

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**DISTRIBUCION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A
LA INSULINA (IGF-I) Y DE SU RECEPTOR EN CEREBRO DE
RATA ADULTA: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS**

Fernando Aguado Tomás
Madrid, 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

**DISTRIBUCION DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A
LA INSULINA (IGF-I) Y DE SU RECEPTOR EN CEREBRO DE
RATA ADULTA: IMPLICACIONES FISIOLÓGICAS**

Memoria presentada por:
Fernando Aguado Tomás
para optar al grado de Doctor


Madrid, 1994

D^a Lucinda Cacicedo Egüés, Médico Adjunto del Servicio de Endocrinología del Hospital Ramón y Cajal y D. Ricardo Martínez-Murillo, Colaborador Científico del Instituto Cajal (CSIC),

CERTIFICAN: que D. Fernando Aguado Tomás, Licenciado en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo su dirección y en ambas instituciones, el trabajo titulado: "**Distribución del factor de crecimiento semejante a la insulina (IGF-I) y de su receptor en cerebro de rata adulta: implicaciones fisiológicas**", considerando que reúne las condiciones necesarias para optar al Grado de Doctor.

Madrid, 1 de Junio de 1994

V^oB^o DE LOS DIRECTORES

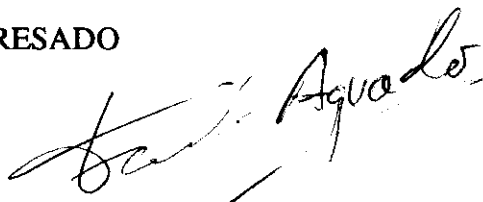


Dra. Lucinda Cacicedo Egüés



Dr. Ricardo Martínez-Murillo

EL INTERESADO



D. Fernando Aguado Tomás

AGRADECIMIENTOS

Ya son más de cinco años los que han transcurrido desde que una mañana entré en las oficinas del FISS para informarme sobre unas becas de iniciación a la investigación. Me dijeron que podía solicitar tres de los proyectos que figuraban en un listado, así que elegí los tres que proponían estudios del sistema nervioso. Más tarde me comunicaron que había sido seleccionado en uno de ellos. Aún no se porque me escogieron a mí (¿el azar?), lo único que se es que desde ese momento una gran parte de mi vida la he invertido en realizar el trabajo que ahora presento como tesis doctoral. Sin lugar a dudas, otra cosa que sí conozco es que han sido muchas las personas que han colaborado, directa o indirectamente, en la elaboración de este volumen, así como que, de algún modo, el trabajo de estos cinco años me han permitido llegar a conocer personas realmente extraordinarias.

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Cacicedo y al Dr. Martínez-Murillo la dirección de esta tesis. Me siento afortunado de haber podido formarme en ámbitos tan diferentes y tan complementarios. Gracias por vuestra dedicación.

Poco honesto sería si el nombre del Prof. Rodrigo no figurase en los primeros lugares de este apartado, ya que la gran mayoría del trabajo realizado en esta tesis la he desarrollado en su laboratorio. Sinceramente aprecio el haberme dado la oportunidad de llevarlo a cabo. Tanto a José Rodrigo como a Ricardo Martínez-Murillo les agradezco los buenos momentos compartidos.

Me sentiría satisfecho si algo de la capacidad de ver más allá de las situaciones del Dr. Sánchez-Franco se me hubiera "pegado", mi reconocimiento por sus consejos y por su valiosa participación en esta tesis.

A Lucinda Cacicedo y Franco Sánchez-Franco les agradezco la oportunidad de haber podido compartir con ellos una celebración donde muchas cosas cambiaron para mí. Lástima que fuera la cena de mi despedida.

A la Dra. Mellström y al Dr. Naranjo mi gratitud por haberme enseñado el uso de técnicas de hibridación, una nueva manera de hacer morfología la cual forma una parte muy importante de la presente tesis.

Mi agradecimiento a la futura Dra. Beatriz Velasco por la realización del ensayo de protección de ribonucleasas, a la Dra. Gajate por su ayuda en la realización de los Western blots, al Dr. Santos por el ADNc de R-IGF-I, a la Dra. Polak por los anticuerpos contra galanina, al Hospital Hammersmith por la donación del material humano y a la ayuda técnica de Lola, Lozano, Mari y Emilia. Al FISS por la concesión de una beca predoctoral para poder realizar el presente trabajo.

A la Dr. Carmen Rúa por la tutoria de esta tesis y por haber sido la primera persona que, confiando en mi, me abrió una puerta en este trabajo.

Mi más profundo agradecimiento a Mar Sánchez, ahora la Dra. Sánchez (ganado a pulso), por todas las buenas cosas que lleva dentro y por haber soportado las peores de mi. Realmente he tenido suerte en haber podido conocerla, ella es una de esas personas extraordinarias.

A mis padres les agradezco su incondicionalidad muy especialmente a Josefina (la madre que me parió) y a toda la energía arrolladora que posee. A mi hermano su confianza.

Habiendo trabajado durante esta tesis en tres laboratorios (trabajo nómada), son muchas las personas que me han ayudado de un modo u otro, pero no cabe duda que Teresa Fernández se lleva la palma. Si no hubiera sido por su apoyo y amistad quizás hubiera tirado la toalla, gracias a ti y a tu parentela, Luis y Nines, por vuestra comprensión y por las risas destornillantes que tanto han ayudado. Otra "pieza clave" ha sido Matilde Achaval, le agradezco su fortaleza, su buen corazón y todo lo mucho que me ayudó.

Del Instituto Cajal mi gratitud a Rosa, Clara, Alfonso, Ana, Alicia, Marga, JJ, Raquel, Yolanda, Michel... y al siempre atento Dr. Buño. Especialmente mi gratitud y admiración para Juan Carlos Cambroner y mi agradecimiento a la generosidad de Joaquín Sancho. Del Pira a todos mis compañeros, muy especialmente a Rosa, Maria Jesus, Constanza, Maite, Judith, Gumer... Del Carlos III a Bea, Puri, Javier y Jose. Y de los cursos de doctorado a los grandes grandes corazones de Carmen Barranechea y Silvia Arribas.

Mi muy muy sincera gratitud al "útil" de Miguel Esteban Busto, a un par de brujas, al buenazo incorregible de Alfonso, a Esther "pelo de colores", al "catalán más generoso del mundo" Antonio, a todos mis amiguetes del "barrio" especialmente a un "oso" y una "pantera"... y a aquellas personas que tanto me han enseñado.

A los Dres Jordi Marsal y Carles Solsona por haberme dado todas las facilidades para poder acabar esta tesis (gracias Carles por tu "insistencia") y a mis nuevos compañeros catalanes (a Paco también) por los ánimos recibidos para terminar con una historia interminable.

Es monstruoso pensar que el mundo es comprensible, o que nosotros mismos somos comprensibles... lo que percibimos es un enigma, un misterio que solo podemos aceptar con humildad y respeto. (C. Castaneda, 1986).

INTRODUCCION

1. EL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO I Y SU RECEPTOR

Una estimulación apropiada del cerebro conduce a dos tipos de movimientos: i) movimientos externos, diseñados para obtener fines deseables y para evitar otros no deseables o dañinos y ii) movimientos internos o pasiones, a través de los cuales la liberación de espíritus animales regulan el corazón, el hígado, y otros órganos. Cuando se encuentra una amenaza con fuerza, la pasión de la ira causa la liberación de espíritus fuertes, mientras cuando se evita, la pasión del miedo causa en el cerebro la liberación de espíritus débiles. Con estas palabras Rene Descartes, en 1669, concebía todo un sistema de señalización química intercelular entre el cerebro y distintas dianas del organismo. De los sistemas de comunicación química, análogos al concebido por Descartes, ha dependido la compleja evolución de los organismos pluricelulares. Dicha comunicación es esencial tanto para fenómenos de crecimiento y división como para coordinar las diversas actividades en el normal funcionamiento de los miles de millones de células de un organismo.

La comunicación química intercelular se basa en la secreción de sustancias que actúan como señales para células situadas a cierta distancia. Esta comunicación ha llegado a ser la función primaria de dos sistemas de órganos interactuantes altamente especializados, el sistema nervioso y el sistema endocrino. Células nerviosas y endocrinas presentan notables diferencias en el modo de su señalización intercelular. Sin embargo, en algunos aspectos, los mecanismos de señalización de ambos sistemas son similares. Muchas de las moléculas de señalización utilizadas por las células endocrinas son también utilizadas por las neuronas, como son las hormonas peptídicas (Hökfelt, 1991).

Las hormonas peptídicas se encuentran ampliamente distribuidas en numerosos organismos y tejidos, pudiendo actuar por diferentes vías de comunicación intercelular (hormona endocrina, factor local, neurotransmisor y neurohormona; Krieger, 1983). Un buen ejemplo de hormonas peptídicas ampliamente distribuidas en los organismos, son los péptidos de la familia de la insulina. Los péptidos relacionados con la insulina han sido detectados en insectos, anélidos, moluscos, protozoos, hongos, plantas con flor e incluso organismos unicelulares como las bacterias (Schuldiner y col., 1991). Dentro de un mismo organismo, los péptidos de la familia de la insulina se hallan distribuidos en numerosos tejidos. Esta ubicuidad parece indicar que, en el curso de la evolución, ante la necesidad creciente de diversificar la señalización intercelular, un relativamente pequeño número de sustancias químicas mensajeras y sus receptores han desarrollado una multiplicidad de papeles

funcionales específicos, pudiendo coordinar diferentes actividades en un mismo organismo (Scharrer, 1987).

En los vertebrados, los péptidos miembros de la familia de la insulina son cuatro: la propia insulina, los factores de crecimiento semejantes a la insulina tipo I y II (IGF-I e IGF-II) y la relaxina (Bolander, 1989a).

El descubrimiento de los IGFs se realizó a partir del análisis independiente y paralelo de tres factores diferentes, cada uno de ellos responsable de diferentes actividades biológicas:

1. Las somatomedinas: factores que mediaban la actividad promotora del crecimiento de la hormona del crecimiento (GH) en el cartílago (Daughaday y col., 1972).

2. Moléculas con actividad similar a la insulina no suprimible (NSILA): factores que estimulaban la captación de glucosa en tejido adiposo, incluso en presencia de antisuero α -insulina (Froesch y col., 1963).

3. Moléculas con actividad estimulante de multiplicación (MSA): factores del suero o medios condicionados que estimulaban la proliferación de células en cultivo (Pierson y Tiemin, 1972) .

La purificación de las somatomedinas de suero humano permitió la identificación de tres fracciones, somatomedina A (Hall, 1972), somatomedina C (Van Wyk y col., 1974) y somatomedina B (Fryklund y col., 1976), esta última se comprobó más tarde que no correspondía a una somatomedina. El análisis de los NSILA de suero humano dio la estructura de los dos IGFs, denominados IGF-I e IGF-II (Rinderknecht y Humbel, 1978a; Rinderknecht y Humbel, 1978b). La somatomedina C se comprobó que era idéntica al IGF-I (Klapper y col., 1983) y la somatomedina A era una mezcla de las dos especies de IGFs (Spencer y col., 1983). La purificación de MSA permitió su identificación con IGF-II (Marquardt y col., 1981). Actualmente se ha adoptado una única terminología: IGF-I e IGF-II.

Los IGFs son péptidos generados probablemente por duplicación. Todos tienen una cadena A y otra B unidas por tres puentes disulfuro. Las mayores diferencias residen en la presencia y longitud del péptido C, así como en la extensión de los terminales amino y carboxilo (Bolander, 1989a). IGF-I e IGF-II tienen un 64% de homología entre si y un 50% cada uno de ellos con la insulina (Daughaday y Rotwein, 1989). A diferencia de la insulina, la cual solo es sintetizada por las células β del páncreas en el adulto, los IGFs son sintetizados por múltiples órganos (D'Ercole y col., 1984). El cuarto miembro de la familia de la insulina, la relaxina únicamente posee un 20-25% de homología con la insulina o los IGFs (Bolander, 1989a). Algunos autores piensan que el factor de crecimiento nervioso

(NGF), con un 15-20% de homología con los IGFs, podría ser otra de las moléculas relacionadas con la familia de la insulina, pudiéndose haber generado por una reduplicación parcial del gen de la proinsulina (Bolander, 1989a). La actividad biológica de esta familia es doble: crecimiento y metabolismo, ambas están interrelacionadas ya que el metabolismo debe ser ajustado para poder realizarse el crecimiento (Froesch y col., 1985). La insulina es fundamentalmente una hormona anabólica, aunque altas concentraciones pueden promover el crecimiento, probablemente a través del receptor de IGF-I (R-IGF-I; Moses y Tsuzaki, 1991). La especificidad de las acciones de estas hormonas viene dada por el tipo de receptor con los que interactúan (Bolander, 1989b). Los receptores de la familia de la insulina presentan similitudes con otros factores de crecimiento (factor de crecimiento epidérmico, EGF; factor de crecimiento derivado de plaquetas, PDGF), pudiendo ser debida a una evolución convergente o a una duplicación de genes con intercambio de dominios (Bolander, 1989b).

1.1. El IGF-I

El IGF-I maduro contiene 70 aminoácidos distribuidos en los dominios: $\text{NH}_2\text{-B-C-A-D}_{\text{COOH}}$ (Foyt y Roberts, 1991; Zapf y col., 1981; Daughaday y Rotwein, 1989). Una importante característica es su alta conservación en la evolución. En la filogenia de IGF-I las sustituciones de aminoácidos son relativamente pocas. Entre los mamíferos la conservación de la secuencia de aminoácidos de IGF-I circulante es mayor del 92%. La mayor parte de las sustituciones suelen estar cercanas al grupo terminal carboxilo (Foyt y Roberts, 1991). En otros grupos de vertebrados, e incluso procordados, ha sido demostrada la presencia de material similar a IGF-I (Reinecke y col., 1991; Kajimoto y Rotwein, 1990; Reinecke y col., 1993). Este péptido es producido mayoritariamente por el hígado, bajo el control de GH, ejerciendo importantes acciones endocrinas (Froesch, 1985). Sin embargo, otros muchos tejidos también son capaces de sintetizarlo, ejerciendo posiblemente acciones autocrinas y/o paracrinas (D'Ercole, 1984).

Al igual que otros péptidos secretables, IGF-I es sintetizado como un precursor (preproIGF-I) el cual contiene un péptido señal (Foyt y Roberts, 1991). Estudios en la caracterización del ADNc de IGF-I, han mostrado la presencia de un quinto dominio en el extremo terminal carboxilo, el péptido E. En el caso de algunas especies como el hombre o la rata, dos tipos de secuencia ADNc han sido descritas, las cuales codifican para dos diferentes péptidos E, originando dos IGF-I diferentes: IGF-Ia y IGF-Ib. Estas diferencias son el resultado de un procesamiento alternativo de los transcritos primarios (Roberts y col.,

1987). El péptido E no forma parte del IGF-I maduro circulante, sino del proIGF-I. Sin embargo, en algunos casos el péptido E se ha encontrado en formas maduras del péptido (Conover y col., 1989). El posible papel del péptido E es desconocido.

El gen que codifica al IGF-I es un único gen con varios exones. En la rata este gen posee más de 70 Kb y está compuesto por 6 exones separados por 5 intrones. Los exones 1 y 2 codifican el péptido señal y secuencias de una región no traducida 5'. El exón 3 codifica el resto de la secuencia del péptido señal y la mayoría del dominio B. El exón 4 codifica el resto del dominio B, el C, el A, el D y los 16 primeros aminoácidos del péptido E. El exón 5 codifica parte del dominio E y el 6 el resto del péptido E y una secuencia de una región no traducida 3'. Existe una regulación de procesamiento alternativo capaz de generar diferentes ARNm, los cuales codifican distintas moléculas prepro-IGF-I o proIGF-I con diferentes péptidos señal o con diferentes péptidos E, que se procesan hacia una misma molécula madura. Es probable que exista un procesamiento, transporte y secreción de la prohormona o de la forma madura característico de cada preproIGF-I. En función del estado de desarrollo y de una manera específica para cada tejido la proporción de cada ARNm puede variar indicando una multitud de funciones para la molécula madura o de algunos de sus precursores (Lund y col., 1991; Adamo y col., 1991a; Gilmour, 1994). La transcripción del gen de IGF-I está controlada por, al menos, dos promotores los cuales originan distintos ARNms (Steenbergh y col., 1993; Adamo y col., 1993; Gilmour, 1994). Otro mecanismo por el cual se generan diferentes tamaños de los ARNm de IGF-I es la presencia de sitios de poliadenilación (Lund y col., 1991; Adamo y col., 1991a).

La necesidad de modular cuidadosamente los niveles de hormona activa bajo diferentes circunstancias (en distintos tejidos y en diferentes estados funcionales) requiere múltiples niveles de control. Estos podrían incluir la síntesis de diferentes especies de ARNm, los cuales pueden ser diferencialmente estables o diferencialmente traducidos. Además la codificación de distintos precursores prepro- y pro-IGF-I por diferentes ARNm puede permitir un control más de la expresión del gen de IGF-I, como puede ser el procesamiento, transporte y secreción del producto primario de la traducción.

