to examine the central effects of GRP on 5-HT neuronal activity under basal and stress conditions, and, by using the specific and competitive GRP and CRF antagonists ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ )Bombesin (Severi et al., 1989) and  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (Rivier et al., 1984), respectively, evaluate its potential interaction with the CRF neurons. Furthermore, in order to deep insight into the role of GRP in the HPA hormone secretion induced by restraint stress, the effects of intracerebroventricular administration of the GRP receptor antagonist ( $\text{Leu}^{13}\text{-}\psi\text{-CH}_2\text{NH-Leu}^{14}$ ) bombesin on the increase of ACTH and corticosterone plasma levels induced by restraint stress were examined in the rat.

## Materials and methods

**Animals.** Male Sprague-Dawley rats weighing 200-250 g were obtained from Harlan Interfauna Ibérica (San Feliú de Codines, Barcelona, Spain), maintained in a temperature- (23°C) and light- (lights on between 08:00 and 20:00 h) controlled environment and provided food (Panlab) and tap water ad libitum. Experiments were performed following the highest standards of humane animal care, monitoring health care and minimizing pain and suffering, in accordance to National and International Laws for the care and Use of Laboratory Animals.

**Drugs.** Gastrin-releasing peptide (GRP; Península Laboratories, Belmont, CA, USA), (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)Bombesin (Research Biochemicals International, Natick, MA, USA) and α-helical (9-41) CRF (Sigma Chemicals Co , Madrid, Spain) were dissolved in 0.9% NaCl. Drugs were administered as indicated in the legends of the appropriate figures.

**Surgical procedures.** In animals receiving intracerebroventricular (icv) injections a stainless steel guide cannula was implanted into the right lateral cerebral ventricle 5 days prior to the experiment. Rats were anesthetized with Equithesin (3 ml/kg; intraperitoneal) and positioned in a stereotaxic frame (David Kopf Instruments, Tujunga, California, USA) with the incisor bar set 2.4 mm below the horizontal plane. A 23-gauge stainless-steel guide cannula was implanted 1.4 mm lateral to midline at bregma (0.0 mm anterior/posterior) and 3.2 mm below dura according to König and Klippel Atlas (1963), and anchored to the skull with stainless-steel screws. One day after surgery, animals were handled everyday to minimize the effects of stress due to manipulation. On the day of the experiment, GRP, (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)Bombesin, α-helical (9-41) CRF or vehicle were injected in a volume of 5 µl with a 10 µl Hamilton microsyringe connected to a 30 gauge stainless-steel injector which protruded 1 mm beyond the tip of the guide cannula and into the

lateral ventricle. The placement of the cannulas was verified histologically and only those animals with proper icv placements were included in the study.

**Stress procedure.** Unanesthetized rats were confined in an acrylic cylindrical tube (inner size 16 x 5 x 5.3 cm) for 15 min. After this time period of restraint stress animals were removed from the tubes and rapidly decapitated. Control animals remained in their home cages.

**Tissue dissection and neurochemical analyses.** Frontal brain sections (600  $\mu\text{m}$ ) were prepared in a cryostat ( $-9^{\circ}\text{C}$ ) and the accumbens, suprachiasmatic, arcuate and paraventricular nucleus of the hypothalamus were dissected from these sections according to a modification (Lookingland and Moore, 1984) of the method of Palkovits (1973). Tissue samples were placed in 60  $\mu\text{l}$  of 0.1 M phosphate-citrate buffer (pH 2.5) containing 15% methanol and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  until assayed.

On the day of the assay tissue samples were thawed, sonicated for 3 s (Vibra Cell, mod. VC-501, Sonics and Materials Inc., Danbury, CT, USA), and centrifuged for 60 s in a Microfuge (IEC, mod. Centra-MP4R, Needham, MA, USA). 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA) and 5-hydroxytryptamine (5-HT) concentrations in these tissue extracts were measured by high performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection. according to the brain region, different volumes of the supernatant were injected onto a C18 reverse-phase analytical column (5  $\mu\text{m}$  spheres; 250 x 4.6 mm; Nucleosil; Scharlau, Barcelona, SPAIN) which was protected by a precolumn cartridge filter (5  $\mu\text{m}$  spheres; 30 x 4.6 mm). The HPLC column was coupled to a single coulometric electrode conditioning cell in series with dual electrode analytical cells (Coulochem II, ESA, Bedford, MA). The conditioning electrode potential was set at 100 nA, and the analytical electrodes were set at +0.12 V and -0.31 V relative to internal Ag reference electrodes. The HPLC mobile phase consisted of 0.1 M phosphate/citrate buffer (pH

2.8) containing 0.1 mM ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA), 0.050% sodium octylsulphate and 25% methanol. 5-HIAA and 5-HT contents of each sample were quantified by comparing peak heights with those peaks of standards assayed the same day as determined by Shimadzu Integrator (Shimadzu, mod. C-R4AX-CHROMATOPAC, Kyoto, Japan). The lower limit of sensitivity of this assay for these compounds was 2 to 8 pg per sample. Tissue pellets were dissolved in 1.0 N NaOH and assayed for protein (Lowry et al., 1951).

**ACTH and corticosterone radioimmunoassays.** Trunk blood was collected following decapitation and centrifuged (3000 rpm; 4°C; 15 min); plasma was stored frozen (-80°C) until hormone assays were performed.