1.2. El R-IGF-I

Las acciones biológicas de IGF-I son el resultado de una cadena de eventos, los cuales son iniciados por su interacción con la porción extracelular de una glicoproteína de membrana. La unión del ligando causa cambios alostéricos en la estructura del receptor que son transducidos mediante un segmento transmembrana, el cual activa un dominio catalítico

citoplasmático de la molécula (Werner y col., 1991). La organización del preproreceptor ha sido establecida mediante análisis de secuencia, mostrando la siguiente disposición: NH₂ péptido señal- subunidad α - subunidad β COOH (Maly y Lüthi, 1986; Ullrich y col., 1986). La proteína madura es un heterotetrámero con la conformación β - α - α - β . La subunidad α es totalmente extracelular y contiene una región rica en cisteína y 11 sitios potenciales de glicosilación. La subunidad β es una cadena transmembrana con un dominio intracelular enzimático tirosina quinasa y un sitio de unión para ATP (Morgan y col., 1986). La homología más alta entre los receptores de IGF-I y de insulina reside en el dominio tirosina quinasa, mientras que la más baja se encuentra en los segmentos ricos en cisteína, pudiéndose explicar las diferentes especificidades de los receptores de IGF-I y de insulina por sus ligandos (Werner y col., 1991). Existe una heterogenicidad de R-IGF-I en diferentes tejidos, presentando la α subunidad diferentes afinidades por ¹²⁵I-IGF-I y diferentes pesos moleculares, consecuencias probablemente de una glicosilación diferencial (Gammeltoft y col., 1985).

Los ARNm de R-IGF-I se piensa que derivan de un único gen. En el adulto, los niveles máximos de expresión del transcrito de R-IGF-I son detectados en cerebro, sin observarse ningún mensaje en hígado. El promotor del gen del R-IGF-I parece tener algunas similitudes con los promotores altamente regulados (Werner y col., 1991). Los diferentes R-IGF-I que se han descrito podrían ser el resultado de procesamientos alternativos del ARNm o de maduración postraducional específica de tejido. Sin embargo no puede ser descartada totalmente la posibilidad de la existencia de un segundo gen.

La afinidad de R-IGF-I por IGF-I es aproximadamente 1nM, siendo de 2 a 10 veces menor por IGF-II y de 100 a 500 veces menor por insulina. A su vez el receptor de la insulina, además de por insulina, también presenta afinidad por los IGFs, mientras que R-IGF-II tan solo presenta afinidad por los dos IGFs. La capacidad de IGF-I, IGF-II e insulina de unirse a los distintos receptores hace que, *in vivo*, se puedan solapar las acciones biológicas de estos péptidos. Debido a este "solape", en determinadas ocasiones, los IGFs pueden inducir hipoglucemia y la insulina puede presentar actividad mitogénica (Schuldiner y col., 1991; Werner y col., 1991).

La unión de IGF-I a su receptor induce la autofosforilación de la subunidad β de dicho receptor. Esta fosforilación es dependiente de la concentración de ligando y necesita la presencia de Mn²⁺ y Mg²⁺ATP (Jacobs y col., 1983; Sasaki y col., 1985). Entre los sustratos exógenos de la actividad tirosina quinasa de R-IGF-I destacan los polímeros de ácido glutámico y tirosina (Glu/Tyr (4:1)), S6 ribosomal y proteínas histónicas (Sasaki y col., 1985; Werner y col., 1991). Tanto la autofosforilación como la actividad tirosina quinasa de

R-IGF-I son necesarias para mediar las acciones biológicas de IGF-I. En un principio, mediante el empleo de cultivos celulares, se identificaron una serie de proteínas con tirosinas fosforiladas inmediatamente después de la unión de IGF-I a su receptor (pp185, pp175, pp170 y pp220), sugiriéndose un papel de estos substratos endógenos fosfoproteicos como mediadores de la acción de IGF-I (Roth y col., 1991; Werner y col., 1991). Más recientemente se ha purificado una de las proteínas componentes de la pp185, denominándose el substrato 1 del receptor de insulina (IRS-1), dicho substrato es común para los receptores de insulina y de IGF-I. La unión de IGF-I o insulina a sus receptores provoca la fosforilación del IRS-1, el cual interactúa sobre proteínas que poseen dominios SH2 (*src* homology 2). La quinasa 3' fosfatidilinositol parece ser la principal proteína a la cual se asocia el IRS-1, debido a esta interacción se produce la activación de la quinasa (Keller y col., 1993; Chuang y col., 1993; Myers y col., 1993). Esta activación de la quinasa 3' fosfatidilinositol se ha demostrado que puede ser inhibida por fosfatasa transmembranales (Way y Mooney, 1993). Por último, la quinasa 3' fosfatidilinositol podría ser la responsable de la elevación de los fosfatidilinositol 3,4-difosfato y 3,4,5-trifosfato observada en células tratadas con insulina. Es posible que, además de los fosfatidilinositoles, existan otros substratos de la quinasa 3' fosfatidilinositol aún desconocidos que permitan el desarrollo de la señal inducida por insulina/IGF-I (Keller y col., 1993). El hecho de que IRS-1 sea una señal común tanto para IGF-I como para insulina, hormonas con respuestas fisiológicas diferentes, hace pensar en una posible fosforilación parcial y específica de IRS-1 inducida por cada hormona. Tampoco se descartan interacciones de IRS-1 con diferentes proteínas con dominios SH2, así como la existencia de otras proteínas diferentes de IRS-1 susceptibles a fosforilación por la subunidad β del receptor de IGF-I/insulina (Prager y Melmed, 1993; Myers y col., 1993). Otros autores también relacionan proteínas como ras o la quinasa activada por mitógenos (MAP kinase) con la vía de señalización intercelular inducida por R-IGF-I (Lu y Campisi, 1992; Roth y col., 1991)

Algunos aspectos de las señales mitogénicas inducidas por los receptores de IGF-I y de insulina son similares a las generadas por una familia de moléculas de membrana transformantes, denominadas oncogenes tipo-*src*, los cuales incluyen *v-erb*, *v-fms*, y *neu*. Así pues, se ha sugerido que los receptores de IGF-I y de insulina pudieran representar proto-oncogenes potenciales. En relación a esta potencial acción transformante, se ha demostrado que una sobreexpresión de R-IGF-I en células NIH3T3 puede promover transformaciones neoplásicas dependientes de IGF-I. De todas las proteínas oncogénicas estudiadas, la proteína transformante del virus sarcoma aviar (*v-ros*) parece la más similar a los receptores de IGF-I

y de insulina (Werner y col., 1991).

Al igual que otras hormonas peptídicas, el IGF-I unido a su receptor es internalizado por endocitosis, siendo requerida ciertas secuencias del receptor para este proceso (p.e. NPXY). Tras la internalización de los complejos ligando-receptor, el IGF-I es degradado (Geary y col., 1988; Hsu y col., 1994).

En la mayoría de las células R-IGF-I es un heterotetrámero $\alpha_2\beta_2$. Recientemente, se han descrito en varios tejidos y líneas celulares una subpoblación de receptores híbridos que contienen las subunidades α y β del receptor de IGF-I y las subunidades α y β del receptor de insulina con una configuración $\beta_{IGF-I}-\alpha_{IGF-I}-\alpha_{insulina}-\beta_{insulina}$. Sin embargo, no se conoce el control del ensamblaje de las distintas subunidades, papel biológico, distribución y regulación de estos receptores. La existencia de receptores híbridos podría incrementar las posibles acciones biológicas que parecían restringidas a los ligandos individuales con sus receptores homólogos (Pessin y Frattali, 1993; Jacobs y Moxhan, 1991; Werner y col., 1991).

1.3. Proteínas de unión de los IGFs

Las proteínas de unión de los IGFs (IGFBPs) son moléculas que presentan una alta afinidad por los IGFs y que se encuentran principalmente en líquidos extracelulares, jugando importantes papeles en el control de las acciones de los IGFs (Clemmons, 1991; Baxter, 1991).

Actualmente han sido descritas seis formas diferentes de IGFBPs (IGFBP-1 - IGFBP-6), ubicuamente distribuidas en líquidos extracelulares. Las IGFBPs presentan afinidades muy altas por ambos IGFs, a menudo superiores que las que presentan los receptores de los IGFs por sus ligandos. Debido a que la insulina no se une a estas proteínas, las IGFBPs podría estar implicadas en los mecanismos reguladores diferenciales y coordinados de las acciones de estas dos clases de hormonas (IGFs e insulina). IGFBP-1, -2 y -3 presentan homologías estructurales entre si, como son la presencia de regiones ricas en cisteínas. De estas tres IGFBPs, IGFBP-1 e IGFBP-2, contienen una secuencia Arg-Gly-Asp cerca de su carboxilo terminal, la cual podría mediar su fijación a proteínas de la matriz extracelular, denominadas integrinas (Rosenfeld y col., 1990; Clemmons, 1991).

Las IGFBPs pueden regular: I) la cantidad y el transporte de los IGFs en los compartimentos vasculares, II) el transporte de los IGFs en líquidos intersticiales hacia células y tejidos específicos, III) la cantidad de IGFs disponible para interactuar con sus receptores específicos, IV) el metabolismo de los IGFs en los fluidos intersticiales y V) la acción de los IGF en sus células diana, potenciándola o inhibiéndola (Clemmons, 1991;

Baxter, 1991). Por último, ha sido propuesto que algunas IGFBPs puedan ejercer acciones celulares directas, independientes de los IGFs (Drop y col., 1991)

Los diferentes dominios de los IGFs poseen diferentes funciones, el dominio B (el N-terminal) presenta una gran afinidad por las IGFBPs, mientras que el dominio A es el responsable de su unión a los receptores (Clemmons, 1991). Cuando las IGFBPs y los receptores de los IGFs están presentes conjuntamente en un mismo sistema fisiológico, los IGFs presentes en el medio se unen a IGFBPs o a sus receptores en función de sus afinidades relativas, existiendo un equilibrio mediado por estas afinidades relativas. En condiciones de equilibrio, IGFBP-3 parece ser la IGFBP con mayor afinidad por los dos IGFs, siendo esta afinidad mayor de 10 veces que la de R-IGF-I por ambos IGFs. En todos los casos las afinidades de IGFBPs por los dos ligandos es igual o mayor que la de R-IGF-I por ambos ligandos, indicando que los IGFs se unen preferencialmente a IGFBPs. Tanto el pH como las sales parecen afectar a afinidades de las IGFBPs por los IGFs (Rosenfeld y col., 1990; Clemmons, 1991; Baxter, 1991; Clemmons y col., 1992). Característicamente, ciertas IGFBPs son capaces de adherirse a las superficies celulares. A bajas concentraciones de IGFs, estas IGFBPs controlan, principalmente, la distribución de IGFs entre IGFBPs asociadas a superficies celulares y sus receptores de membrana. A concentraciones altas de IGFs, las IGFBPs libres también compiten por los IGFs del medio. Mediante este mecanismo, las IGFBPs podrían regular la cantidad de IGFs asociados con la superficie de tipos celulares específicos y modular su interacción con el R-IGF-I, regulando finalmente la acción de los IGFs sobre el metabolismo celular (Clemmons, 1991).

Una gran variedad de factores pueden regular la expresión de las diferentes IGFBPs (insulina, IGFs, GH, AMPc, glucocorticoides, progesterona, hormonas tiroideas, estados nutricionales...). Algunos de estos factores también son reguladores de la expresión de los IGFs, aunque también existen factores reguladores específicos de la expresión de las IGFBPs y no de los IGFs (Clemmons y col., 1991; Bale y Conover, 1992).

1.4. Regulación de la expresión de IGF-I y R-IGF-I

Tanto la expresión del ligando IGF-I, como la de su receptor, están sometidas a una regulación multifactorial. Factores hormonales y nutricionales, específicos de cada tejido y de cada época del desarrollo, regulan la expresión del sistema IGF-I (Rotwein, 1991; Rotwein y col., 1993).

Regulación durante el desarrollo

En los distintos tejidos, el ARNm de IGF-I y su receptor son expresados de forma diferencial durante el desarrollo. Durante el crecimiento fetal y postnatal hay una alta expresión de IGF-I y R-IGF-I en numerosos tejidos, el cual probablemente desempeñe una función autocrina y/o paracrina en el crecimiento y desarrollo. En edades postnatales tempranas la producción hepática de IGF-I ARNm llega a ser cuantitativamente predominante, incrementando sus niveles entre 10 y 100 veces desde el nacimiento hasta la edad adulta, siendo IGF-I una importante señal endocrina para el crecimiento longitudinal postnatal. Inversamente a la expresión del IGF-I hepático, sus receptores están presentes en el hígado fetal, pero no en el adulto. La placenta es otro de los mayores productores de IGF-I, siendo su expresión regulada en su desarrollo. La regulación de la expresión de IGF-I y su receptor durante el desarrollo, tanto en el hígado como en tejidos extrahepáticos, es el resultado de la interacción de numerosos factores sistémicos específicos de cada tejido (Adamo y col., 1991b; Bach y col., 1991b).

Regulación por hormonas sistémicas

Uno de los efectos de la unión de GH a sus receptores hepáticos es la estimulación de la síntesis y secreción de IGF-I, el cual es el principal responsable del crecimiento longitudinal. Con la excepción de algunos tejidos como el tracto reproductor femenino, la mayor parte de la producción extrahepática de IGF-I también es regulada por GH, pudiendo actuar IGF-I sintetizado localmente de una manera autocrina y/o paracrina sobre estos tejidos (Adamo y col., 1991b; Rotwein y col., 1993; Fagin y col., 1988).

Otras hormonas circulantes únicamente regulan la expresión del IGF-I que es producido en órganos diana específicos. De este modo, las hormonas folículoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) incrementan la síntesis de IGF-I en testículo y ovario sin incrementar los niveles circulantes de IGF-I (Adamo y col., 1991b; Werner y col., 1991). Los estrógenos son el principal estímulo fisiológico de IGF-I producido en el útero y en las células de la granulosa del ovario, aunque también pueden estimular la producción de IGF-I y su receptor en otros tejidos (Murphy, 1991; Adamo y col., 1991b; Michels y col., 1993). Los glucocorticoides también tienen capacidad de regular IGF-I, su receptor e IGFbps en diversos tejidos (Price y col., 1992; Adamo y col., 1991b). Los efectos inhibidores de los glucocorticoides sobre los niveles del sistema IGF-I descritos por varios autores, podrían explicar los efectos antiproliferativos y retardadores del crecimiento de estas hormonas sobre el organismo. Otras hormonas que pueden regular los niveles de IGF-I y de su receptor incluyen las hormonas tiroideas, paratiroidea y gonadotropinas coriónicas (Werner y col.,

1991; Adamo y col., 1991b; Rodriguez-Arno y col., 1993; Miell y col., 1993).

En ratas diabéticas se produce una resistencia a GH acompañada de un descenso de la síntesis de IGF-I en hígado (LeRoith y col., 1991; Adamo y col., 1991a). Este descenso de IGF-I circulante está asociado con un retraso en el crecimiento total y de órganos específicos. La producción de IGF-I por algunos órganos extrahepáticos también parece estar disminuida en la diabetes, mientras que en otros, como el riñón, está estimulada (Catanese y col., 1993). Estos datos reflejan la importante interacción de la insulina con la expresión de IGF-I. Más recientemente se han implicado a los glucocorticoides como factores reguladores de los niveles de IGF-I durante la diabetes (Unterman y col., 1993). La expresión de R-IGF-I e IGF-BPs también se altera en la diabetes (Werner y col., 1991; Bach y col., 1991a; LeRoith y col., 1991).

Regulación por factores de crecimiento.

Al igual que existe una compleja interrelación entre las hormonas circulantes con el objeto de conseguir un equilibrio en la expresión de cada una de ellas, lo mismo parece ocurrir con otros mensajeros químicos: los factores de crecimiento. Cada vez son más los trabajos que demuestran acciones reguladoras entre diferentes factores de crecimiento, reflejando la importancia de la acción coordinada entre distintos factores de crecimiento. Ha sido propuesto que IGF-I es un mediador de los efectos promotores del crecimiento de otros factores de crecimiento, regulando el crecimiento celular basal (Lowe, 1991). Factores de crecimiento como EGF, factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), factor de crecimiento transformante tipo $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) y PDGF son capaces de regular la síntesis de IGF-I en diferentes tipos celulares (Murray y col., 1993; Canalis y col., 1993). También han sido descritas interacciones cooperativas entre PDGF y FGF con IGF-I en diferentes tipos celulares (Barnea y Cho, 1993a; Nicoll y Russell, 1991; Pfeifle y col., 1987).

Regulación por otros factores

Otros muchos factores como son el calcio intracelular (Hovis y col., 1993), endotoxinas (Fan y col., 1994), prostaglandinas (Raisz y col., 1993)... son capaces de regular la expresión génica de IGF-I en determinados tipos celulares.

Regulación en estados nutricionales alterados.

La síntesis de IGF-I y su receptor es afectada en estados de malnutrición. Durante el ayuno o dietas pobres en proteínas los niveles de IGF-I en suero y su síntesis en hígado

descienden de una manera específica para cada tejido. Este descenso puede ser debido, al menos en parte, a la reducción de los niveles de GH y a la resistencia hepática a dicha hormona (LeRoith y col., 1991; Bach y col., 1991b; Thissen y col., 1994).

Regulación durante neoplasia, diferenciación y regeneración celular

La existencia de líneas celulares y tumores cancerígenos que expresan IGF-I y su receptor ha sugerido la posibilidad que este factor de crecimiento pueda ser regulado e intervenir en procesos cancerígenos (LeRoith y col., 1991). La expresión de IGF-I también ha sido estudiada en varios modelos de diferenciación celular y dediferenciación, observándose que la expresión de IGF-I puede estar en función del grado de diferenciación celular (Adamo y col., 1991b). IGF-I también puede ser inducido por lesiones tisulares y actuar en los procesos de regeneración y reparación de tejidos de un modo autocrino y/o paracrino. IGF-I parece especialmente implicado en la supervivencia y regeneración del sistema nervioso (Mattson y col., 1993), músculo esquelético (Edwall y col., 1989) y en hipertrofias renales (Hirschberg, 1993). En estos casos los niveles de IGF-I son incrementados, ejerciendo una acción local independiente de GH.