Corticosterone was extracted following the method of Armario and Castellanos (1984). Briefly, corticosterone binding protein transcortin was hydrolyzed by incubation with trypsin (Boehringer Mannheim, Madrid, Spain) for 60 min at room temperature. Trypsin was inactivated by trypsin inhibitor treatment (Boehringer Mannheim, Madrid, Spain) for 30 min at room temperature. Corticosterone (Sigma Chemicals Co, Madrid, Spain) was used as the assay standard. Radioimmunoassays were performed by adding corticosterone antiserum (Bioclin Clinical Services Limited, Cardiff, UK) and <sup>3</sup>H-corticosterone (Amersham, Madrid, Spain) at specific activity of 88 Ci/mmol (8000 cpm/tube) to this mixture. After incubation at 4°C for 16-24 hours, the antigen-antibody complex was separated from unbound antigen with 1% charcoal and centrifugated at 4°C, 3000 rpm, for 10 min. Finally, the supernatant was decanted and mixed with a liquid scintillation cocktail before counting. Corticosterone antiserum cross-reacts with corticosterone (100%), 11-deoxycorticosterone (9%), progesterone (0.2%) and 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol, cortisol, estradiol and testosterone (<0.01%). The lower limit of sensitivity of the assay was 2 ng/ml. No inter-assay variability was found, since both

experiments were measure in the same assay. The intra assay variability was 5.8 %.

ACTH radioimmunoassay was performed following the method of Arts et al (1985). Radioimmunoassays were performed by adding ACTH antiserum (ACTH -1, IgG Corporation, Nashville, USA) and  $^{125}\text{I}$ -ACTH (Amersham, Madrid, Spain) at specific activity of 2000 Ci/mmol (8000 cpm/tube) to the sample. Human ACTH (Sigma Chemicals Co, Madrid, Spain) was used as the assay standard. After incubation at 4°C for 72 hours, the antigen-antibody complex was separated from unbound antigen with a second antibody (IgG-GARGG, IgG Corporation, Nashville, USA) and after 3 hours of incubation, centrifuged at 4°C, 3000 rpm, for 25 min. Finally, the supernatant was decanted and pellets were counted in a gamma counter. ACTH antiserum cross-reacts with ACTH (1-39), 100%;  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ MSH), <0.2%;  $\beta$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\beta$ MSH), 0.4%;  $\beta$ -endorphin ( $\beta$ END), <0.5% and  $\beta$ -Lipotropin ( $\beta$ LPH), <1.3%. The lower limit of sensitivity of the assay was 10 pmol/l. No inter-assay variability was calculated, since both experiments were measured in the same assay. The intra-assay variability was 3.9 %.

**Statistical analyses.** Statistical analyses were performed using one or two way ANOVA followed by the Student Newman Keul's test. Differences were considered significant if the probability of error was less than 5%.

## Results

The effects of GRP on 5-HT neuronal activity were examined in several brain regions. As shown in table 1, GRP (1 to 100 ng/rat; icv) 30 min before decapitation produced a dose-dependent increase in 5-HIAA concentrations in the paraventricular nucleus of the hypothalamus, whereas no effects were found in the nucleus accumbens, supraoptic or arcuate nuclei of the hypothalamus. The administration of GRP did not alter 5-HT concentrations in all the brain regions examined. Since GRP failed to alter 5-HT neuronal activity in the accumbens, supraoptic and arcuate nuclei, the following studies were focussed on the paraventricular nucleus.

The effects of the competitive and specific GRP antagonist (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin on basal and GRP-induced 5-HT neuronal activity were also examined. Intracerebroventricular administration of (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin, at doses of 10, 100 or 1 µg/rat, 30 min prior decapitation was without effect on 5-HIAA concentrations in the PVN (Fig. 1). However, when rats were injected icv with GRP (10 ng/rat) and (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin (1 µg/rat) mixed together, 30 min before decapitation, this antagonist completely blocked the stimulatory effects of GRP on 5-HT neuronal activity in this hypothalamic nucleus (Fig. 2).

α-helical (9-41) CRF has been described as a competitive CRF antagonist (Rivier et al., 1984) that also shows a partial agonist effect at high doses. In order to establish the possible role of endogenous CRF in the regulation of 5-HT neuronal activity in the PVN, and to determine whether or not this compound exhibited agonist activity on 5-HIAA concentrations, different doses of α-helical (9-41) CRF (1, 3 and 10 µg/rat) were given icv, 20 minutes before decapitation. α-helical (9-41) CRF was without effect on 5-HIAA concentrations at the doses administered (Fig 3).

The role of CRF in the regulation of 5-HT neuronal activity as well as in the secretion of plasma ACTH and corticosterone after restraint stress was also determined by using  $\alpha$ -helical (9-41) CRF. As shown in figure 4A, restraint stress increases 5-HIAA concentrations in the PVN, and markedly elevates plasma ACTH and corticosterone concentrations (16 fold; Fig 4B and 4C). Whereas icv administration of  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rat), 20 min before decapitation, was without effect on these parameters in basal conditions, it completely blocked the stress-induced increase of 5-HIAA concentrations, and attenuated the stress-induced increase of ACTH and corticosterone concentrations (34 and 42 % respectively; Fig. 4A, B and C).

To determine if CRF is involved in GRP-induced increase of 5-HT neuronal activity, the effects of  $\alpha$ -helical (9-41) CRF on GRP-induced increase of 5-HIAA concentrations were also examined (Fig. 5): The stimulatory action of GRP as well as the lack of effect of  $\alpha$ -helical (9-41) CRF on 5-HIAA concentrations were revealed again in this experiment. On the other hand, icv administration of  $\alpha$ -helical (9-41) CRF (10  $\mu$ g/rat) 20 minutes before GRP administration (10 ng/rat; icv) did not block the activation of 5-HT neuronal activity induced by this neuropeptide.

Consistent with Figure 4, tube restraint stress markedly increased 5-HT neuronal activity in the PVN (Fig. 6A) as well as plasma ACTH and corticosterone concentrations (Fig. 6 B and C). In order to determine if GRP receptors are involved in stress-induced increase in 5-HIAA concentrations and on the secretion of plasma ACTH and corticosterone, the GRP antagonist (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin, was administered icv at a dose of 1  $\mu$ g/rat, 45 min prior decapitation. Whereas this antagonist was without effect on 5-HT neuronal activity and on the secretion of ACTH and corticosterone in basal conditions, it did blocked the stimulatory effects of restraint stress on 5-HIAA concentrations and attenuated the stress-induced increase in ACTH (52%) and corticosterone (43%) concentrations in the plasma.

## Discussion

Microdissection technique for the isolation of discrete brain areas is a simply and reliable method that has been used for many authors and offers a good resolution to measure biogenic amines in brain cell groups by using high performance liquid chromatography coupled to electrochemical detection (Manzanares et al., 1991a, 1991b, Palkovits, 1973, Toney et al., 1992). By means of this experimental approach, the present study investigates the central effects of GRP on 5-HT neuronal activity under basal and stress conditions and its potential interaction with the CRF neurons. 5-HT neuronal activity was estimated in these experiments by determining the metabolism of 5-HT in regions of the brain containing 5-HT terminals. Steady-state levels of neurotransmitter are maintained in axon terminals during varying rates of neuronal activity by the coupling between 5-HT synthesis, release and metabolism. 5-HT metabolism was determined by measuring the concentrations of the primary 5-HT metabolite 5-HIAA.

GRP produced a dose-dependent increase in 5-HIAA concentrations in the PVN of the hypothalamus, whereas the concentrations of 5-HT were not affected. By contrast, the icv injection of GRP had no effect on 5-HIAA and 5-HT concentrations in the nucleus accumbens, and other hypothalamic areas, such as suprachiasmatic and arcuate nuclei. Our results are consistent with the finding of bombesin-induced activation of 5-HT sensitive neurons in the rat dorsal raphe nucleus (Pinnock and Woodruff, 1991), and also in keeping with the reported activation of 5-HT neurons and increase of 5-HT metabolism in the PVN after electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus (Petersen et al., 1989, Saphier and Feldman, 1989). On the other hand, it has been reported that 5-HT neurons from the PVN mediate adrenocortical responses following afferent neural stimuli, since CRF-containing neurons projecting from the PVN to the median eminence, which are involved in controlling pituitary-adrenocortical function, receive synaptic input from 5-HT neurons projecting from the midbrain raphe nuclei (Fuller, 1992,

Feldman et al., 1987). Indeed, CRF, ACTH and corticosterone release is increased in rats by drugs that enhance serotonin function (Petersen et al., 1989), a fact that is in keeping with our findings, since GRP markedly increases ACTH and corticosterone secretion (Garrido et al., 1998, 1999, Merali et al., 1994, Olsen et al., 1992).

The administration of the GRP antagonist (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin was without effect on 5-HIAA concentrations in the PVN, indicating that endogenous GRP is not tonically regulating 5-HT activity in this hypothalamic nucleus. In contrast, the administration of this antagonist completely block the stimulatory effects of GRP on 5-HT neuronal activity, suggesting that this acute action is mediated via GRP receptors.

Neurons of the medial parvocellular division of the PVN represent the final common pathway for the neuroendocrine responses to stress. These neurons synthesize CRF and AVP as well as a variety of neuropeptides as GRP and project to the external zone of the median eminence where they exocytose their packaged peptides into portal blood in response to stress. Corticotropin-releasing factor (CRF) appears to be the major factor regulating the activation of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis, and its icv administration causes many physiological and behavioral responses resembling those observed in stress (Dunn and Berridge, 1990). Neurochemical studies have shown that administration of CRF increases 5-HIAA concentrations in the prefrontal cortex and hypothalamus of the rat (Lavicky and Dunn, 1993) and suggest that *during stress, released CRF can activate the serotonergic system. The increase of 5-HT metabolism in response to different kind of stressors in different brain regions, including the hypothalamus, has also been reported, (Inoue et al., 1994, Shimizu et al., 1989, 1992).* Our findings are in good agreement with these studies and also demonstrate that CRF is not tonically regulating 5-HT neuronal activity in the PVN in basal conditions. However, CRF mediates 5-HT activation in the PVN during stress, since the CRF receptor antagonist, α-helical (9-41) CRF is

able to block the stress-induced increase of 5-HIAA concentrations in the PVN, and to attenuate the rise of plasma ACTH and corticosterone induced by restraint stress, as reported by others (Arnold et al., 1992, Linton et al., 1985, Nakane et al., 1985, Ono et al., 1985, Rivier et al., 1982). In the case of pharmacological activation of 5-HT neurons due to this bombesin-like neuropeptide, the same dose of  $\alpha$ -helical (9-41) CRF was unable to block the GRP-induced increase of 5-HT metabolism in the PVN, suggesting that CRF receptors are not involved now in the increase of 5-HIAA concentrations induced by GRP.