Distintos niveles de regulación de la expresión de IGF-I

Todas las posibles regulaciones de la expresión de IGF-I, anteriormente descritas, pueden tener lugar a diferentes niveles a lo largo de la síntesis del péptido, de tal modo que las posibilidades de regulación de la expresión del IGF-I maduro adquieren una enorme complejidad (Adamo y col. 1991a).

A nivel transcripcional, además de una regulación de la expresión del ARNm total de IGF-I, puede darse una regulación diferencial de las distintas especies de ARNMs de IGF-I, por iniciación de diferentes promotores o por procesamiento alternativo, pudiéndose originar múltiples moléculas prepro-IGF-I.

A nivel postranscripcional los posibles niveles de regulación son más numerosos. Ciertas variantes de ARNm de IGF-I presentan una vida media más corta que otras (p.e. la de 7.5 Kb), existiendo una diferente estabilidad de los transcritos. Un modo adicional de regulación podría ser la traducción diferencial de los diferentes transcritos, originando diferentes prepro-IGF-I. El procesamiento del péptido sería otro nivel potencial de regulación de IGF-I, el cual incluiría la escisión de los diferentes péptidos señal y la potencial glicosilación diferencial de las prohormonas. Las distintas formas glicosiladas, podrían presentar diferencias estructurales y un diferente transporte intracelular. Por último, aunque

La capacidad de estimular el transporte de glucosa por IGF-I pudiera estar relacionado con la distribución heterogénea y diferencial en los tejidos de la expresión de subtipos específicos de transportadores de glucosa (Zapf y col., 1981; Lowe, 1991; Froesch y col., 1985).

Además de los efectos metabólicos, IGF-I tiene importantes acciones en la promoción del crecimiento de una gran variedad de tipos celulares, algunas de las cuales son dependientes de GH y otras independientes (de Pablo y col., 1990; LeRoith y col., 1991; Lowe, 1991; D'Ercole, 1991). Para que IGF-I estimule la proliferación celular parece necesario la interacción con otros factores de crecimiento. IGF-I actúa como un factor de progresión, permitiendo la progresión de la fase G_1 del ciclo celular y la iniciación de la síntesis del ADN. Sin embargo, para que una célula salga de la fase G_0 y entre en la G_1 hace falta la actuación de otros factores de crecimiento denominados competentes (PDGF, FGF...). El efecto de IGF-I como factor de progresión parece estimular modificaciones postranscripcionales de proteínas específicas más que la transcripción de estas proteínas. Probablemente otra función de IGF-I durante la fase G_1 sea la estimulación de la producción del ARN ribosomal (Lowe, 1991).

El importante papel que juegan IGF-I y su receptor en el crecimiento embrionario y postnatal ha sido recientemente evidenciado mediante el desarrollo de mutantes a los cuales les ha sido eliminado los genes de IGF-I y de R-IGF-I. Los mutantes para R-IGF-I mostraban una severa deficiencia en el crecimiento y fallecían en el momento del nacimiento. Algunos de los mutantes para IGF-I lograban sobrevivir, aunque mostraban importantes deficiencias en el desarrollo y crecimiento (Liu y col., 1993; Baker y col., 1993).

IGF-I juega un papel crítico en el crecimiento y desarrollo. Sin embargo, la persistencia de la expresión de IGF-I en el hígado y otros tejidos extrahepáticos en el individuo adulto que han finalizado su crecimiento hace pensar en otras posibles acciones de IGF-I. Recientemente se ha demostrado que IGF-I en el adulto puede estar implicado en reparación y regeneración de tejidos. El músculo esquelético y el sistema nervioso parecen ser de los tejidos que responden a la acción regeneradora de IGF-I durante lesiones. En etapas adultas, IGF-I también ha sido relacionado con procesos inflamatorios, donde su cooperación con otros factores de crecimiento, como es el PDGF, parece ser fundamental (Lowe, 1991). Por otra parte, la potente acción mitogénica de IGF-I ha sugerido que este péptido pueda estar implicado en procesos tumorales (Prager y col., 1994).

Actualmente se están buscando posibles aplicaciones terapéuticas de IGF-I. Determinados casos de diabetes, insensibilidad a GH, osteoporosis, inmunodeficiencia, neuropatía periférica y fallo renal podrían ser algunos candidatos a las aplicaciones clínicas

de IGF-I (Froesch, 1993; Bondy, 1994).

2. IGF-I Y R-IGF-I EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL (SNC)

2.1. IGF-I, su receptor e IGFbps en SNC

Hasta hace relativamente muy poco tiempo, la posibilidad de que el SNC pudiera sintetizar péptidos relacionados con la insulina, incluido IGF-I, había sido tema de polémica (Baskin y col., 1988). La síntesis de IGFs por el SNC, hoy en día esta bien establecida (Hepler y Lund, 1990; Bondy y Lee, 1993). Sin embargo, la posible síntesis de insulina sigue siendo discutida (Schechter y col., 1994; Devaskar y col., 1994; Heidenreich, 1991).

En el SNC de varios mamíferos, incluido humanos, IGF-I ha sido aislado (Sara y col., 1982; Yamaguchi y col., 1990; D'Ercole y col., 1984; Sara y col., 1986; Carlsson-Skiwirut y col., 1986). Curiosamente, la única especie del péptido detectada en cerebro humano ha sido una forma truncada de IGF-I (*des(1-3)-IGF-I*), la cual carece del tripéptido terminal del dominio B (Gly-Pro-Glu, GPE) (Sara y col., 1986; Sara y col., 1989; Carlsson-Skiwirut y col., 1986). Se postula que esta modificación del N-terminal se debe a modificaciones postraduccionales de la hormona, pudiendo representar *des(1-3)-IGF-I* y GPE dos formas finales de la misma proteína. El IGF-I truncado presenta una mayor actividad biológica que el péptido IGF-I intacto, probablemente debido a que este *des(1-3)-IGF-I* pierde su capacidad de unirse a IGFbps. Al no poder unirse a sus proteínas de unión, este péptido truncado presenta una vida media más corta, pero a su vez una mayor disponibilidad para sus receptores (Sara y Carlsson-Skiwirut, 1990). Ha sido descrita la presencia de IGFs en el líquido cefalorraquídeo (LCR), siendo mayoritaria la presencia de IGF-II respecto a los niveles encontrados de IGF-I (Haselbacher y Humbel, 1985).

Mediante técnicas bioquímicas se ha podido detectar el ARNm de IGF-I en áreas del SNC de humanos y roedores (Rotwein y col., 1988; Sandberg y col., 1988; Bach y col., 1991a). Al igual que en otros tejidos extrahepáticos, la especie del ARNm de IGF-I que predomina en cerebro de rata es IGF-Ia.

Además del demostrado origen endógeno de IGF-I en SNC, ha sido propuesta una posible entrada del péptido circulante a través de la barrera hematoencefálica. Se ha demostrado que las células endoteliales de cerebro presentan R-IGF-I, los cuales son capaces de internalizar principalmente IGF-II y en menor medida IGF-I (Rosenfeld y col., 1987; Frank y col., 1986; Pardridge, 1986; Duffy y col., 1988).

Mientras que los niveles de IGF-I y de su ARNm en SNC son bastante moderados, la expresión de sus receptores en tejidos nerviosos es de las más elevadas dentro del

organismo, estando presentes en neuronas, células de glia y endoteliales (Werner y col., 1991). Característicamente, debido a un patrón diferente de glicosilación, la subunidad α de R-IGF-I encontrado en cerebro es algo más pequeña que la de otros tejidos. Estos receptores de menor tamaño han sido descritos en neuronas, mientras que el R-IGF-I presente en células de glia y endoteliales son del mismo tamaño que los aislados en tejidos periféricos (Burgess y col., 1987, Shemer y col., 1987, McElduff y col., 1988, Heidenreich y col., 1986). En cultivos primarios de neuronas, ha sido demostrado que una vez unido el ligando a su receptor se produce una endocitosis y degradación del péptido (Nielsen y col., 1990), probablemente desencadenando mecanismos celulares semejantes a los descritos en otros tejidos. En este último sentido, muy recientemente se ha descrito la expresión del ARNm de IRS-1 en SNC, localizándose en neuronas (Baskin y col., 1994).

En cuanto a la presencia de IGFbps en SNC, Binoux y col., (1981) fueron los primeros que las describieron en explantes de tejido nervioso. Más tarde se ha comprobado que tanto el LCR como el parénquima nervioso presentan IGFbps, pudiendo ser sintetizadas tanto por astrocitos como por neuronas en cultivo (Clemmons, 1991). Aunque en distintas cantidades y presentando diferentes patrones de distribución, la expresión de los ARNm de varias IGFbps han sido localizadas en distintos derivados de la placa neural (Rosenfeld y col., 1988; Stenvers y col., 1994; Bach y col., 1993; Bondy y Lee, 1993b; Brar y Chernausek, 1993; Green y col., 1994). Al igual que en otros tejidos, en el SNC las IGFbps podrían modular y dirigir las acciones biológicas de los IGFs.

2.2. Distribución de IGF-I y R-IGF-I en SNC

Cultivos celulares, tanto neuronas como neuroglia, son capaces de producir IGF-I-inmunoreactivo (-IR; Kiess y col., 1984; Pons y Torres-Alemán, 1992). Estudios realizados *in vivo* también han demostrado la presencia de IGF-I en SNC. Análisis de las concentraciones de IGF-I en extractos ácidos de SNC de mamíferos han mostrado que el bulbo olfativo, hipotálamo, cerebelo y corteza cerebral son las áreas cerebrales que presentan un mayor contenido de IGF-I-IR (Sara y col., 1982; Yamaguchi y col., 1990). Respecto a los estudios inmunocitoquímicos, los resultados presentados hasta el momento no son muy homogéneos. El primer estudio detallado de la localización de IGF-I en SNC adulto fue realizado por Noguchi y col. (1987) donde encontraban un gran número de neuronas positivas para IGF-I en numerosas áreas del cerebro anterior, a excepción de la corteza cerebral. Posteriormente Hansson y col. (1988b), tras administración de colchicina a ratas adultas, únicamente hallan inmunoreactividad para IGF-I en las motoneuronas del asta anterior de la

médula espinal y en células de Purkinje del cerebelo. Más recientemente, García-Segura y col., (1991) encuentran inmunoreactividad para IGF-I en SNC adulto en células endoteliales, eminencia media, y algunas neuronas del núcleo arcuato, mientras que tras la administración de colchicina numerosas áreas presentaban IGF-IR. Si bien la inmunoreactividad para IGF-I en SNC adulto ha sido localizada principalmente en neuronas y endotelios (Andersson y col., 1988; Hansson y col., 1988b; García-Segura y col., 1991), durante el desarrollo y lesiones también es detectada en células gliales (Andersson y col., 1988; Hansson y col., 1988b; García-Segura., 1991; Komoly y col., 1992; García-Estrada y col., 1992).

En cuanto a la expresión del ARNm de IGF-I en SNC, las distintas técnicas empleadas han mostrado notables diferencias en los resultados obtenidos. Mediante técnicas de Northern blot algunos autores han sido capaces de detectar expresión del ARNm de IGF-I en tejidos nerviosos en desarrollo (Lund y col., 1986; Ballotti y col., 1987), sin que otros autores fueran capaces de detectarla en el adulto (Lowe y col., 1987). Mediante la aplicación de técnicas de hibridación más sensibles que el Northern blot, como es el ensayo de protección de ribonucleasas, se ha demostrado que neuronas y células de glia en cultivo, así como extractos de cerebro, expresan el ARNm de IGF-I (Rotwein y col., 1988). En SNC adulto los niveles de expresión más altos corresponden con la médula espinal, bulbo olfativo y cerebelo (Rotwein y col., 1988). Sin embargo, la aplicación de técnicas de hibridación *in situ* han mostrado que la expresión del gen de IGF-I es muy baja y restringida a muy pocas áreas. Werther y col. (1990) describieron por primera vez la localización del ARNm de IGF-I en el cerebro de rata adulta, donde los transcritos fueron hallados únicamente en el bulbo olfativo, hipocampo y cerebelo. Sin embargo, estudios de hibridación *in situ* posteriores (Bondy, 1991) no han reproducido los resultados anteriores. En este último trabajo, la señal de hibridación para el ARNm de IGF-I en SNC adulto se localizaba en bulbo olfativo, corteza piriforme, colículos superiores, oliva superior y células de Purkinje del cerebelo. Mientras que en el adulto los transcritos del gen de IGF-I detectados por hibridación *in situ* son observados en muy pocas áreas, durante el desarrollo su distribución es mucho más amplia, localizándose principalmente en neuronas (Bondy, 1991; Bartlett y col., 1991a,b; Lee y col., 1992b).

Los primeros estudios de distribución de R-IGF-I en SNC de roedores y humanos se realizaron mediante técnicas autoradiográficas de unión de ligando marcado. Estos trabajos mostraron las densidades más altas de receptores en plexos coroideos, eminencia media e hipófisis y niveles más moderados en bulbo olfativo, hipocampo, cerebelo e hipotálamo

(Bohanon y col., 1986; Lesniak y col., 1988; Araujo y col., 1989; Matsuo y col., 1989; Bassas y col., 1989; Adem y col., 1989; Kar y col., 1993b). Debido a que el SNC también expresa otras moléculas con afinidad por IGF-I, los resultados obtenidos en los estudios autoradiográficos de unión de ligando marcado puedan reflejar, además de R-IGF-I, receptores de IGF-II, de insulina e IGF-BPs. La aplicación de técnicas de hibridación *in situ* usando sondas complementarias al ARNm de R-IGF-I elimina las posibles reacciones de cruce entre R-IGF-I y otras proteínas ligadoras de IGF-I.

Recientemente han sido publicados varios estudios de localización del ARNm de R-IGF-I en SNC mediante técnicas de hibridación *in situ* (Marks y col., 1991; Bondy y col., 1992). En general, estos estudios están en concordancia con los trabajos de autoradiografía de receptores, aunque las diferencias más notables se hallaron en áreas hipotalámicas, más concretamente en la eminencia media. Por otra parte, mientras que tanto neuronas como células de glia en cultivo presentan R-IGF-I y su ARNm (Shemer y col., 1987; Baron-Van Evercooren y col., 1991), los estudios de hibridación *in situ* muestran que el ARNm del R-IGF-I se localiza fundamentalmente en somas neuronales.

2.3. Regulación de la expresión de IGF-I y R-IGF-I en SNC

En SNC la expresión de IGF-I y la de su receptor es altamente regulada durante el desarrollo (Rotwein y col., 1988; Bondy, 1991; Bach y col., 1991a,b; Garcia-Segura y col., 1991). Aunque R-IGF-I es regulado durante el crecimiento, en el adulto se expresa abundantemente en muchas áreas del SNC (Marks y col., 1991; Bondy y col., 1992). Por el contrario, la expresión de IGF-I experimenta una dramática disminución al llegar a la madurez (Bondy, 1991; Garcia-Segura y col., 1991.), siguiendo patrones de expresión específicos para cada región del SNC (Bach y col., 1991a,b). En épocas postnatales tempranas se observa un máximo en la expresión de IGF-I, principalmente en zonas donde persiste la neurogénesis y donde se origina la sinaptogénesis (Bartlett y col., 1991a,b; Bondy, 1991).

Como mencionamos anteriormente, GH estimula la síntesis de IGF-I en múltiples tejidos. En SNC no está del todo clara esta acción de GH sobre la producción de IGF-I endógeno (Adamo y col., 1991a). Sin embargo, existen varios estudios que apoyan esta hipótesis. Existe una dependencia del ARNm de IGF-I por GH en cerebro de ratones deficientes en GH (Mathews y col., 1986). La hipofisectomía reduce la expresión del IGF-I hipotalámico, la cual es restaurada tras administración subcutánea de GH (Wood y col., 1991). Por último la administración intracerebroventricular (icv) de GH también incrementa

los niveles de expresión de IGF-I en cerebro (Hynes y col., 1987). Otras hormonas circulantes como son glucocorticoides y hormonas tiroideas también parecen regular la expresión de IGF-I en tejidos nerviosos, al menos en cultivos primarios (Adamo y col., 1988; Binoux y col., 1985). Además ciertos factores de crecimiento pueden modular los niveles de IGF-I células nerviosas cultivadas (Pons y Torres-Alemán, 1992).

Dentro del SNC diversos tipos de lesiones pueden inducir la expresión de IGF-I y de su receptor (Hansson y col., 1988a; Komoly y col., 1992; Lee y col., 1992a; García-Estrada y col., 1992; Yamaguchi y col., 1991; Kar y col., 1993a). En algunos casos el significado de esta regulación es la de actuar como un factor trófico para la supervivencia y mantenimiento de las células nerviosas (Gluckman y col., 1992).

Recientemente ha sido descrita la presencia de IGF-I y su ARNm en diversos tumores cerebrales (gliomas, estesioneuroblastoma y oligodendrogliomas). A diferencia del tejido cerebral normal, donde principalmente se encuentra ARNm del IGF-Ia, los transcritos encontrados en tumores correspondían a las dos especies de IGF-I, IGF-Ia e IGF-Ib. La presencia de IGF-I en tumores cerebrales junto a la expresión diferencial de sus ARNm ha sugerido una participación autocrina o paracrina de este factor en el crecimiento celular del tumor (Sandberg-Nordqvist y col., 1993).

2.4. Acciones de IGF-I en SNC

Al igual que en otros tejidos, las acciones propuestas de IGF-I en SNC podrían agruparse dentro de tres categorías: i) acciones tróficas, ii) acciones metabólicas y iii) acciones especializadas específicas del tejido nervioso: neuromodulación.