Recent studies related to the effects of GRP on the HPA functioning suggest that bombesin-like peptides may work in parallel to CRF as part of a constellation of responses to stressors. It is known that various aversive conditions influence the levels and turnover of CRF at the central nucleus of the amygdala (Pich et al., 1995), a nucleus considered to contribute to emotional responses. Recently, it has been demonstrated that restraint stress induces an immediate increase of bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala (Merali et al., 1998). Indeed, paralleling with CRF changes, release of bombesin-like peptides and variations of receptor density at different hypothalamic nuclei are also induced by restraint stress (Kent et al., 1998).

As shown in this study, the administration of the GRP antagonist (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin was without effect on 5-HIAA concentrations in the PVN or corticosterone and ACTH plasma levels. However this antagonist was able to block the stress-induced increase of 5-HT metabolism in the PVN and of both stress hormones. Therefore, the present data provides evidence for the involvement of GRP in the stimulating effect of stress on plasma ACTH and corticosterone secretion and on 5-HT metabolism in the PVN. On the basis that cell bodies of CRF neurons that regulate ACTH secretion are primarily located in the parvocellular neurons of the paraventricular nucleus and that GRP is also present in this hypothalamic area, it is likely that

GRP may stimulate the secretion of ACTH and corticosterone in response to stressors by increasing CRF activity in this nucleus. Alternatively, GRP may cause the release of CRF from the median eminence, since it has also been demonstrated that bombesin elicits a rapid release of CRF from the median eminence (Kent et al., 1997). The ability of a CRF antagonist to block the secretion of both the hormones induced by GRP (Garrido et al., 1998, Merali et al., 1994) is in agreement with this hypothesis.

In summary, the results obtained in this study suggest that GRP, by acting on GRP receptors but not via CRF receptors increases the 5-HT neuronal activity in the PVN; furthermore, it appears that endogenous GRP or CRF receptor ligands are independently involved in the regulation of the increase in 5-HT neuronal activity, ACTH and corticosterone secretion, under stress conditions. Previous observations that icv administration of GRP provokes a large increase in corticosterone and ACTH plasma levels together with the fact that a GRP receptor antagonist is capable of blocking 5-HT activation as well as elevation in stress hormones are both solid arguments that claims for a role of GRP in the response of the central nervous system to stress.

**Acknowledgements**

M.M. Garrido is a predoctoral fellow supported by the Universidad Complutense de Madrid. J.

Manzanares is a Senior Fellow supported by the Spanish Ministry of Education.

## References

Armario A and Castellanos JM (1984) A simple procedure for direct corticosterone radioimmunoassay in the rat. *Rev Esp Fisiol* **40**:437-441.

Arnold FJ, De Lucas Bueno M, Shiers H, Hancock DC, Evan GI and Herbert J (1992) Expression of c-fos in regions of the basal limbic forebrain following intracerebroventricular corticotropin-releasing factor in unstressed or stressed male rats. *Neuroscience* **51**:377-390.

Arts CJ, Koppeschaar HP, Veeman W and Thijssen JH (1985) A direct radioimmunoassay for the determination of adrenocorticotropic hormone (ACTH) and a clinical evaluation. *Ann Clin Biochem* **22**:247-256.

Brown M, Märki W and Rivier J (1980) Is gastrin releasing peptide mammalian bombesin?. *Life Sci* **27**:125-128.

Calogero AE, Badgy G, Szemeredi K, Tartaglia ME, Gold PW and Chrousos GP (1990) Mechanisms of serotonin receptor agonist-induced activation of hypothalamic-pituitary-adrenal axis in the rat. *Endocrinology* **126**:1888-1894.

Dunn AJ and Berridge CW (1990) Physiological and behavioral responses to corticotropin-releasing factor administration: is CRF a mediator of anxiety or stress responses? *Brain Res Rev* **15**:71-100.

Feldman S, Conforti N and Melamed E (1987) Paraventricular nucleus serotonin mediates neurally stimulated adrenocortical secretion. *Brain Res Bull* **18**:165-168.

Fuller W (1992) The involvement of serotonin in the regulation of pituitary-adrenocortical function. *Front Neuroendocrinol* **13**: 250-270.

Garrido MM, Martin S, Ambrosio E, Fuentes JA and Manzanares J (1998) Role of corticotropin-releasing hormone in gastrin-releasing peptide-mediated regulation of corticotropin and corticosterone secretion in male rats. *Neuroendocrinology* **68**: 116-124.

Garrido MM, Manzanares J and Fuentes JA (1999) Hypothalamus, anterior pituitary and adrenal gland involvement in the activation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion by gastrin-releasing peptide. *Brain Res* **828**: 20-26.

Houben H, Andries M and Deneff C (1994) Autoradiographic demonstration of <sup>125</sup>I-Tyr<sup>4</sup>-bombesin binding sites on rat anterior pituitary cells. *Peptides* **15**:1289-1295.

Inoue T, Tsuchiya K and Koyama T (1994) Regional changes in dopamine and serotonin activation with various intensity of physical and psychological stress in the rat brain. *Pharmacol Biochem Behav* **49**:911-920.

Kent P, Anisman H and Merali Z (1997) Central bombesin administration and restraint stress elicit CRF release at the median eminence. *Soc Neurosci Abst* Vol 23, part 2, p. 1793.

Kent P, Anisman H and Merali Z (1998) Are bombesin-like peptides involved in the mediation of stress response?, *Life Sci* **62**:103-114.

König JFR and Klippel RA (1963) *The rat brain: a stereotaxic atlas of the forebrain and lower parts of the brain stem*. Huntington, Krieger.

Ladenheim EE, Jensen RT, Mantey SA and Moran TH (1992) Distinct distributions of two bombesin receptor subtypes in the rat central nervous system. *Brain Res* **593**:168-178.

Lavicky J and Dunn AJ (1993) Corticotropin-releasing factor stimulates catecholamine release in hypothalamus and prefrontal cortex in freely moving rats as assessed by microdialysis. *J Neurochem* **60**: 602-612.

Linton EA, Tilders FJ, Hodgkinson S, Berkenbosch F, Vermes I and Lowry PJ (1985) Stress-induced secretion of adrenocorticotropin in rats is inhibited by administration of antisera to ovine corticotropin-releasing factor and vasopressin. *Endocrinology* **116**:966-970.

Liposits Z, Phelix C and Paull WK (1987) Synaptic interaction of serotonergic axons and corticotropin releasing factor (CRF) synthesizing neurons in the hypothalamic paraventricular nucleus of the rat. A light and electron microscopic immunocytochemical study. *Histochemistry* **86**:541-549.

Lookingland KJ and Moore KE (1984) Dopamine receptor-mediated regulation of incertohypothalamic dopaminergic neurons in the male rat. *Brain Res* **304**: 329-338.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL and Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

Manzanares J, Lookingland KJ and Moore KE (1991a) Kappa opioid receptor-mediated regulation of dopaminergic neurons in the rat brain. *J Pharmacol Exp Ther* **256**:500-505.

Manzanares J, Toney TW, Lookingland KJ and Moore KE (1991b) Activation of tuberoinfundibular and tuberohypophysial dopamine neurons following intracerebroventricular administration of bombesin. *Brain Res* **565**: 142-147.

Merali Z, McIntosh J, Kent P, Michaud D and Anisman H (1998) Aversive and appetitive events evoke the release of corticotropin-releasing hormone and bombesin-like peptides at the central nucleus of the amygdala. *J. Neurosci* **18**: 4758-4766.

Merali Z, Plamondon H, Kent P and Banks K (1994) Corticotropin-releasing factor (CRF) antagonist blocks the autonomic, endocrine, ingestive and behavioral effects of central bombesin (BN). *Soc. Neurosci. Abstr* **20**, 1984.

Nagakami Y, Suda T, Yajima F, Ushiyama T, Tomori N, Sumimoto T, Demura H and Shizume K (1986) Effect of serotonin, ciproheptadine and reserpine on corticotropin-releasing factor release from rat hypothalamus in vitro. *Brain Res* **386**:232-236.

Nakane T, Audhya T, Kanie N and Hollander CS (1985) Evidence for a role of endogenous corticotropin-releasing factor in cold, ether, immobilization, and traumatic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:1247-1251.

Olsen L, Knigge U and Warberg J (1992) Gastrin-releasing-peptide stimulation of corticotropin secretion in male rats. *Endocrinology* **130**:2710-2716.

Ono N, Samson WK, McDonald JK, Lumpkin MD, Bedran de Castro JC and McCann SM (1985) Effects of intravenous and intraventricular injection of antisera directed against corticotropin-releasing factor on the secretion of anterior pituitary hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* **82**:7787-7790.

Palkovits M (1973) Isolated removal of hypothalamic and other brain nuclei of the rat. *Brain Res* **59**:449-450.

Petersen SL, Hartman RD and Barraclough CA (1989) An analysis of serotonin secretion in hypothalamic regions based on 5-hydroxytryptophan accumulation or push-pull perfusion. Effects of mesencephalic raphe or locus coeruleus stimulation and correlated changes in plasma luteinizing hormone. *Brain Res* **495**:9-19.

Pich EM, Lorang M, Yeganeh M, Rodriguez de Fonseca F, Raber J, Koob G.F. and Weiss F (1995) Increase of extracellular corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity levels in the amygdala of awake rats during restraint stress and ethanol withdrawal as measured by microdialysis, *J Neurosci* **15**:5439-5447.

Pinnock RD and Woodruff GN (1991) Bombesin excites a subpopulation of 5-hydroxytryptamine-sensitive neurones in the rat dorsal raphe nucleus in vitro. *J Physiol* **440**:55-65

Price J, Penman E, Wass JA and Rees LH (1984) Bombesin-like immunoreactivity in human gastrointestinal tract. *Regul Peptides* **9**:1-10.

Rivier C, Rivier J and Vale W (1982) Inhibition of adrenocorticotrophic hormone secretion in the rat by immunoneutralization of corticotropin-releasing factor. *Science* **218**:377-379.

Rivier J, Rivier C and Vale W (1984) Synthetic competitive antagonists of corticotropin-releasing factor: effect on ACTH secretion in the rat. *Science* **224**:889-891.

Rodriguez de Fonseca F, Carrera MRA, Navarro M, Koob GF and Weiss F (1997) Activation of corticotropin-releasing factor in the limbic system during cannabinoid withdrawal. *Science* **276**:2050-2054.