Existen evidencias experimentales que apoyan acciones de IGF-I en SNC para cada una de estas tres categorías. Este péptido no es el único mensajero químico al cual se le han atribuido papeles funcionales tan diferentes como son el trofismo y la neuromodulación. Si revisamos la bibliografía encontraremos que, bajo ciertas circunstancias, neurotransmisores clásicos como son GABA o serotonina y hormonas péptidicas como la hormona adrenocorticotropa (ACTH) o la hormona estimulante de los melanocitos (MSH) pueden actuar como señales reguladoras del crecimiento (Lauder, 1993; Redburn y Schousboe, 1987; Strand y col., 1991). Por otro lado, factores de crecimiento como el EGF pueden ejercer acciones neuromoduladoras (Plata-Salamán, 1991). Estos datos parecen indicar que los mensajeros químicos del SNC pudieran no tener una total rigidez en el tipo de acciones funcionales que pudieran ejercer.

De nuevo y del mismo modo que en otros tejidos, IGF-I en SNC parece ejercer

algunas de sus acciones interaccionando con otros factores de crecimiento. De todos los factores de crecimiento presentes en el SNC, el NGF y el FGF han sido los dos factores más estudiados hasta el momento en relación a sus interacciones con IGF-I (Ang y col., 1993; Werther y col., 1993; Pons y Torres-Alemán, 1992; Torres-Alemán y col., 1990b; Mill y col., 1985; Recio-Pinto y col., 1984; Frödin y Gammeltoft, 1994).

El IGF-I como factor neurotrófico.

El sencillo término de neurotrofismo engloba toda una serie de complejas y diferentes acciones en las que se incluyen supervivencia, división, desarrollo y diferenciación de las células nerviosas, así como el mantenimiento y la regeneración de las mismas. En los últimos años se han realizados numerosos estudios *in vitro* (líneas celulares clonadas, cultivos primarios, explantes, etc.) e *in vivo* de tejidos nerviosos, demostrando que IGF-I ejerce diversas acciones en el crecimiento y desarrollo de células nerviosas. Estos trabajos han permitido considerar a IGF-I como un importante factor neurotrófico, tanto durante el desarrollo como en edades adultas.

La supervivencia de una serie de neuronas y células de glia en cultivo requiere la presencia de dosis bajas de IGFs o dosis altas de insulina (Ekström y col., 1993; Aizenman y de Vellis, 1987; Torres-Aleman y col., 1990a; Beck y col., 1993; Werther y col., 1993; Torres-Aleman y col., 1992; Haselbacher y col., 1989; Recio-Pinto y col., 1986; Hughes y col., 1993; Schumacher y col., 1993), muy probablemente por la interacción de estos péptidos con el R-IGF-I (Masters y Raizada, 1993). La activación de R-IGF-I promueve el crecimiento celular, incluyendo la inducción de la síntesis de ácidos nucleicos y de mitogénesis (Lenoir y Honegger, 1983; Shemer y col., 1987; DiCicco-Bloom y Black, 1988; Sara y Carlsson-Skwirut, 1988; McMorrisA y Dubois-Dalcq, 1988).

La administración de IGFs o insulina en cultivos de neuronas promueve la formación de neuritas y un incremento en los niveles del ARNm de tubulinas (Ang y col., 1993; Fernyhough y col., 1993; Mill y col., 1985; Recio-Pinto y col., 1986; Recio-Pinto e Ishii, 1988; Fernyhough y col., 1989). Debido a que los IGFs son requeridos como factores de supervivencia para estos tipos celulares, en ocasiones es difícil establecer si los efectos en la formación de neuritas son diferentes de los de supervivencia.

Además de jugar un papel en la supervivencia, división y formación de prolongaciones en células neurales, IGF-I también participa en procesos de diferenciación. IGF-I es un factor diferenciador para precursores catecolaminérgicos en cultivo (Xue y col., 1988). En la línea celular SH-SY5Y, procedente de neuroblastoma humano, IGF-I promueve

la diferenciación de estas neuronas disminuyendo los niveles del ARNm del factor de transcripción asociado con la proliferación *c-myc* y aumentando la expresión del gen de la proteína asociada a los conos de crecimiento-43 (GAP-43; Palman y col., 1991; Sumantran y Feldman, 1993).

IGF-I promueve el desarrollo de las células de glia en cultivo, fundamentalmente de oligodendrocitos (McMorris y col., 1986; van der Pal 1988). La unión de IGF-I a su receptor (Masters y col., 1991) induce diferenciación de las células de glia no diferenciadas en cultivo, principalmente, hacia oligodendrocitos (McMorris y col., 1988) e incrementa los niveles de la proteína básica de la mielina (Saneto y col., 1988). Durante estados de malnutrición disminuyen los niveles circulantes de IGF-I (Thissen y col., 1994), produciéndose una hipomielinización del cerebro en periodos críticos del desarrollo (Wiggins, 1982). Estos trabajos apuntaban hacia un importante papel de IGF-I en el desarrollo y producción de mielina de los oligodendrocitos. Más recientemente se ha podido comprobar la implicación de IGF-I en fenómenos de mielinización *in vivo*. Por un lado, Komoly y col. (1992) demostraron un incremento en la síntesis de IGF-I y su receptore, en astrocitos y oligodendrocitos respectivamente, en animales sometidos a desmielinización experimental. Por otro lado, ratones transgénicos para IGF-I presentan un cerebro mayor que los controles y un importante aumento en la cantidad de mielina, sin estar modificado el número de oligodendrocitos (Carson y col., 1993).

Varios autores han relacionado a los IGFs con fenómenos de sinaptogénesis. Durante la sinaptogénesis del músculo esquelético se produce un incremento en los niveles del ARNm de IGF-II del músculo, disminuyendo durante el período de eliminación de sinápsis. Posterior denervación del músculo induce expresión de IGF-II, al tiempo que se forman nuevas sinápsis (Ishii, 1989). La aplicación exógena de IGF-I en músculo durante el período de eliminación de sinápsis previene el descenso de las GAP (Caroni y Becker, 1992).

En cuanto al posible papel fisiológico de IGF-I en lesiones y regeneración del SNC, los principales sistemas estudiados han sido las neuronas motoras espinales y la corteza cerebral. IGF-I previene la muerte neuronal e incrementa la actividad de la acetiltransferasa de motoneuronas en cultivo. *In vivo* reduce la muerte de neuronas motoras tanto durante la muerte programada del desarrollo como en axotomía y seccionamiento de la médula espinal. También es capaz de incrementar la ramificación de las placas motoras y de originar regeneración, la cual es inhibida por la perfusión de anticuerpos contra IGF-I. Todo ello ha conducido a proponer a IGF-I como posible tratamiento terapéutico en afecciones de las neuronas motoras (Lewis y col., 1993; Ishii y Marsh, 1993; Glazner y col., 1993; Hansson

y col., 1988a; Caroni y Grandes, 1990; Sjoberg y Kanje , 1989). Como modelo de lesión de la corteza cerebral se ha utilizado la isquemia local. Tras la lesión, varios autores han demostrado que las áreas dañadas contienen numerosos astrocitos que sintetizan IGF-I. Además de incrementarse la expresión de IGF-I, se induce la expresión de IGF-II, de los receptores de ambos IGFs y la de las IGFs 2,3,4 y 5. La administración icv de IGF-I exógeno, después de originar la lesión, reduce la muerte neuronal, sugiriendo que este péptido podría tener un potencial uso terapéutico en lesiones del cerebro (Gluckman y col., 1992; Klempt y col., 1992; Beilharz y col., 1993; Lee y col., 1992a).

Un posible papel de IGF-I en lesiones del SNC también ha sido propuesto para otras áreas, como es el caso del hipocampo (Yamaguchi y col., 1991; García-Estrada y col., 1992; Kar y col., 1993a).

El IGF-I como neuromodulador

A diferencia de los abundantes estudios realizados proponiendo un posible papel neurotrófico de IGF-I en SNC, un reducido número de trabajos sugieren que IGF-I participe en fenómenos de neuromodulación.

El primer estudio donde se implicó a IGF-I en la regulación de la neurotransmisión fue realizado por Nilsson y col. (1988). Estos autores encontraron que IGF-I estimulaba la liberación de acetilcolina evocada por potasio en rebanadas de corteza cerebral. Posteriormente, el mismo grupo demuestra que el tripéptido aminoterminal de IGF-I, GPE, potencia la liberación de acetilcolina en corteza cerebral y de dopamina en estriado, pudiendo unirse a los receptores de glutamato del tipo NMDA (Sara y col., 1989). Finalmente, estos autores observan que la liberación de la acetilcolina es estimulada por IGF-I(1-70) y más potentemente por GPE, pero no por des(1-3)-IGF-I (Nilsson-Hakansson y col., 1993). Los autores proponen que a partir de un único IGF-I(1-70), por procesamiento posttranscripcional, se originen des(1-3)-IGF-I y GPE, estando el primer péptido implicado en fenómenos tróficos, mientras que GPE lo estaría en neuromodulación (Sara y Carlsson-Skiwirut C, 1990).

Otros grupos han descrito que IGF-I también puede reducir la liberación de acetilcolina en rodajas de hipocampo (Araujo y col., 1988) y disminuir la actividad de la enzima colina acetiltransferasa en cultivos de estriado (Brass y col., 1992). Referente a otros neurotransmisores, IGF-I disminuye la liberación de GABA inducida por glutamato en el cerebelo (Castro-Alamancos y Torres-Alemán, 1993). Por último, se ha demostrado que des(1-3)-IGF-I ejerce una potente acción inductora en la producción del neuropeptido Y (Barnea y col., 1993b).

El mecanismo por el cual IGF-I puede ejercer sus acciones neuromoduladoras es desconocido. Nilsson y col. (1988) en un principio propusieron que el efecto del péptido sobre la liberación de acetilcolina pudiera estar relacionado con la apertura de canales de Ca^{2+} . En este sentido ha sido demostrado que IGF-I incrementa las corrientes de Ca^{2+} en neuronas cultivadas de la línea NxG (Kleppisch y col., 1992). El incremento en las corrientes de Ca^{2+} pudiera estar relacionado con los efectos neuromoduladores del péptido, o incluso con aquellos otros promotores del crecimiento.

El IGF-I como regulador del metabolismo.

En cultivos primarios de células astrogiales o neuronas, se ha demostrado que IGF-I es capaz de incrementar la expresión de transportadores de glucosa en ambos tipos celulares, pero únicamente estimula la incorporación de glucosa y los niveles de glucógeno en astrocitos (Werner y col., 1988; Dringen y Hamprecht, 1992).

2.5. IGF-I en sistemas neuroendocrinos

IGF-I ejerce un control en la síntesis y liberación de GH, LH, FSH, prolactina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) hipofisarios (Melmed, 1989; Morita y col., 1987; Yamashita y Melmed, 1986; Goodyer y col., 1986; Kanematsu y col., 1991; Lara y col., 1994), además inhibe la liberación de GH inducida por el factor de liberación de GH (GRF; Ceda y col., 1987). Varios autores han propuesto que el IGF-I del SNC, más concretamente el hipotalámico, puede influir la liberación de GH (Berelowitz y col., 1981; Tannenbaum y col., 1983). Sin embargo, más recientemente se ha sugerido que el regulador central de GH sería IGF-II y no IGF-I (Spencer y col., 1993).

A nivel hipotalámico, IGF-I modifica la liberación de somatostatina (SOM) (Berelowitz y col., 1981) y de la hormona liberadora de LH (LHRH; Hiney y col., 1991) y regula los niveles de los ARNm de SOM y GRF (Sato y Frohman, 1993).

Estas acciones de IGF-I sobre hormonas hipofisarias y factores de liberación hipotalámicos, junto con la abundancia y localización de R-IGF-I en el eje hipotálamo-hipofisario, ha permitido proponer un posible papel neuromodulador y/o neuroendocrino del IGF-I hipotalámico (Berelowitz y col., 1981; Tannenbaum y col., 1983; Wodd y col., 1991; Sato y Frohman, 1993).

De las acciones reguladoras de IGF-I sobre hormonas hipofisarias y factores de liberación hipotalámicos, la inhibición de la síntesis y liberación de GH es el mejor

establecido y se interpreta como un posible control de retroalimentación negativo ejercido por IGF-I (Melmed, 1989).

En base a la acción inhibitoria de IGF-I sobre GH, junto con la posible implicación del IGF-I hipotalámico, nos propusimos estudiar la posible regulación y participación del IGF-I central en situaciones de disminución de la secreción de GH, como son el envejecimiento y diabetes mellitus.

Con el envejecimiento se producen importantes alteraciones en el eje GH-IGF-I, disminuyendo la síntesis y liberación de GH, IGF-I (Cohen y col., 1992; López, 1994) y de los dos factores hipotalámicos que principalmente controlan la liberación de GH: SOM y GRF (Sonntag y col., 1986; Sonntag y col., 1981; Hoffman y Sladek 1980; Morimoto y col., 1988; Sonntag y col., 1990; Wang y col., 1993; DeGennaro y col., 1989; Deslauriers y col., 1991).

Por otra parte se conoce que la administración de estreptozotocina (STZ) provoca la destrucción selectiva de las células β del páncreas, originando un modelo de diabetes mellitus dependiente de insulina (Rakienten y col 63, Kim y Steinberg 84). El déficit de insulina circulante, así como la hiperglucemia inducida, causan importantes desajustes funcionales. Una de las modificaciones originadas en este modelo de diabetes es la alteración del crecimiento (González y Jolin 1985), acompañada de una notable disminución en la síntesis y secreción de GH, así como de su respuesta al GRF (González y Jolin 1985; Tannenbaum 1981; Ndon y col., 1992). Además, se produce una dramática disminución de la expresión de IGF-I y su ARNm en órganos periféricos, la cual es independiente de los niveles circulantes de la GH (Fagin y col., 1989; Olchovsky y col., 1991) y dependiente en cierta medida de glucocorticoides (Unterman y col., 1993).

OBJETIVOS

Considerando la posible acción autocrina y/o paracrina de IGF-I en el SNC y su relación con el sistema neuroendocrino, los objetivos iniciales de la presente tesis fueron los siguientes:

1. Analizar la localización celular del péptido IGF-I y su ARNm en el SNC de la rata adulta mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas y de hibridación *in situ*.
2. Analizar la localización celular del ARNm de R-IGF-I en el SNC de la rata adulta empleando técnicas de hibridación *in situ*.
3. Examinar la posible regulación de IGF-I en áreas concretas del SNC durante situaciones de disminución de la secreción de GH. Como modelos experimentales se eligieron el envejecimiento y la diabetes mellitus. Modelos con una disminución de los niveles de GH bien establecida en la rata.
4. Estudiar el posible papel funcional de IGF-I en aquellos modelos que evidenciaran una regulación de la expresión del péptido.

MATERIALES Y METODOS

1. TEJIDOS UTILIZADOS

En la realización de esta tesis se han empleado tejidos procedentes de las siguientes especies:

I) Ratas adultas (ambos sexos) de la cepa Wistar de 7-8 semanas y 26-32 meses de edad. II) Ratones macho adultos de la cepa Balb/C de peso comprendido entre 20-25 gr. Ambas especies de roedores fueron criados en la colonia del Instituto Cajal (CSIC, Madrid). Los animales permanecieron con agua y comida *ad libitum* bajo condiciones controladas de temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$) y humedad ($48 \pm 2\%$). El ciclo diario fue de 12 horas de luz y otras 12 horas de oscuridad. III) Monos macho adultos de la especie *Macaca mulata*. IV) Humanos varones, de edades comprendidas entre los 65 y los 75 años, sin evidencia alguna de enfermedades cerebrovasculares o neurodegenerativas.

Para la localización y manipulación de las distintas áreas cerebrales se emplearon atlas esterotáxicos del SNC de rata (Paxinos y Watson, 1982), ratón (Broadwell y Bleier, 1977) y mono (Szabo y Cowan, 1984).

2. PRODUCCION DEL ANTISUERO α -IGF-I

El antisuero empleado para la detección de IGF-I se obtuvo por la inmunización de conejos neozelandeses con IGF-I₍₁₋₇₀₎ recombinante humano (Bachem) ligado a albúmina de suero bovino (BSA, Sigma) con carbodiimida (Abraham y Gover, 1991). Se hicieron reaccionar 1.7 mg de IGF-I con 2 mg de BSA en 4 ml de tampón fosfato (PB) 0.05 M pH 7.6 en presencia de 16 mg de carbodiimida. La reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 24 horas.

La suspensión de IGF-I-BSA se aplicó a los conejos por múltiples inyecciones subcutáneas repartida en dos dosis. En la primera dosis, el IGF-I ligado (0.5 mg por animal) se mezcló con adyuvante completo de Freund (Difco) en proporción 1/1 (v/v) y con 4mg por conejo de *Mycobacterium tuberculosis* (Difco). Además, cada conejo recibió 0.5 ml de una suspensión de antígeno de Bortadella pertussis (Difco) via subcutanea. En la segunda dosis, cada conejo recibió 0.4 mg de IGF-I ligado a BSA, mezclado en proporción 1/1 (v/v) con adyuvante incompleto de Freund (Difco). Los conejos se sangraron periódicamente (10-30 ml de sangre cada 4 semanas) a partir de los 30 días después de la segunda inyección.

3. TECNICAS BIOQUIMICAS

3.1. Radioinmunoensayo de IGF-I

3.1.1. Cálculo de la capacidad y especificidad del antisuero

El suero obtenido en cada sangrado se tituló haciendo reaccionar 100 μ l de cada dilución de antisuero con 100 μ l de IGF-I- I^{125} (5.000 cpm aproximadamente), 100 μ l de suero normal de conejo a una dilución final 1/1200 (Calbiochem) y tampón de ensayo (700 μ l). La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó empleando un segundo antisuero (ARGG, antigamma globulina de conejo obtenido en cabra, Calbiochem) a dilución final 1/240.