Saphier D and Feldman S (1989) Paraventricular nucleus neuronal responses following electrical stimulation of the midbrain dorsal raphe nuclei; evidence for cotransmission. *Exp Brain Res* **78**:407-414.

Severi C, Coy DH, Jensen RT, Boschero L, Anania MC and Delle Fave G (1989) Pharmacological characterization of (Leu-<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu-<sup>14</sup>) Bombesin as a specific bombesin receptor. *J Pharm Exp Ther* **251**:713-717.

Shimizu N, Oomura Y and Aoyagi K (1989) Electrochemical analysis of hypothalamic serotonin metabolism accompanied by immobilization stress in rats. *Physiol Behav* **46**: 829-834.

Shimizu N, Take S, Hori T and Oomura Y (1992) In vivo measurement of hypothalamic serotonin release by intracerebral microdialysis: significant enhancement by immobilization stress in rats. *Brain Res Bull* **28**:727-734.

Steel JH, O'Halloran DJ, Emson MA, Van Noorden S, Bloom SR and Polak JM (1992) Identification of bombesin-immunoreactive cells in rat, human and other mammalian pituitaries, their ontogeny and the effect of endocrine manipulations in the rat. *Endocrinology* **130**:2587-2596.

Toney TW, Manzanares J, Moore KE and Lookingland KJ (1992) Sexual differences in the stimulatory effects of bombesin on tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain Res* **598**: 279-285.

**Table 1.**

Effect of icv administration of GRP on 5-HIAA and 5-HT concentrations in different brain nuclei.

Rats were injected with GRP (1, 10, 100 and 1000 ng/rat) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat; icv). All

<b>BRAIN REGION</b>		<i>Control</i>	<i>1 ng</i>	<i>10 ng</i>	<i>100 ng</i>
<i>accumbens n.</i>	5-HIAA	6.8 $\pm$ 0.6	7.1 $\pm$ 0.6	7.6 $\pm$ 0.7	7.2 $\pm$ 0.6
	5-HT	12.9 $\pm$ 1.2	12.5 $\pm$ 2.2	10.6 $\pm$ 1.2	9.2 $\pm$ 0.7
<i>arcuate n.</i>	5-HIAA	6.6 $\pm$ 0.8	6.5 $\pm$ 0.5	5.6 $\pm$ 0.4	5.1 $\pm$ 0.6
	5-HT	9.9 $\pm$ 1.1	9.7 $\pm$ 0.7	7.9 $\pm$ 0.7	9.0 $\pm$ 1.3
<i>suprachiasmatic n.</i>	5-HIAA	7.1 $\pm$ 0.5	8.1 $\pm$ 0.8	8.7 $\pm$ 0.7	8.5 $\pm$ 0.5
	5-HT	9.2 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 0.6	8.2 $\pm$ 1.0	11.0 $\pm$ 0.9
<i>paraventricular n.</i>	5-HIAA	8.9 $\pm$ 0.7	10.3 $\pm$ 0.4	12.1 $\pm$ 1.1 *	11.8 $\pm$ 0.7 *
	5-HT	15.1 $\pm$ 1.9	12.1 $\pm$ 1.0	14.9 $\pm$ 2.1	13.4 $\pm$ 1.5

animals were killed by decapitation 30 min after the administration. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  SEM of 5-HIAA or 5-HT concentrations (ng/mg protein) of tissues from 5-8 male rats. \*, values from GRP-treated rats that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from vehicle-treated controls.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1.

Dose response of the effects of (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)Bombesin on 5-HIAA concentrations in the paraventricular nucleus in male rats. Rats were injected with (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>-NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin (10, 100 and 1000 ng/rat) or with its saline vehicle (5 µl/rat; icv) and killed by decapitation 30 min later. Columns represent means and vertical lines 1 SEM of plasma 5-HIAA concentrations of tissues from 6-8 rats.

### Figure 2.

Effect of GRP and (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)Bombesin on 5-HIAA concentrations concentrations in male rats. Rats were injected with GRP (10 ng/rat; 5 µl/rat; icv) and/or (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>)Bombesin (1µg/rat; 5 µl/rat; icv) mixed together and killed by decapitation 30 min later. Control rats were injected icv with saline vehicle (5 µl/rat) 30 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines 1 SEM of 5-HIAA concentrations from tissues of 5-8 rats. \*, values from GRP-treated rats that are significantly different (P<0.05) from vehicle-treated controls.

**Figure 3.**

Effect of  $\alpha$ -helical (9-41)CRF on 5-HIAA concentrations in the paraventricular nucleus in male rats. Rats were injected with  $\alpha$ -helical CRF (1, 3 and 10  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ; 5  $\mu\text{l}/\text{rat}$ ; icv) and killed by decapitation 20 min later. Control rats were injected icv with saline vehicle (5  $\mu\text{l}/\text{rat}$ ) 20 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines  $\pm 1$  SEM of 5-HIAA concentrations from tissues of 5-6 rats.