Cuando el título (dilución del antisuero α -IGF-I que ligó el 50% del IGF-I- I^{125}) decayó por debajo de 1/10.000 (dilución final) los conejos fueron reinmunizados con una dosis de 0.4 mg de IGF-I por conejo más adjuvante incompleto de Freund (1/1, v/v).

La especificidad del antisuero α -IGF-I se determinó analizando la capacidad de otros péptidos para competir con IGF-I- I^{125} por los sitios de unión al anticuerpo. Se ensayaron 27 péptidos diferentes, algunos de ellos estructural, anatómica o funcionalmente relacionados con IGF-I: proinsulina, insulina (Bachem), IGF-II (Lilly), neurofisina I, neurofisina II (Sigma), arginina-vasopresina (AVP), oxitocina (OT), GRF₁₋₄₃ de rata, GRF₁₋₂₉ humano, GRF₁₋₄₄ humano, SOM 14, SOM 28, VIP, hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), calcitonina, hormona paratiroidea, pentagastrina, neurotensina, polipéptido pancreático, colecistoquinina, LHRH, β -encefalina, gastrina IP, bradiquinina, sustancia P, glucagón y MSH (Bachem). Soluciones iniciales de 100 μ g/ml de cada uno de estos péptidos en CIH 0.001 N se diluyeron sucesivamente en tampón de ensayo hasta una concentración de 100 pg/ml. Se realizaron curvas standard de IGF-I como se describirá posteriormente y otras 27 curvas standard empleando cada uno de los péptidos anteriores a concentraciones de 100 pg/ml a 100 μ g/ml. Las condiciones del ensayo fueron las habituales para el radioinmunoensayo (RIA) de IGF-I.

3.1.2. Iodación de IGF-I

El mismo IGF-I (Bachem) con el que fueron inmunizados los conejos se iodó por el método de Greenwood y col. (1963) a temperatura ambiente. Para ello, 5 μ g del péptido en 50 μ l de PB 0.5 M, pH 7.6 se hicieron reaccionar con 1 mCi de NaI 125 (actividad específica 17 Ci/mg, New England Nuclear) en presencia de 10 μ l de una solución fresca de Cloramina T (0.25 μ g/ μ l en PB 0.01 M, pH 7.6, Merck). La incorporación de I^{125} a la molécula de IGF-I se paró a los 30 segundos por adición de 100 μ l de una solución de albúmina bovina cristalina (BSAc) al 5% en PB 0.01 M, pH 7.6.

La mezcla se aplicó a una columna de 1x60 cm de Sephadex G-50 fino (Pharmacia),

para separar el IGF-I- I^{125} del I^{125} libre y de la BSAc- I^{125} . La columna fue equilibrada y eluida con el tampón de RIA, recogiendo fracciones de 1 ml. Para diferenciar el IGF-I- I^{125} del I^{125} se realizó una precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA). Para ello a alícuotas de 50 μ l de cada fracción eluida se les añadió 1 ml de solución de TCA al 10% y 250 μ l de BSAc al 0.5% en agua destilada. Los precipitados obtenidos por centrifugación a 2.500 rpm durante 10 minutos se cuantificaron por conteo de centelleo líquido. Las fracciones correspondientes al IGF-I se mezclaron, se alícuotaron y se conservaron a -20°C . Inmediatamente antes de su utilización en el RIA, cada fracción se recromatografió empleando la misma columna. La actividad específica del IGF-I- I^{125} fue $150\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

3.1.3. Protocolo de radioinmunoensayo

Para la curva standard se utilizó una solución inicial de IGF-I en CIH 0.001 N, de la que se prepararon alícuotas de 10 ng/ml en tampón de ensayo que se conservaron a -20°C . Las concentraciones de IGF-I en la curva fueron de 0.156, 0.312, 0.625, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40 y 80 ng/ml. Todas las diluciones se realizaron en tampón de ensayo que consistió en PB 0.05 M pH 7.6, EDTA 0.025%, 0.1% BSAc, 0.1% AzNa.

El antisuero α -IGF-I se empleó a una dilución inicial de 1/1.500 (dilución final 1/15.000). La preparación de IGF-I- I^{125} se empleó a razón de 5.000 cpm/tubo. El suero normal de conejo (Calbiochem) se empleó a una dilución final de 1/1.200. La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó por el método del segundo anticuerpo, utilizando una antigammaglobulina de conejo obtenida en cabra (Calbiochem) a una dilución final de 1/240. La preincubación con el antisuero α -IGF-I fue de 24 horas a 4°C . La incubación posterior con IGF-I- I^{125} fue de 24-48 horas. Todo el proceso se realizó en hielo. Los precipitados finales se colectaron por centrifugación a 3.000 rpm durante 60 minutos a 4°C .

Cada concentración de la curva standard se pipeteó por triplicado y las muestras por duplicado, neutralizandolas previamente con cantidades equimolares de NaOH o por dilución en el tampón de RIA. Todas las muestras pertenecientes al mismo experimento se incluyeron en el mismo ensayo.

Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron del 7% y 15%, respectivamente. La sensibilidad del RIA de IGF-I fue de 0.25 ng/tubo.

3.1.4. Procesamiento de muestras

Las concentraciones de IGF-I de sueros de rata fueron medidos por el RIA de IGF-I

previa extracción ácida. Las muestras fueron acidificadas y eluidas en columnas cromatográficas de fase reversa (Sep-pak C₁₈, Waters Associates), separando de este modo el IGF-I de sus BPs.

3.2. Western blot

Para la realización del Western blot se usó una electroforesis unidimensional para proteínas en gel de poliacrilamida con SDS al 0.1%. El tampón de carga para la electroforesis fue Tris-ClH pH 6.8 50mM, SDS al 4%, Glicerol al 20%, 2-β-mercaptoetanol al 6% y azul de bromofenol al 0.002%. El gel separador se preparó al 14% a pH 8.8 y el concentrador al 6% a pH 6.8. Las muestras se mantuvieron en agua a ebullición durante 2-3 minutos para facilitar su solubilización. Se corrieron tres muestras, una con proteínas de pesos moleculares conocidos, otra con 1 μg de IGF-I₍₁₋₇₀₎ (Bachem) y una tercera con un 1 μg de IGF-II₍₁₋₆₇₎ (Lilly). Las muestras fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa con un tamaño de poro de 0.22μm (Millipore) mediante un Hoeffler Trans-Blot cell a 200 mA (80 V) durante dos horas a temperatura ambiente en el tampón 25 mM Tris, 192 mM glycine, 20% (v/v) metanol. El paso de las muestras de los geles a la membrana fue verificado por el paso de las proteínas de pesos moleculares conocidos (preteñidas), así como tiñendo el gel de poliacrilamida después de la transferencia con azul de coomassie.

Una vez completada la transferencia, las membranas fueron incubadas en una solución de bloqueo que contenía un 20% de suero fetal de ternera y un 5% de leche desnatada líquida en tampón TBS (Tris-HCl 50 mM a pH 8.0, NaCl 150 mM, Tween-20 al 0.05% (v/v)), durante una hora en agitación a temperatura ambiente. Las membranas fueron incubadas con el antisuero α-IGF-I diluido 1:400 durante una noche a 4°C en TBS con un 5% de leche desnatada líquida. Los inmunoblots fueron procesados usando inmunoglobulinas de cabra conjugadas con fosfatasa alcalina generadas contra conejo (pico Blue TM Immunoscreening kit, Stratagene) según las indicaciones del fabricante.

3.3. Radioinmunoensayo de vasopresina

3.3.1. Características del antisuero

Se utilizó un antisuero, previamente descrito (Sánchez-Franco y col., 1986), desarrollado en conejos contra AVP sintética ligada a tiroglobulina bovina con glutaraldehído, el cual no presenta reacción de cruce con OT, neurofisinas, ni con IGF-I. Únicamente presenta reacción cruzada con arginina-vasotocina, no presente en mamíferos.

3.3.2. Iodación de vasopresina

La AVP se iodó por el método de Greenwood y col. (1963) a temperatura ambiente. 15 μg de AVP sintética (Bachem) en 50 μl de PB 0.5 M, pH 7.6 se hicieron reaccionar con 0.6 mCi de NaI^{125} (actividad específica 17 Ci/mg, New England Nuclear) en presencia de 10 μl de una solución fresca de Cloramina T (1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ en PB 0.05 M, pH 7.6, Merck). La incorporación de I^{125} a la molécula de AVP se paró a los 15 segundos por adición de 100 μl de una solución de albúmina bovina cristalina (BSAc) al 25% en PB 0.01 M, pH 7.6. La mezcla se aplicó a una columna de 1x60 cm de Sephadex G-25 fino (Pharmacia) para separar la AVP- I^{125} del I^{125} libre y de la BSAc- I^{125} . La columna fue equilibrada y eluida con un tampón de ácido acético 0.1M con BSA al 0.125%, recogiendo fracciones de 1 ml. Las fracciones correspondientes a AVP se mezclaron, repartieron en alícuotas y se conservaron a -20°C . Inmediatamente antes de su utilización para RIA, cada fracción se recromatografió empleando la misma columna. La actividad específica de la AVP- I^{125} fue $150\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$.

3.3.3. Protocolo del radioinmunoensayo

Para la curva standard se utilizó una solución inicial de AVP en CIH 0.001 N, de la que se prepararon alícuotas de 10 ng/ml en tampón de ensayo que se conservaron a -20°C . Las concentraciones de AVP en la curva fueron de 0.97, 1.95, 3.9, 7.81, 15.62, 31.25, 62.5, 125, 250 y 500 pg/ml. Todas las diluciones se realizaron en tampón de ensayo que consistió en PB 0.025 M pH 7.5, EDTA 0.25%, 0.25% BSAc, 0.1% AzNa. El antisuero Ó-AVP se empleó a una dilución inicial de 1/40.000 (dilución final 1/400.000). El resto del protocolo del RIA de AVP fue el mismo que el de IGF-I. Los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 8% y 13% respectivamente. La sensibilidad del RIA de AVP fue de 0.7-1 pg/tubo.

3.3.4. Procesamiento de muestras

El contenido de AVP en distintas áreas cerebrales se determinó mediante RIA, descrito anteriormente (Sánchez-Franco y col, 1986). Bloques que contenían hipotálamos y fragmentos de cerebro anterior (libres de estructuras hipotalámicas), así como las neurohipófisis y adenohipófisis fueron homogeneizados en ácido acético 1M, calentados en agua en ebullición durante 5 min y centrifugados durante 25 min a 17.000 rpm. Los sobrenadantes fueron recogidos y almacenados a -80°C hasta su utilización. Las muestras fueron acidificadas y eluidas en columnas cromatográficas de fase reversa (Sep-pak C_{18} , Waters Associates).

3.4. Valoración de proteínas

Las proteínas se cuantificaron por el método de Lowry (1951) en alícuotas por duplicado de 50 μ l de extractos celulares después de sonicar, hervir y centrifugar las muestras. Para la curva standard se empleó una solución acuosa de BSAc (Sigma) de 1mg/ml.

3.5. Análisis estadístico de datos

Para la comparación estadística de las concentraciones plasmáticas de IGF-I entre animales deshidratados y controles, se utilizó el test *t* de Student, comprobándose previamente la distribución normal de los datos mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

Para la comparación estadística de los niveles de AVP en el experimento de administración de antisuero Ó-IGF-I i.c.v., se usó un análisis de varianza de doble vía, previa comprobación de la normalidad de las distribuciones y de la homogeneidad de las varianzas mediante el test de Cochran. Cuando el ANOVA reveló efectos significativos, se aplicó el test de Scheffé como prueba para la comparación de las medias *a posteriori*.

3.6. Ensayo de protección de ribonucleasas

Mediante esta técnica se analizaron los niveles del ARNm de IGF-I en hipotálamos de ratas controles y deshidratadas. La cantidad de ARN total hibridada fue de 33 μ g.

El ADNc de IGF-I (Lowe y col., 1988) estaba inserto en el vector pGEM-3, y fue linearizado con la enzima de restricción Hind III. Se construyó una ribosonda en sentido inverso, según la técnica descrita por Lowe y col. (1987), utilizando 32 α P-UTP y la ARN polimerasa T7. El ensayo mostraba dos fragmentos protegidos principales de 376 (IGF-Ib) y 224 pb (IGF-Ia) (Lowe y col., 1988).

La hibridación de cantidades idénticas de ARN total de los dos grupos experimentales se realizó bajo condiciones ya descritas (Lowe y col., 1987), a 45°C, durante 14-18 horas, en una solución que contenía formamida al 75%, Tis-CIH 80 mM, EDTA 4mM, ClNa 1.6 M, SDS 0.4% y 6x10⁵ cpm de la ribosonda marcada. Después, se procedió a la digestión con 40 mg/ml de ARNasa-A y 2 mg/ml de la ARNasa-T1 (Lowe y col., 1987). Los fragmentos protegidos fueron extraídos con fenol-cloroformo, precipitados con etanol, y sometidos a electroforesis en gel desnaturalizante (poliacrilamida 8%/urea 8M). Posteriormente, los geles se autorradiografiaron en placas de rayos X a -80°C, durante 20 días, y usando dos amplificadores de señal. Las señales obtenidas en la autorradiografía fueron cuantificadas por densitometría y se expresaron en unidades densitométricas arbitrarias. En cada gel se

incluyeron, además de las muestras, la ribosonda nativa (sin incubar, en dilución variable), la ribosonda digerida sin ARNasas (diluida antes de la aplicación en el gel), ARNt de levadura hibridado con ribosonda (control negativo) (Shemer y col., 1992), y pBR332, digerido con Msp1, como marcador de peso molecular (Biolabs, New England, USA).

4. TECNICAS HISTOQUIMICAS

4.1. Fijación y preparación de los tejidos

Con el objeto de preservar la estructura de los tejidos así como la de los diferentes antígenos que contienen, todos los tejidos a los que se les aplicaron las distintas técnicas histoquímicas fueron fijados. El tipo de fijación dependió del tipo de tejido utilizado así como del estudio a desarrollar. Con el objeto de eliminar la influencia de las variaciones hormonales circadianas en las distintas situaciones experimentales estudiadas, los animales fueron sacrificados siempre durante las primeras horas de la mañana.

En general, para estudios de localización, los animales fueron anestesiados y perfundidos con soluciones fijadoras. Bajo los efectos del anestésico (Equitesín 2.5 ml/kg intraperitoneal, Jansen Lab) se insertó una cánula a través del ventrículo izquierdo en la aorta ascendente, por la que se hizo pasar primeramente un PB salino (PBS) seguido de 500 ml de la solución fijadora, siendo paraformaldehído al 4% en PB 0.1M pH 7.4 para estudios de microscopía óptica, y añadiendo glutaraldehído al 0.1% a la solución anterior, para los estudios de microscopía electrónica. Posteriormente se extrajeron los diferentes órganos a estudiar (cerebro, hipófisis, hígado o riñón), se cortaron en bloques y se postfijaron por inmersión en la misma solución fijadora (excepto el glutaraldehído) durante 3-4 horas a temperatura ambiente.

En el análisis de tejidos humanos, los cerebros fueron extraídos durante autopsias (transcurriendo de 4 a 6.5 horas desde el momento de la muerte) para su posterior fijación. Los cerebros fueron fijados por perfusión del órgano con paraformaldehído al 4% en tampón borato, pH 9.0 y pequeños bloques se postfijaron en el mismo fijador durante 4 horas.

Para el estudio durante condiciones de estrés experimental se procedió a la fijación de los tejidos mediante inmersión en soluciones fijadoras, con la finalidad de evitar el posible estrés producido durante el proceso de la anestesia o de la perfusión. Los animales fueron decapitados, los tejidos a estudiar fueron extraídos y cortados en pequeños bloques en los 3 primeros minutos después de la decapitación, para evitar la posible degradación de los péptidos a estudiar. Inmediatamente fueron sumergidos en la solución fijadora para estudios de microscopía óptica. Los bloques se mantuvieron en esta solución durante 72 horas a 4°C.

Tras la fijación de los tejidos, en todos los casos de estudios a nivel óptico, los bloques se crioprotejieron mediante su inmersión en sacarosa al 30% en PB 0.1M a 4°C durante toda una noche con agitación continua.

Para los estudios de microscopía óptica se obtuvieron secciones histológicas de 30-40 μm y de 7-12 μm de espesor mediante la utilización de un micrótomo de congelación (Leitz) o de un criostato (Reichert-Jung), respectivamente. Para microscopía electrónica los bloques fueron rápidamente congelados por inmersión durante pocos segundos en nitrógeno líquido y tras pasados inmediatamente en PB a 4°C, posteriormente se obtuvieron secciones histológicas de 40 μm de espesor mediante un vibratomo Lancer.

4.2. Inmunocitoquímica

Para la detección de los distintos antígenos estudiados se utilizaron los siguientes anticuerpos y se aplicaron técnicas inmunocitoquímicas con peroxidasas (Sterberger, 19791), fluorescencia indirecta (Coons, 1958) y de doble marcaje (Levet y col., 1986; Rubinstein y col., 1992).

Anticuerpos contra	Generados en	Código	Dilución de trabajo	Procedencia
IGF-I ₍₁₋₇₀₎	conejo	FL-51089	1/400-1/1000 ^l 1/200-1/500 ^f	H. Ramón y Cajal NIH
IGF-I	conejo	UB3-189	1/1000 ^l	H. Ramón y Cajal
AVP	conejo	-	1/5000 ^l	Chemicon Int.
AVP	conejo	AB937	1/3000 ^l	Chemicon Int.
OT	conejo	AB911	1/3000 ^l	H. Ramón y Cajal
SOM	conejo	-	1/3000 ^l	H. Ramón y Cajal
GRF	conejo	-	1/2000 ^l	H. Ramón y Cajal
galanina	conejo	1125	1/2000 ^l	Hammersmith H.
calbindina	ratón	C 8666	1/1000 ^f -1/5000 ^l	Sigma
LNGFR	ratón	ME20.4	1/50 ^l	Worcester
ACTH ₍₁₋₂₄₎	conejo	AB902	1/8000 ^l	Chemicon Int.
c-Fos	conejo	-	1/1500 ^l	Curran y Morgan, 1985

^l, inmunomarcaje para microscopía de luz.

^f, inmunomarcaje para microscopía de fluorescencia.

4.2.1. Método de peroxidasa-antiperoxidasa

En los estudios de microscopía óptica, las secciones histológicas fueron incubadas durante 30 minutos en H₂O₂ al 0.3% (v/v) en PBS (con tejidos humanos se añadió metanol al 10%). Las secciones fueron lavados intensamente con PBS y se preincubaron en suero normal de la especie animal donde se desarrolló el anticuerpo secundario (cabra o conejo) diluido al 3% durante 30 minutos, con secciones humanas se empleó suero fetal de ternera al 10%. Todos los sueros y anticuerpos específicos fueron diluidos en PBS con Tritón X-100 (PBST) al 0.2% y los lavados se realizaron únicamente con PBS. Las incubaciones con los anticuerpos primarios se realizaron durante toda una noche a 4°C en agitación (con tejido humano se añadió suero fetal de ternera al 1%). Tras la noche de incubación las secciones fueron lavadas e incubadas con un antisuero de cabra o de conejo frente a inmunoglobulinas (IgG) de conejo o de ratón (Sigma, ICN) diluido 1:50 o 1:10 durante 1 hora a temperatura ambiente. Una vez lavados los cortes, se incubaron con un complejo peroxidasa-antiperoxidasa (PAP) desarrollado en conejo o en ratón (Sigma, ICN) diluido 1:1.000 en PBST durante 1 hora y 30 minutos. Tras varios lavados los cortes se incubaron en una solución de tetrahidrocloreuro de 3,3' diaminobencidina al 0.06% (DAB, Sigma). Después de 10 minutos, se añadió H₂O₂ a la solución de DAB a una concentración final de 0.003%. La reacción se paró mediante lavados con PBS. Las secciones fueron montadas sobre portaobjetos cubiertos por gelatina al 0.5%, deshidratadas y montadas en resina Dammar. Para estudios de microscopía electrónica, el inmunomarcaje se realizó del mismo modo que para microscopía óptica, excepto que no se utilizó H₂O₂ en los pretratamientos, ni detergentes en las incubaciones de los sueros. Después del revelado de la inmunoreacción, las secciones fueron lavadas en PBS durante 1 hora y postfijadas en tretróxido de osmio al 1% en PB 0.1M pH 7.4, durante otra hora. Las secciones fueron deshidratadas en alcoholes (en el alcohol al 70% se añadió acetato de uranilo al 1%), montadas en portaobjetos con resina Durcupan ACM (Fluka), cubiertas con cubreobjetos de plástico y polimerizadas durante tres días a 56°C. Las secciones fueron reincluidas en cápsulas de plástico en Durcupan. Se obtuvieron secciones ultrafinas, se montaron en rejillas cubiertas por Formvar y se tiñeron con citrato de plomo.

Como controles inmunocitoquímicos se incubaron secciones histológicas omitiendo el antisuero primario o remplazandolo con concentraciones equivalentes de suero preinmune. La especificidad del antisuero FL-51089 fue verificada mediante la incubación de secciones histológicas con el antisuero previamente preadsorbido con 1.45 µg/ml de IGF-I₁₋₇₀ recombinante humano durante una noche a 4°C. Además, se compararon los resultados

obtenidos con el antisuero FL-51089 con los obtenidos utilizando otro antisuero policlonal contra IGF-I (UB3-189).

4.2.2. Método del complejo avidina-biotina

Algunas de las reacciones inmunocitoquímicas fueron realizadas con la técnica del complejo avidina-HRP-biotinilada (ABC). Para ello se siguió el mismo protocolo que para el desarrollo de la PAP hasta el lavado después de la incubación del antisuero primario, seguidamente las secciones histológicas fueron incubadas con IgGs desarrolladas en cabra contra IgGs de conejo o ratón conjugadas con biotina (Vector) a una dilución 1/100 en PBST durante una hora. Después de lavar las secciones, estas fueron incubadas en el complejo ABC (Vectastain Elite kit, Vector) disuelto en PBST durante 1 hora y 30 minutos. El protocolo del revelado fue el mismo que para la PAP.

4.2.3. Intensificación del producto de reacción

Una vez adheridas las secciones a los portaobjetos, pero manteniéndose húmedas, fueron introducidas en una cámara con tetróxido de osmio al 1% en PB 0.1M pH 7.4 de tal modo que únicamente recibieran los vapores del osmio. Transcurridos de 30 segundos a 2 minutos se lavaron con PBS y se montaron con resina Dammar.

4.2.4. Método de fluorescencia indirecta

Después de la incubación con los anticuerpos primarios, tras los lavados con PBS, las secciones fueron incubadas con IgGs α -conejo o α -ratón generados en cabra conjugados con tetrametilrodamina o isotiocianato de fluoresceína respectivamente (TRITC, FITC; Sigma) diluidos 1:40 - 1:80 durante una hora a temperatura ambiente. Las secciones fueron intensamente lavadas en PBS y montadas en portaobjetos en glicerina:PBS (1:9).

4.2.5. Doble marcaje en cortes seriados

Para la demostrar la coexistencia de dos antígenos diferentes en la misma célula se emplearon cortes seriados de $7\mu\text{m}$. Cada uno de los cortes adyacentes adheridos a portaobjetos gelatinizados se incubó con un antisuero primario diferente y se reveló mediante la técnica de la PAP.

4.2.6. Doble marcaje en la misma sección

4.2.6.1. Utilización de dos cromógenos diferentes

Se utilizaron secciones de 30 μ m de espesor. Para la visualización del primer antígeno se usó la técnica del ABC. Una vez revelada la peroxidasa del complejo ABC, las secciones inmunoteñidas con el primer anticuerpo primario fueron lavadas intensamente en PBS e incubadas con el segundo anticuerpo primario, siguiendo el mismo protocolo que en la PAP hasta los lavados previos al revelado. Las secciones fueron lavadas 5 veces en PBS 0.01M pH 6.8 e incubadas en una solución de dicloruro de benzidina 0.01% (Sigma) y nitroprusiato sódico 0.025% (Sigma) en el mismo tampón. Transcurrido 10 minutos se añadió H₂O₂ a una concentración final de 0.0015%, la reacción fue detenida lavando las secciones con PBS pH 6.8. El control de la posible reacción de cruce entre ambos marcajes fue realizado incubando ambas veces con el antisuero contra el primer antígeno. Este tipo de técnica fue especialmente útil, principalmente, en los casos en los que para localizar dos antígenos diferentes, únicamente se disponía de antisueros generados en las mismas especies huésped, ya que el producto de la inmunoreacción del complejo ABC provee una completa protección de las IgGs unidas frente al segundo anticuerpo.

4.2.6.2. Utilización de dos fluorescentes diferentes

Este tipo de técnica únicamente se pudo emplear en los casos en los que se disponía de anticuerpos contra antígenos diferentes generados en distintas especies huéspedes. Para la visualización del primer antígeno usamos la técnica de inmunofluorescencia indirecta con TRITC o con FITC. Las secciones inmunoteñidas con el primer anticuerpo primario fueron lavadas intensamente en PBS e incubadas con el segundo anticuerpo primario. Este segundo anticuerpo primario fue visualizado empleando de nuevo la inmunofluorescencia indirecta con un anticuerpo secundario conjugado a una molécula fluorescente distinta de la empleada en la detección del primer antígeno. El control de la posible reacción de cruce entre ambos marcajes fue realizando las incubaciones omitiendo alguno de los anticuerpos primarios.

4.3. HIBRIDACION *IN SITU*

4.3.1. Preparación de tejidos

Para los experimentos de hibridación *in situ* se fijaron por perfusión ratas adultas macho, los cerebros e hipófisis fueron extraídos, postfijados y crioprotejidos en sacarosa como se describió anteriormente. Los tejidos fueron congelados en isopentano (enfriado con nitrógeno líquido) y almacenados durante 24-48 horas a -80°C. Se realizaron cortes de 10 μ m a -20°C en un criostato, las secciones se recogieron directamente en portaobjetos previamente cubiertos por poli-L-lisina (Sigma). Los cortes histológicos permanecieron a 43°C al vacío

5 minutos y otros 30 minutos en fijador. Posteriormente fueron lavados en PBS, acetilados en anhídrido acético al 0.25% en tampón TEA, fijados una vez más durante 5 minutos, lavados en PBS y deshidratados en un gradiente de alcoholes. Una vez secos por completo, los portaobjetos fueron almacenados a -80°C hasta su posterior hibridación.

4.3.2. Preparación de sondas

El ADNc de IGF-I estaba inserto en el vector pGEM-3 (Lowe y col., 1988) y fue *linearizado con Hind III*. La sonda de ARNc de R-IGF-I se sintetizó a partir de un inserto de ADNc subclonado en el vector pGEM4 (Ullrich y col., 1986; amablemente cedido por el Dr. Santos), el plásmido fue *linearizado con la enzima de restricción PvuII*. Los ARNc de IGF-I y R-IGF-I fueron sintetizados por transcripción *in vitro* usando UTP marcado con ³⁵S (1.200 Ci/mmol; New England Nuclear), generándose sondas con una actividad específica de $1.2 \pm 0.2 \times 10^9$ cpm/ μ gARN. La reacción de transcripción se realizó incubando 1 μ g de ADNc *linearizado con 7.5U de ARNpolimerasa T7 durante 4 horas a 30°C*, con el 50% de la polimerasa añadida después de 2 horas. La reacción se finalizó incubando con DNasa-I durante 10 minutos a 37°C. La mezcla de reacción fue precipitada en etanol absoluto en presencia de ARNt de levaduras y diotiotreitol.

4.3.3. Hibridación

Las secciones fueron descongeladas y rehidratadas en 2xSSC. La prehibridación e hibridación se realizaron según el método previamente descrito por Mellström y col 1991. El tratamiento de posthibridación fue el siguiente: 15 minutos en SSCx2 a temperatura ambiente, 30 minutos a 37°C con RNasa A (30 μ g/ml), 4 lavados de 15 minutos en SSCx2 a 50°C y 4 lavados de 15 minutos a 50°C en SSCx0.1 con β -mercaptoetanol 14 mM. Las secciones histológicas se deshidrataron con etanol al 50, 70 y 90% con acetato amónico 0.3M y por último, fueron expuestas a placas fotográficas (Amersham β -max) durante 40 días o a una emulsión fotográfica (Kodak NTB2) durante 60 días. Como control de hibridación no específica, secciones adyacentes fueron pretratadas con RNasa A antes de la hibridación con la sonda de ARN antisentido. Mediante Northern blot se ha demostrado que esta sonda no posee cruce con el receptor de la insulina (comunicación personal del Dr. A. Santos).

4.4. Doble marcaje hibridación *in situ*-inmunocitoquímica

Después de realizar los lavados de la hibridación *in situ*, los portaobjetos fueron lavados en PBS e incubados con los antiseros primarios correspondientes (Ó-c-Fos y Ó-

AVP). La técnica inmunocitoquímica aplicada fue la de la PAP, anteriormente descrita, con la modificación de no tratar las secciones con peróxido de hidrógeno como pretratamiento. Tras el revelado de la inmunotinción los portaobjetos fueron deshidratados, secados y expuestos a una emulsión fotográfica NTB2 durante 40 días.

4.5. Contrataciones

Algunos portaobjetos con secciones histológicas procesadas para inmunocitoquímica o para hibridación *in situ* fueron teñidas con violeta de cresilo o con tionina para una mejor identificación de los elementos marcados.

4.6. Análisis estadístico de los datos

Para la semicuantificación de los niveles de ARNm del R-IGF-I en el experimento de deshidratación se contaron los granos de plata reducida de la hibridación *in situ* sobre neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos supraóptico (n=85 células) y paraventricular (n=24 células) de secciones histológicas procedentes de animales controles (n=6 secciones) y deshidratados (n=8 secciones). Se aplicó un análisis de la varianza seguido de el test de significación de Bonferroni.

5. MODELOS EXPERIMENTALES

5.1. Administración de colchicina

A un grupo de animales, 48 horas antes de ser sacrificados, se les administró 75 μ g de colchicina disuelta en 10 μ l de PBS en el ventrículo lateral derecho. Las coordenadas de las inyecciones fueron: antero-posterior -0.8 mm, medio-lateral -1.6 mm, dorso-ventral -3.5 mm (desde la superficie de las meninges), estas fueron calculadas según el atlas estereotáxico de Paxinos y Watson (1982). Como cero estereotáxico se usó el bregma. El plano utilizado (barra de los incisivos a -3.3 mm) incluía la línea interaural y era paralelo a aquel que contiene el bregma y al lamda.

5.2. Diabetes Mellitus

Ocho ratas macho (200-250 gr) fueron inyectadas con una única dosis de estreptozotocina (STZ, Sigma; 60 mg/kg) disuelta en el momento de su utilización en 0.25 ml de tampón citrato, pH 4.5. Ocho ratas control recibieron un volumen igual del vehículo. La inducción de la diabetes fue definida por la aparición de glucosuria (Keto-Diabur-Test 5000, Boehringer Mannheim), glucemia en sangre (Glucostix, Bayer), pérdida de peso y

poliuria el tercer día después de la administración de la STZ. Todos los animales fueron mantenidos seis semanas con agua y comida *ad libitum*. Tras seis semanas los animales fueron anestesiados, se tomaron muestras de sangre y orina para controlar la glucemia y glucosuria y finalmente fueron perfundidos.

5.3. Estimulación osmótica

Se emplearon dos modelos de deshidratación, uno agudo y otro crónico. Para el modelo agudo los animales permanecieron 24 horas antes de ser sacrificados con NaCl al 2% en sus bebederos y con libre acceso a la comida. En el modelo crónico los animales permanecieron con un régimen intermitente de agua salada durante seis días (Sherman y col., 1988). En este último modelo se mantuvo a las ratas con NaCl al 2% en los biberones desde las 16 horas hasta las 10 horas y las restantes seis horas con agua normal. Como controles se tomaron ratas con acceso a agua normal durante los mismos tiempos. Para los estudios de histoquímica los animales fueron perfundidos, mientras que para los bioquímicos fueron decapitados.

5.4. Preñez y lactancia

Ratas hembra adultas vírgenes en el estado de estro (n=4), preñadas en el día 21 de la gestación (n=3) y lactantes en el día 10 de lactación con 8 crías cada una (n=3) fueron perfundidas para el posterior análisis inmunocitoquímico de sus hipotálamos y neurohipófisis. En el momento de sacrificar los animales del segundo grupo, dos de ellos habían parido algunos momentos antes.

5.5. Estrés agudo por inmovilización

Doce ratas macho (200-250 gr) fueron usadas en este experimento. El grupo control (n=4) fue decapitado inmediatamente después de sacar los animales de sus cajas. Los animales posteriormente estresados fueron inmovilizados mediante su introducción en conos de plástico que restringían totalmente el movimiento (Orr y col., 1990) durante 15 minutos (n=4) o 45 minutos (n=4), inmediatamente después fueron sacrificados. Los tejidos a estudiar fueron rápidamente introducidos en soluciones fijadoras.

5.6. Administración de antisuero α -IGF-I icv

Se purificaron IgGs a partir de antisuero FL-51089 (Ac-IGF-I) y suero normal de conejo (NRS) en columnas de 1.5x30 cm de Dietilaminoetil-celulosa (DEAE-celulosa; Whatman Ltd), equilibradas y eluidas con PO_4 0.01M pH 7.6 a temperatura ambiente. Previamente, los sueros se dializaron frente al mismo tampón durante 48 horas a 4°C aplicándose 1 ml en cada columna. Se recogieron fracciones de 1 ml, seleccionándose las que contenían las IgGs por su máxima absorción a 280 nm, que se liofilizaron y congelaron a -20°C hasta su utilización.

A 13 ratas macho se les administró en el ventrículo lateral 15 μl de IgGs purificadas de FL-51089 (el equivalente a 50 μl de antisuero). Otras tantas fueron inyectadas con IgGs purificadas de NRS (el equivalente a 50 μl de suero). Transcurridas 24 horas después de la administración, un grupo de ratas inyectadas con α -IGF-I (n=7) y otro con NRS (n=7) fueron deshidratadas (NaCl al 2% en agua), sacrificándose por decapitación 24 horas después.

RESULTADOS

1. DISTRIBUCION DE IGF-I Y SU RECEPTOR EN SNC ADULTO

1.1. Distribución del péptido IGF-I en SNC

1.1.1. Caracterización del antisuero α -IGF-I

Análisis por RIA

En los estudios de RIA presentados en este trabajo se empleó el antisuero codificado como FL-51089 a una dilución final de 1/15.000. Como se muestra en la figura 1A, la concentración de IGF-I necesaria para desplazar en un 50% la unión inicial del IGF-I-I¹²⁵ al antisuero fue de 5 ng/ml. El coeficiente de variación intraensayo fue del 7% y el coeficiente de variación interensayo del 15%.