**Figure 4.**

Effect of  $\alpha$ -helical (9-41)CRF on 5-HIAA concentrations in the paraventricular nucleus, and plasma ACTH and corticosterone concentrations in male rats. Rats were injected with  $\alpha$ -helical CRF (10  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ; 5  $\mu\text{l}/\text{rat}$ ; icv) or its saline vehicle (5  $\mu\text{l}/\text{rat}$ ), 35 min before decapitation and exposed to restraint stress (15 min) immediately before decapitation. Control rats were injected icv with  $\alpha$ -helical CRF (10  $\mu\text{g}/\text{rat}$ ; 5  $\mu\text{l}/\text{rat}$ ; icv) or its saline vehicle (5  $\mu\text{l}/\text{rat}$ ) 35 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines  $\pm 1$  SEM of 5-HIAA (panel A), plasma ACTH (panel B) or corticosterone (panel C) concentrations from 5-8 rats. \*, values from saline-treated stressed rats and  $\alpha$ -helical CRF-treated stressed rats that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from vehicle-treated controls. #, values from  $\alpha$ -helical CRF-treated stressed rats that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from saline-treated stressed rats.

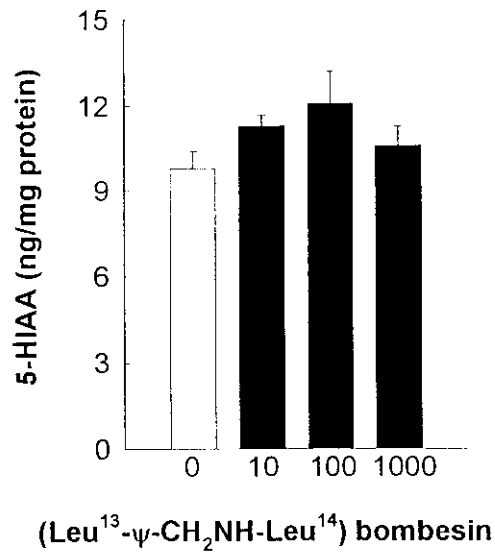
**Figure 5.**

Effect of GRP and  $\alpha$ -helical(9-41)CRF on plasma 5-HIAA concentrations in the paraventricular nucleus in male rats. Rats were injected with  $\alpha$ -helical (9-41)CRF (10  $\mu$ g/rat; 5  $\mu$ l/rat; icv) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat; icv) 20 minutes prior to GRP (10 ng/rat; 5  $\mu$ l/rat icv) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat; icv) administration, and killed 30 minutes after GRP injection. Control rats were injected icv with saline vehicle (5  $\mu$ l/rat) twice, 50 and 30 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  1 SEM of 5-HIAA concentrations from tissues of 5-8 rats. \*, values from GRP-treated rats that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from vehicle-treated controls.

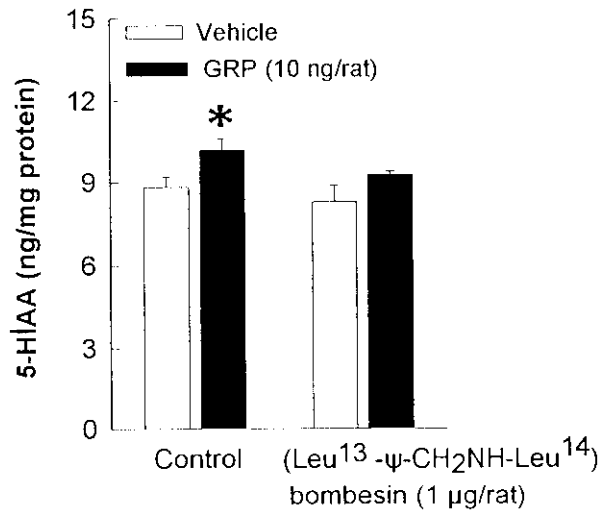
**Figure 6.**

Rats were injected with (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (1  $\mu$ g/rat; 5  $\mu$ l/rat; icv) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat), 45 min before decapitation and exposed to restraint stress (15 min) immediately before decapitation. Control rats were injected icv with (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin (1  $\mu$ g/rat; 5  $\mu$ l/rat; icv) or its saline vehicle (5  $\mu$ l/rat) 45 min prior to decapitation. Columns represent means and vertical lines  $\pm$  1 SEM of 5-HIAA (panel A), plasma ACTH (panel B) or corticosterone (panel C) concentrations from 5-8 rats. \*, values from saline-treated stressed rats and (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin-treated stressed rats that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from vehicle-treated controls. #, values from (Leu<sup>13</sup>- $\psi$ -CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) bombesin-treated stressed rats that are significantly different ( $P < 0.05$ ) from saline-treated stressed rats.