La especificidad del antisuero fue demostrada por la ausencia de reacción de cruce frente a 27 péptidos ensayados: IGF-II, proinsulina (Fig. 1A), insulina, neurofisisina I, neurofisisina II, AVP, OT, GRF₁₋₄₃ de rata, GRF₁₋₂₉ humano, GRF₁₋₄₄ humano, SOM 14, SOM 28, VIP, hormona liberadora de hormona adrenocorticotropa (CRH), calcitonina, hormona paratiroidea, pentagastrina, neurotensina, polipéptido pancreático, colecistoquinina, LHRH, β -encefalina, gastrina IP, bradiquinina, substancia P, glucagón y MSH. Ninguno de estos péptidos dió reacción cruzada con el antisuero FL-51089 ni aún a concentraciones tan altas como 1 μ g/ml.

Análisis por Western blot

Después del revelado de la fosfatasa alcalina de la membrana del inmunoblot, se observó que el antisuero FL-51089, a la concentración de 1:400, fue capaz de reconocer 1 μ g de IGF-I₁₋₇₀ humano recombinante. Sin embargo no reconoció la misma cantidad de IGF-II (Fig. 1B).

Análisis inmunocitoquímico

Controles positivos.

Como controles positivos se utilizaron el hígado y el riñón de ratas adultas tratadas con colchicina. Estos órganos presentan un alto nivel de síntesis de IGF-I y su distribución es bien conocida. En el hígado, la inmunoreactividad para IGF-I se presentaba distribuida en los citoplasmas de los hepatocitos (datos no mostrados), mientras que en el riñón, el inmunomarcaje se observó focalmente en células de los tubos colectores y de las asas de Henle de la médula renal (Figs 2C-E). Los resultados obtenidos estaban en concordancia con la localización del péptido y de su ARNm descrita por otros autores (Hansson y col., 1988b, Andersson y col., 1990, Chin y col., 1992).

Controles de especificidad.

La incubación de cortes histológicos del hipotálamo de ratas tratadas con colchicina y de cerebelos humanos omitiendo el antisuero primario o remplazandolo con concentraciones equivalentes de suero preimmune no ofreció ningún tipo de inmunoreacción. Las mismas áreas descritas incubadas con el antisuero previamente preadsorbido con 1.45 $\mu\text{g/ml}$ de IGF-I₁₋₇₀ recombinante humano durante una noche a 4°C mostraron una ausencia de inmunotinción (Fig. 2). Además, incubaciones de secciones de cerebelos humanos con otro anticuerpo policlonal α -IGF-I (UB3-189) ofrecieron resultados equivalentes a los obtenidos con el antisuero FL-51089 en el patrón de inmunomarcaje. Sin embargo, la intensidad de la inmunotinción fue notablemente más débil utilizando el antisuero UB3-189 que con el FL-51089.

1.1.2. Distribución de IGF-I en SNC

1.1.2.1. Distribución del péptido IGF-I en SNC de rata

En el SNC de ratas adultas sin tratamiento previo alguno, la inmunoreactividad para IGF-I fue observada principalmente en el cerebelo, y muy débilmente en el hipotálamo y la neocorteza. Tras 48 horas de la administración icv de colchicina no se apreciaron cambios en el patrón de inmunomarcaje del cerebelo. Sin embargo, se observó un notable incremento en la intensidad del marcaje para IGF-I en el hipotálamo y, en menor grado, en la neocorteza. Aunque la administración de colchicina indujo un incremento en la intensidad del marcaje, en general, el patrón de distribución de los elementos que lo contenían fue la misma que en los animales normales. Sin embargo, la administración de colchicina produjo la aparición de células inmunopositivas en el complejo hipocampal, principalmente en el giro dentado, sin que los animales normales las presentaran.

Localización de IGF-I en cerebelo

La inmunoreactividad para IGF-I fue detectada fundamentalmente en las células de Purkinje (Fig. 3A). Algunas células de Golgi de la capa de los granos también presentaban producto de reacción, aunque muy débilmente (Fig. 3B). El producto de reacción presentaba un aspecto denso y granular (Figs 3C-F). En las células de Purkinje el inmunoprecipitado se encontró concentrado alrededor de los núcleos, así como relleno difusamente el pericarion (Figs 3C-F) y sus procesos dendríticos primarios en la capa molecular (Figs 3C,D). También se detectaron algunos axones positivos emergiendo de la base del soma de las células de Purkinje (Figs 3E,F). El vermis fue el área del cerebelo que mayor número de células de

Purkinje positivas presentaba.

Las neuronas de Purkinje inmunoreactivas para IGF-I, identificadas con el microscopio óptico, mostraban las características ultraestructurales típicas de las células de Purkinje (Peters y col., 1991). Presentaban un núcleo pálido y prominente, con una membrana nuclear profundamente invaginada (Fig. 4C). El núcleo estaba rodeado por abundante citoplasma rico en orgánulos, incluido el aparato subcisternal de membrana descrito por Rosenbluth (Fig. 4A). La superficie externa de la membrana plasmática del soma celular, así como la de sus dendritas primarias, estaban principalmente cubierta por procesos gliales. El producto de reacción denso a los electrones fue encontrado en cisternas del retículo endoplásmico rugoso (Figs 4A,B) y muy ocasionalmente asociado con la membrana nuclear (Fig. 4C) y cuerpos multivesiculares (Fig 4D). De modo característico, el inmunomarcaje para IGF-I no se encontró en ningún caso asociado con el nucleoplasma, ni con la superficie externa de las mitocondrias, ni con otros orgánulos subcelulares.

Localización de IGF-I en hipotálamo

En el hipotálamo, la inmunoreactividad para IGF-I se observó como un producto de reacción granular y difuso que ocupaba somas neuronales, sus procesos dendríticos, fibras nerviosas y estructuras similares a terminales.

Las neuronas positivas para IGF-I se agrupaban principalmente en los núcleos supraóptico y paraventricular (Figs 5). En el núcleo paraventricular las células inmunoreactivas para IGF-I correspondían a neuronas magnocelulares (Figs 5A,B). Neuronas positivas para IGF-I también fueron detectadas en los grupos accesorios magnocelulares (Peterson, 1966), los cuales incluyen los núcleos comisural anterior (Fig. 6A), circular, fornicales anterior y posterior, retroquiasmático y el núcleo del fascículo prosencefálico medial (datos no mostrados). Los grupos accesorios magnocelulares que presentaban IGF-I-IR citados anteriormente, frecuentemente, se situaban a lo largo del curso de los axones de las neuronas magnocelulares que se dirigen hacia la eminencia media (EM), a menudo en asociación con pequeños vasos (Fig. 6B). Otras neuronas positivas para IGF-I fueron encontradas en las áreas hipotalámicas anterior y lateral (Fig. 6A), preópticas medial y lateral (Fig. 6C), los núcleos periventriculares preóptico y anterior (Fig. 6A) así como en el núcleo de la estría terminal (Figs 6A,D).

Las fibras nerviosas y posibles terminales que contenían IGF-I-IR presentaban una morfología varicosa y se localizaban principalmente en la zona interna de la EM (ziEM), y en menor número, en la zona externa de la EM (zeEM; Fig. 7A). Fibras y posibles

terminales inmunoreactivos también fueron observadas dentro de los núcleos periventricular (recuadro en fig. 7C), paraventricular, comisural anterior y arcuato, así como en el hipotálamo mediobasal lateral (Fig. 7C). La mayor densidad de fibras nerviosas y de posibles terminales inmunoreactivos para IGF-I fueron detectados en la neurohipófisis (Fig. 7B), mientras que únicamente una muy tenue inmunoreactividad fue observada en la adenohipófisis (no mostrada).

Los somas hipotalámicos inmunoreactivos para IGF-I analizados a microscopía electrónica mostraban las mismas características ultraestructurales que las neuronas magnocelulares neurosecretoras (Kalimo, 1971). Los somas presentaban un gran tamaño y contenían un núcleo excéntrico con un prominente nucleolo. El citoplasma poseía un retículo endoplásmico y un aparato de Golgi altamente desarrollado y, característicamente, un gran número de gránulos de secreción de centro denso, fácilmente identificables por su estructura y tamaño (150-190 μ m). El precipitado del inmunomarcaje para IGF-I se detectó ocasionalmente en el interior de algunas de las cisternas del retículo endoplásmico rugoso (Fig. 8A) y del aparato de Golgi (Figs 8B,C). Algunos de los gránulos de secreción exhibían IGF-I-IR en su interior (Fig. 9). Los resultados obtenidos fueron similares para neuronas inmunoreactivas de los núcleos supraóptico y paraventricular. El producto de reacción del IGF-I-IR no se encontró en ningún caso en asociación con otros orgánulos subcelulares ni con su superficie externa.

Colocalización de IGF-I con AVP y OT

En condiciones normales las neurohormonas AVP y OT son sintetizadas en diferentes neuronas, formando dos poblaciones distintas (Vandesande y Dierickx, 1975; Mohr y col., 1988). La distribución de somas inmunoreactivos para AVP y OT obtenida en este estudio corresponde con la descrita con anterioridad (Sofroniew, 1985). Ambas neurohormonas se presentaban en somas magnocelulares neurosecretoras y en menor grado en neuronas parvocelulares. En el núcleo supraóptico AVP-IR fue detectada principalmente en porciones ventrales y mediales del núcleo, mientras que OT-IR se situaba en porciones dorsales y laterales. En el núcleo paraventricular las neuronas que contenían OT-IR se extendían en dirección rostrocaudal con localización anterior y ventromedial, rodeando un amplio grupo de somas inmunoreactivos para AVP. Los núcleos magnocelulares accesorios (Peterson, 1966), fundamentalmente el comisural anterior, presentaban mayoritariamente OT-IR. Otras regiones hipotalámicas como son los núcleos de la estría terminal o el supraquiasmático también presentaban somas inmunoreactivos. El núcleo supraquiasmático únicamente contenía

AVP-IR.

Mediante la aplicación de técnicas de doble marcaje, utilizando dos cromógenos diferentes, cuyos productos de reacción difieren tanto en coloración como en el tipo de precipitado (Fig. 10) se demostró que mayoritariamente las neuronas magnocelulares que expresaban IGF-I-IR y las que contenían AVP-IR constituían poblaciones celulares diferentes (Figs 10A,C). Aunque en un bajo porcentaje, algunas neuronas coexistían IGF-I-IR y AVP-IR (Fig. 10E). El producto de reacción para IGF-I fue encontrado principalmente en cuerpos celulares que contenían OT-IR (Figs 10B,D) distribuidos en los núcleos supraóptico, paraventricular y accesorios magnocelulares. Muy ocasionalmente neuronas positivas para IGF-I no presentaban OT-IR (Fig. 10F), así como ciertas neuronas OT positivas no contenían IGF-I-IR (Fig. 10G). En ningún caso se hallaron somas con IGF-I-IR en el núcleo supraquiasmático. Mediante técnicas de doble marcaje en cortes seriados (Fig. 11) se obtuvieron los mismos resultados que empleando dobles marcajes en la misma sección.

Localización de IGF-I en neocorteza

La inmunoreactividad para IGF-I se localizó en un reducido número de neuronas de tamaño medio, no piramidales, situadas aisladamente. Aunque la corteza somatosensorial fue el área que contenía un mayor número de neuronas inmunomarcadas (Fig. 12), estas estaban presentes en todas las áreas neocorticales. Las neuronas positivas se hallaban en las capas corticales superficiales (II-IV) sin una distribución laminar concreta (Figs 12A-C). IGF-I-IR se detectó como un tenue producto de reacción que ocupaba el soma neuronal y ocasionalmente sus procesos dendríticos (Figs 12A-C). Los núcleos celulares siempre se presentaron negativos. A nivel ultraestructural el producto de reacción únicamente fue hallado en el interior de algunas de las cisternas del aparato de Golgi (Figs 12D,E).

Localización de IGF-I en la formación hipocampal

En los animales sin ningún tratamiento previo, la formación hipocampal en ninguna ocasión presentó inmunoreactividad para IGF-I (Fig. 13A). 48 horas después de la administración de colchicina se pudo observar la aparición de inmunoreactividad para IGF-I en la formación hipocampal, principalmente en el giro dentado (Figs 13B-E). Aunque el inmunomarcaje se presentaba en ambos giros dentados, la intensidad del mismo fue mayor en el lado ipsilateral a la inyección. Las células del giro dentado inmunoreactivas para IGF-I aparecían en unos casos concentradas en grupos (Fig. 13B) y en otros dispersas (Fig. 13D). La inmunoreactividad se localizaba en los citoplasmas de pequeñas células, aparentemente

células granulares (Figs 13C,D).

1.1.2.2. Estudio comparado de la localización de IGF-I en el hipotálamo de otras especies.

Con el objeto de confrontar los resultados obtenidos en rata con otras especies, realizamos un estudio inmunocitoquímico en hipotálamos de ratón, área donde teníamos bien caracterizada la localización de IGF-I-IR. Además, ampliamos este estudio en monos, con el fin de obtener información referente a la posible presencia de IGF-I-IR en hipotálamo de primates.

Localización de IGF-I en hipotálamo de ratón

En general, la distribución de las células que contenían IGF-I-IR correspondía con la descrita en la rata. Los somas inmunoreactivos para IGF-I se encontraron principalmente en los núcleos paraventricular (Fig. 14) y supraóptico.

Localización de IGF-I en hipotálamo de mono (Macaca mulata)

Como se muestra en la figura 15 y de forma paralela a la establecida para los roedores, en *Macaca mulata* IGF-I-IR se encontraba contenido en neuronas magnocelulares neurosecretoras hipotalámicas.

1.1.2.3. Distribución del péptido IGF-I en algunas áreas de SNC humano

La localización de factores tróficos en el cerebro humano constituye una primera aproximación en el estudio de su posible implicación en procesos neurodegenerativos. En el presente trabajo, el análisis realizado en cerebros humanos se limitó a aquellas áreas a las que se tuvo disponibilidad y además presentaban un tiempo *post-mortem* corto, una buena fijación y conservación del tejido. Además, con la finalidad de intentar definir subpoblaciones neuronales y posibles relaciones con otros factores tróficos, realizamos algunos estudios de colocalización.

Localización de IGF-I en cerebelo

Después de realizar el procesamiento inmunocitoquímico de las secciones histológicas, se observó que un intenso marcaje para IGF-I ocupando el soma, dendritas y axones de las células de Purkinje (Figs 16) a lo largo de todas las regiones del cerebelo, incluidas arqueo, paleo y neocerebelo. El producto de reacción se situaba en la mayor parte del arbol

dendrídico de las células de Purkinje, incluso relleno algunas de las espinas dendríticas (Figs 16C,D). Los axones de las células de Purkinje tenían una morfología varicosa y presentaban IGF-I-IR a lo largo de su curso. Ocasionalmente, la porción proximal de los axones de las células de Purkinje exhibían balonamientos (torpedos axonales). Algunos de estos axones presentaban una morfología arciforme (Fig. 16C) y contenían un intenso marcaje para IGF-I (Figs 16C, 17A). También fue detectado IGF-I-IR en colaterales recurrentes de los axones de las células de Purkinje. La mayoría de estas estructuras formaban plexos en la zona infraganglionica (Figs 17C-D) formando, en algunas ocasiones, cestos alrededor de estructuras sin marcaje en la capa de los granos (Figs 17C,D).

Colocalización de IGF-I con calbindina y LNGFR

Con el objeto de averiguar si las neuronas positivas para IGF-I podrían representar una subpoblación de las células de Purkinje realizamos un estudio de dobles marcajes para IGF-I y calbindina, ya que esta última proteína es considerada como un marcador de todas las células de Purkinje (Scotti y Nitsch, 1992). Por otro lado, en base a la posible interacción entre distintos factores tróficos, realizamos dobles marcajes para IGF-I y el receptor de baja afinidad para NGF (LNGFR) con el objetivo de analizar posibles relaciones anatómicas.

Los resultados obtenidos utilizando anticuerpos contra calbindina fueron acordes con estudios anteriores en humanos (Scotti y Nitsch, 1992). Las células de Purkinje mostraban un intenso inmunomarcaje para calbindina en sus somas, dendritas y axones de modo uniforme por todo el cerebelo (Figs 18B,D,19A,B).

El patrón de inmunomarcaje para LNGFR fue el mismo que en descripciones previas en humanos (Mufson y col., 1991). Únicamente, algunas de las células de Purkinje presentaban inmunoreacción positiva. El producto de reacción tenía un aspecto granular que ocupaba principalmente y característicamente la periferia del núcleo celular, y en menor grado dendritas y axones (Figs 19C-E).

Los dobles marcajes inmunocitoquímicos realizados demostraron que, en general, la población de células de Purkinje positivas para IGF-I era homogénea. Analizando secciones en diversas áreas corticales se comprobó que la gran mayoría de células de Purkinje que expresaban calbindina-IR también contenían IGF-I-IR (Figs 18,19AB). Por otra parte se observó que la mayor parte de células positivas para LNGFR también eran inmunoreactivas para IGF-I (Figs 19C-E). Sin embargo, tan solo algunas células de Purkinje que expresaba IGF-I-IR no contenía inmunoreactividad para LNGFR (Fig 19C,D).

Localización de IGF-I en la neocorteza somatosensorial

En la corteza somatosensorial humana, muy ocasionalmente se encontraron neuronas positivas para IGF-I. Dichas neuronas se localizaban en capas superficiales (I-III; Fig. 20A). En contraste con el escaso número de somas con inmunoreactividad para IGF-I, se detectaron numerosas fibras nerviosas inmunoreactivas, principalmente en las capas profundas (Figs 20C,D). Tanto las capas superficiales (Fig. 20B) como la sustancia blanca de la corteza cerebral, también presentaban fibras nerviosas con marcaje positivo.