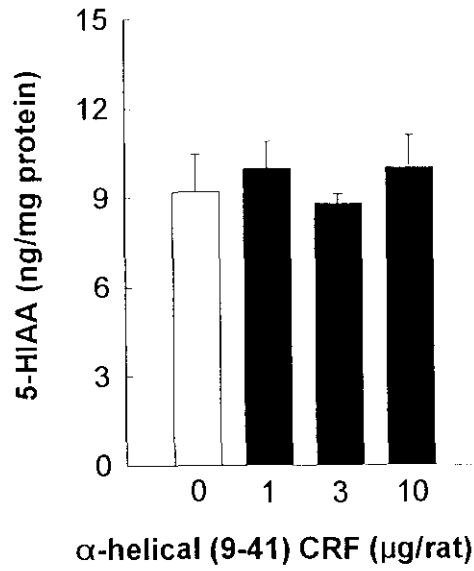
**Figure 1**



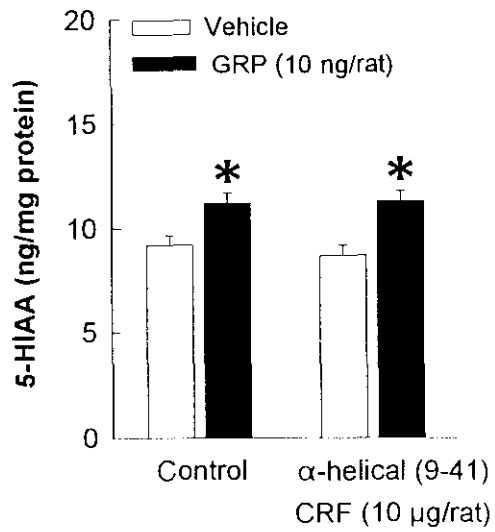
**Figure 2**



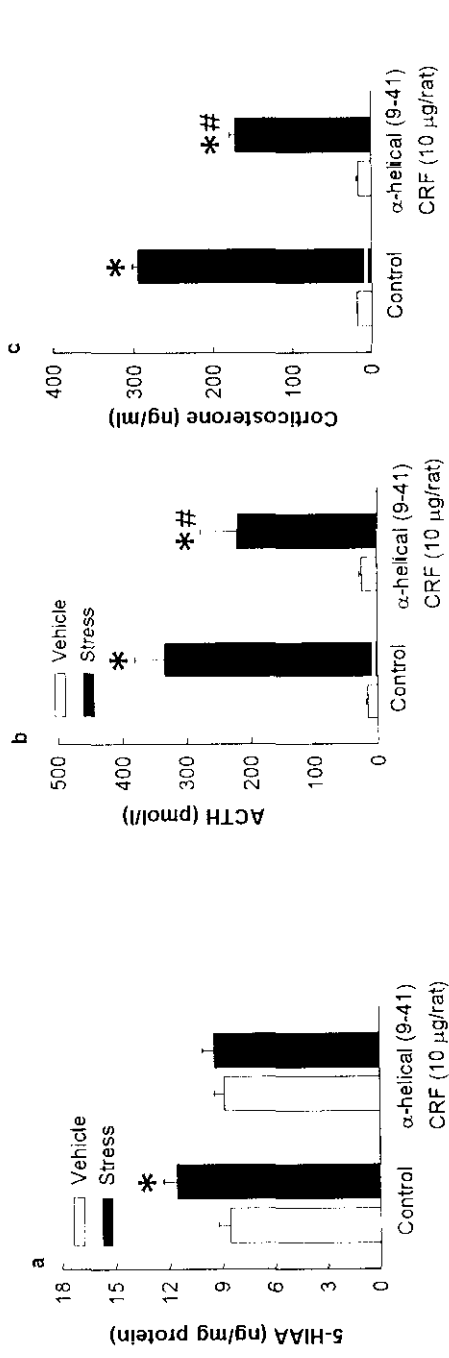
**Figure 3**



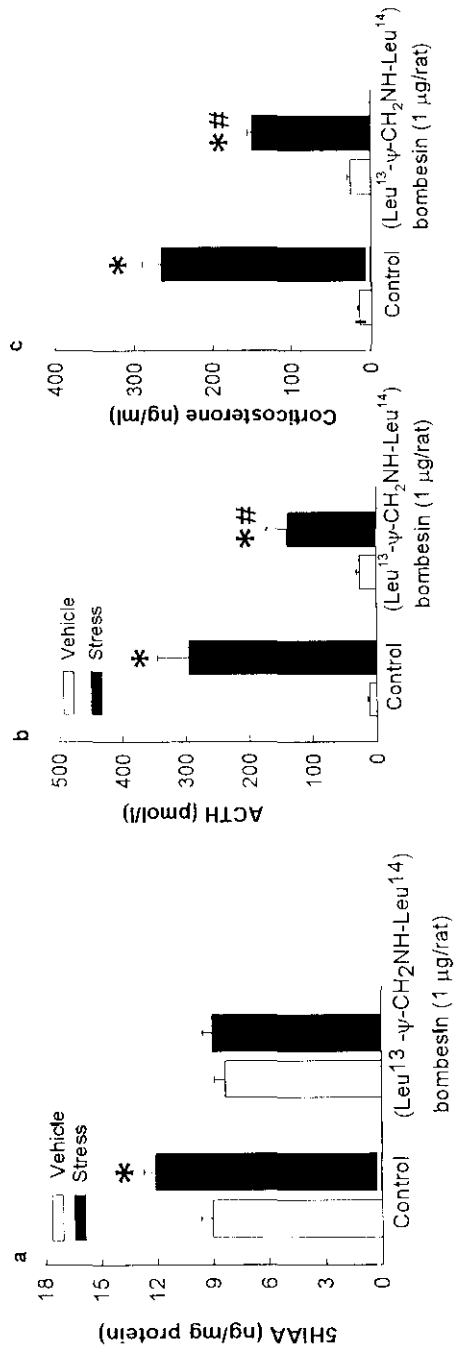
**Figure 5**



**Figure 4**



**Figure 6**



**Index terms:** GRP; Stress; Paraventricular nucleus; 5-hydroxyindoleacetic acid (5-HIAA); 5-hydroxytryptamine (5-HT); ACTH; corticosterone; (Leu<sup>13</sup>-ψ-CH<sub>2</sub>NH-Leu<sup>14</sup>) Bombesin; α-helical (9-41)CRF.