1.2. Distribución del ARNm de IGF-I en SNC

Durante el primer período del desarrollo de la presente tesis, antes de comenzar los estudios de expresión génica empleando técnicas de hibridación *in situ*, aparecieron algunas publicaciones en las que se describía la localización del ARNm de IGF-I en SNC (Werther y col., 1990; Bartlett y col., 1991a,b; Bondy, 1991). Una vez comenzado a trabajar con las técnicas de de hibridación *in situ*, realizamos hibridaciones para el ARNm de IGF-I con la finalidad de tener a punto las técnicas. Analizando la expresión de IGF-I en el SNC de rata adulta, obtuvimos resultados muy similares a los descritos por Bondy (1991). En general, en SNC de rata adulta la expresión del ARNm de IGF-I era muy baja y estaba restringida a unas pocas áreas. Principalmente encontramos transcritos para IGF-I en el bulbo olfativo, corteza piriforme (Fig. 21A) y células de Purkinje de cerebelo (Fig. 21B). Debido a la semejanza entre nuestros resultados referentes a la expresión del ARNm de IGF-I en SNC con los de otros autores, no seguimos realizando experimentos de hibridación con el ARNm de IGF-I que fueran encaminados a describir su distribución en SNC en condiciones basales.

1.3. Distribución del ARNm de R-IGF-I en SNC de rata

Al comienzo de estos experimentos la distribución de R-IGF-I en SNC había sido estudiada mediante técnicas autoradiográficas con ligando marcado. Únicamente una publicación describía la distribución regional de la expresión del ARNm de R-IGF-I en el SNC, aunque con técnicas bioquímicas de hibridación líquida (Baron-Van Evercooren y col., 1991). Al tiempo que finalizábamos los experimentos de distribución del ARNm de R-IGF-I en SNC de rata, fueron publicados dos trabajos que describían dicha distribución (Marks y col., 1991; Bondy y col., 1992). En general, nuestros resultados fueron equiparables a los descritos por Marks y col. (1991) y Bondy y col. (1992). Sin embargo, algunas diferencias fueron observadas.

La especificidad de los resultados obtenidos con la sonda del ARNc de R-IGF-I

mediante la aplicación de técnicas de hibridación *in situ* fue confirmada por los siguientes controles: 1) Las secciones histológicas tratadas con RNasa A antes de la hibridación no presentaron ninguna señal positiva (Fig. 22). 2) Otros experimentos, realizados en paralelo y usando el mismo método, con sondas de similares tamaños y actividad específica no relacionadas con la del ARNm de R-IGF-I mostraron un patrón de hibridación diferente (datos no mostrados). 3) En el núcleo arcuato, donde los receptores de insulina son abundantes (Lesniak y col., 1988; Marks y col., 1990) no se detectó ninguna señal de hibridación (Fig. 23C), indicando que la sonda utilizada no tiene reacción cruzada con el ARNm del receptor de insulina.

Tanto el SNC como la hipófisis de ratas adultas presentaban una amplia distribución de transcritos del ARNm de R-IGF-I. La hipófisis presentaba una muy intensa señal de hibridación en la pars tuberalis (Figs 23C, 24A,B), pars distalis y pars intermedia (Recuadro en fig. 24A). En el cerebro, los órganos circunventriculares contenían gran cantidad de transcritos del ARNm de R-IGF-I, los cuales incluían a los plexos coroideos (Figs 23B-D), órgano subfornical (Fig. 23B), área postrema (Fig. 23D), órgano vascular de la lamina terminal y la glándula pineal (datos no mostrados). Los bulbos olfativos, hipocampo y cerebelo (Fig. 22, 23) presentaba una prominente señal de hibridación. El bulbo olfativo contenía transcritos del R-IGF-I en las capas celulares glomerular, mitral y granular (Figs 23A, 25A). En el hipocampo, una fuerte señal de hibridación fue detectada en la capa de los granos del giro dentado y en la capa piramidal del cuerno de Ammon, principalmente en los campos CA2 y CA3 (Figs 23C, 25C). En el cerebelo, tanto las células de Purkinje como las células grano mostraban señal de hibridación (Figs 22A, 23D, 25B). Las áreas telencefálicas que mostraban un marcaje específico fueron la corteza cerebral (capas II, III y VI) (Figs 22, 26A,B), corteza piriforme (Figs 23C, 26C), núcleos olfativos (Fig 22), núcleo endopiriforme (Fig. 23B), islas de Calleja, complejo amigdalino, núcleo acumbens y el núcleo de la estría terminal (datos no mostrados). En el diencefalo, se encontró hibridación en los núcleos talámicos ventrolateral, laterodorsal y anterior (Fig. 22), los cuerpos geniculados (datos no mostrados), los núcleos hipotalámicos supraóptico (Figs 23B, 24C), paraventricular (Fig. 24D) y supraquiasmático (Fig. 23B) y el núcleo habenular medial (dato no mostrado). En el rombencéfalo, las áreas que exhibían ARNm de R-IGF-I incluían los núcleos pontinos, el tracto solitario, los núcleos gracile, cuneatus e hipogloso, la oliva inferior y la formación reticular (datos no mostrados).

2. REGULACION DE IGF-I Y SU RECEPTOR EN SNC

2.1. Regulación de IGF-I en situaciones de disminución de GH

2.1.1. Envejecimiento

La distribución del marcaje para IGF-I en SNC de ratas jóvenes y envejecidas sin tratamiento previo alguno correspondía al descrito anteriormente. El patrón de distribución y la intensidad del marcaje para IGF-I en SNC de ratas jóvenes fue similar al observado en ratas envejecidas, sin encontrarse cambios, con la excepción de la EM.

En la EM de ratas jóvenes la inmunotinción para IGF-I se presentaba como un producto de reacción de muy débil intensidad en fibras nerviosas que atravesaban la capa fibrilar de la ziEM (Figs 27A,B). La intensidad del marcaje para IGF-I de las ratas envejecidas fue notablemente incrementado en todos los niveles la EM (Figs 27C-H). El patrón de distribución del marcaje también presentó cambios. Fibras varicosas con grandes dilataciones se localizaban en la capa fibrilar y, característicamente, en la hipopendimal de la ziEM. Algunas fibras inmunoreactivas se hallaban en la capa pendimal entre los tanicitos, extendiéndose junto al lumen ventricular. En ocasiones dichos axones inmunoreactivos, aparentemente, aparecían en el interior del tercer ventrículo, en contacto con el LCR.

2.1.2. Diabetes inducida por estreptozotocina

En el modelo de diabetes, además de analizar el inmunomarcaje para IGF-I, también estudiamos la posible intervención de otros reguladores de los somatotropos, el péptido inhibidor SOM (Vale y col., 1973) y los estimuladores GRF (Brazeau y col., 1982) y galanina (Maiter y col., 1990).

En el momento del sacrificio los animales inyectados con STZ mostraron una marcada hiperglucemia (>400 mg/dl), glucosuria (>5 g/dl), así como una aparente pérdida de peso y poliuria.

La distribución inmunocitoquímica de SOM, GRF y galanina en el hipotálamo correspondía con la descrita en trabajos anteriores (Bennett-Clarke 80, Merchenthaler 84, Palkovits 87). La mayor población de somas positivos para SOM se disponía a lo largo de la pared del tercer ventrículo del hipotálamo anterior (Fig. 28), mientras que la densidad más alta de fibras inmunoreactivas se hallaban en la zeEM (Fig. 29). Tanto GRF-IR como galanina-IR se encontraron principalmente concentrados en fibras que cursaban por la zeEM (Fig. 30). En áreas hipotalámicas apenas fueron observados somas positivos para GRF y galanina, ya que sin manipulaciones previas los niveles de péptido inmunoreactivo son muy bajos (Merchenthaler 84, Palkovits 87). La localización de IGF-I-IR en el hipotálamo fue la

descrita anteriormente.

De los cuatro péptidos estudiados, únicamente IGF-I presentó diferencias en el patrón de inmunotinción asociadas con la administración de STZ. En las ratas diabéticas se observó un incremento en la inmunoreactividad para IGF-I en los somas de los núcleos paraventricular (Figs 31A,B), supraóptico (Figs 31C,D) y accesorios magnocelulares, respecto al débil marcaje presente en los animales controles. A diferencia de los animales controles, donde no se encontró positividad para IGF-I en células de la adenohipófisis, la diabetes inducida por STZ provocó la aparición de células dispersas, positivas para IGF-I (Fig. 32).

2.1.3. Consideraciones respecto a la regulación de IGF-I en situaciones de supresión de GH.

En los dos modelos experimentales anteriormente descritos, acompañando la supresión de GH, encontramos alteraciones de IGF-I-IR. En un principio, el objetivo del presente estudio fue analizar las posibles interacciones entre dos factores implicados en el crecimiento, GH e IGF-I, en el eje hipotálamo-hipofisario. Sin embargo, la localización celular de IGF-I y sus receptores en el sistema hipotalámico neurohipofisario (SHN) apuntaban hacia una posible relación entre IGF-I y las hormonas neurohipofisarias, OT y AVP. Un examen de la bibliografía sobre los dos modelos estudiados anteriormente, además de mostrar alteraciones en la fisiología de los somatotropos, también revela modificaciones en las neuronas magnocelulares del SHN. La relación existente entre los dos modelos estudiados (envejecimiento y diabetes) con la actividad del SHN nos llevo a diseñar experimentos donde se examinara la posible participación de IGF-I en modelos específicos de estimulación del SHN.

2.2. Regulación de IGF-I en situaciones características de activación del sistema magnocelular oxitocinérgico

En base a la colocalización mayoritaria de IGF-I-IR con OT-IR, elegimos dos modelos en los cuales, a pesar de estimularse la actividad de las dos poblaciones neuronales magnocelulares, están más relacionados con OT que con AVP. Uno de ellos fue la gestación a término y la lactancia, situaciones clásicas de activación y plasticidad del sistema oxitocinérgico (Van Tol y col., 1988; Poulain y Wakerley, 1982; Theodosis y Poulain, 1993). El segundo fue un tipo de estrés agudo, el cual parece estar principalmente relacionado con la liberación de OT (Romero y col., 1993).

2.2.1. Preñez a término y lactancia

Tras el procesamiento inmunocitoquímico para IGF-I, al comparar los núcleos paraventricular y supraóptico (Fig. 33), así como las neurohipófisis (Fig. 34) no se encontraron diferencias entre los animales controles, preñados a término y lactantes. El inmunomarcaje de los tres grupos analizados fue muy débil y en el hipotálamo apenas se podían definir somas.

En paralelo se analizó el inmunomarcaje para AVP y OT en el lóbulo posterior de la hipófisis de los tres grupos experimentales. Como se puede observar en la fig. 34 mientras que el patrón de inmunomarcaje para IGF-I en las neurohipófisis no mostraba diferencias, la inmunoreacción para las dos neurohormonas, principalmente AVP, presentaba un disminución en los animales preñados a término como en los lactantes comparados con los controles, como se ha descrito con anterioridad (Van Tol y col., 1988; Crowley y col., 1993).

2.2.2. Estrés provocado por inmovilización

Tras el procesamiento inmunocitoquímico para el IGF-I del eje hipotálamo-hipofisario de animales controles y estresados (15 min y 45 min) no se observaron cambios aparentes ni en la distribución ni en la intensidad del marcaje para dicho factor (datos no mostrados). Como validación de la situación estresante se analizó la inmunoreactividad para la ACTH₍₁₋₂₄₎ en las adenohipófisis de todos los animales. Después del estímulo estresante se observó un incremento de células positivas así como de su intensidad de inmunorreacción para la corticotropina en el lóbulo anterior de la hipófisis tanto en las ratas estresadas durante 15 min como en las ratas estresadas durante 45 min. El incremento en la inmunoreacción para ACTH fue menos marcado tras 45 min que tras 15 min (Fig. 35).

2.2.3. Consideraciones respecto a la regulación de IGF-I en situaciones características de activación del sistema oxitocinérgico

Las situaciones fisiológicas que afectan de modo característico a la actividad del sistema oxitocinérgico examinadas en este trabajo no originaron ningún cambio apreciable en la inmunoreactividad para IGF-I en el SHN. Es de señalar que si bien en estas situaciones se incrementa la actividad del sistema magnocelular hipotalámico, en ninguna de ellas se generan estímulos, como son cambios de la osmolaridad plasmática, que pudieran estar relacionados con la secreción de AVP para regulación del balance hídrico. Si reconsideramos los resultados obtenidos al estudiar el envejecimiento y la diabetes mellitus, encontramos que

estas dos situaciones están relacionadas con actividad del SHN, más concretamente con el vasopresinérgico y su funcionalidad como regulador del balance hídrico. Además, en los modelos de envejecimiento y diabetes si que encontramos una regulación de la inmunoreactividad para IGF-I. Todo ello nos llevó a examinar la posible regulación de IGF-I durante deshidratación, situación que si bien activa (una vez más) las dos poblaciones magocelulares, es la que tiene una relación fisiológica mas estrecha con AVP.

2.3. Regulación de IGF-I y de los ARNm de IGF-I y de R-IGF-I en situaciones características de activación del sistema magnocelular vasopresinérgico.

2.3.1. Deshidratación.

Como modelo de hiperactividad del SHN empleamos la deshidratación. Durante la estimulación osmótica se induce un aumento en la expresión y liberación de las hormonas neurohipofisarias AVP y OT, así como fenómenos de plasticidad neuronal, principalmente en el sistema oxitocinérgico (Theodosis y Poulain, 1993).

Empleando un modelo de deshidratación aguda (24 horas) se observaron cambios en la expresión IGF-I-IR y de su ARNm, sin observarse variaciones en la expresión del ARNm del R-IGF-I. Con el objeto de analizar si la deshidratación a tiempos más prolongados podría llegar a alterar los niveles del ARNm de IGF-I, se usó un modelo de deshidratación crónica intermitente (seis días).

Regulación de IGF-I-IR y su ARNm.

La hiperosmolaridad provocada en las ratas deshidratadas durante 24 horas incrementó notablemente el inmunomarcaje para IGF-I en neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos paraventricular (Fig 36A,B), supraóptico (Fig 36C,D) y accesorios, así como en fibras nerviosas de la neurohipófisis (recuadros en Fig 36A,B). Sin embargo, no se observó ninguna diferencia ni en la distribución ni en la intensidad de la inmunoreacción para IGF-I en células de la corteza cerebral (recuadros en Fig 36C,D). El patrón de colocalización con las hormonas neurohipofisarias durante la deshidratación aguda fue el mismo que el descrito en animales tratados con colchicina (datos no mostrados).

El análisis densitométrico de las bandas hibridadas con la ribosonda de IGF-I mediante el ensayo de protección de ribonucleasas mostró un incremento en la expresión del gen de IGF-I en los hipotálamos de ratas deshidratadas durante 24 horas respecto a aquellos otros de ratas controles (Fig. 37).

Durante la deshidratación aguda no se observaron modificaciones en los niveles de IGF-I-IR circulantes. En los controles 102.6 ± 15 ng/ml y en los animales deshidratados

114.4 ± 11.5 ng/ml.

Regulación del ARNm de R-IGF-I.

En los animales deshidratados durante 24 horas no se encontraron diferencias en los niveles de ARNm del R-IGF-I (datos no mostrados).

Tras seis días de deshidratación intermitente se encontró un incremento en la inmunoreactividad de la proteína c-Fos en neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico (Fig 38A,C) y paraventricular. Los animales deshidratados mostraron un incremento en la expresión del ARNm de R-IGF-I en el núcleo supraóptico (Fig 38B,D). Sin embargo, no se encontraron cambios en la expresión de los transcritos de R-IGF-I en el núcleo paraventricular (datos no mostrados). Las neuronas magnocelulares que expresaban un incremento en la acumulación del ARNm de R-IGF-I también mostraban una intensa inmunoreactividad para c-Fos (recuadros en Fig 38).

2.3.2. Consideraciones respecto a la regulación de IGF-I y R-IGF-I en el SHN

Volviendo a revisar todos los resultados obtenidos hasta el momento, observamos que cada vez eran más los datos que indicaban una posible interacción de IGF-I con las hormonas neurohipofisarias. Debido a las propiedades tróficas de IGF-I y a que el sistema oxitocinérgico es el sistema que fundamentalmente experimenta fenómenos de plasticidad, IGF-I podría estar relacionado con OT. Sin embargo, en los diferentes modelos estudiados, cuando encontramos regulación de la expresión de IGF-I también existían cambios en la osmolaridad y alteraciones en el equilibrio hídrico. Por otro lado, entre las áreas que presentaban una mayor expresión del gen de R-IGF-I estaban aquellos órganos circunventriculares que funcionan como osmorreceptores. Durante el estímulo osmótico se incrementa la síntesis y la liberación de las dos neurohormonas, siendo AVP la que tiene un papel decisivo en la homeostasis del organismo, sin que se conozca la función que desempeña OT durante la estimulación osmótica. Por ello nos planteamos el analizar la posible influencia de IGF-I sobre AVP. En primer lugar, mediante dobles marcajes examinamos la posible presencia de transcritos de R-IGF-I en las neuronas vasopresinérgicas. Posteriormente estudiamos el posible papel regulador de IGF-I en la liberación de AVP.

3. INTERACCIONES DE IGF-I CON AVP EL SHN DE RATA ADULTA

3.1. Coexistencia del ARNm de R-IGF-I con AVP en neuronas magnocelulares hipotalámicas.

Como se muestra en la figura 39, la señal de hibridación del ARNm de R-IGF-I fue detectada en neuronas que expresaban inmunoreactividad para AVP. Además de las neuronas vasopresinérgicas, otras células negativas para AVP también presentaban transcritos del R-IGF-I, siendo probablemente neuronas oxitocinérgicas.

3.2. Efecto de la administración icv de anticuerpos α -IGF-I sobre los niveles de AVP.

Teniendo en cuenta los resultados anteriormente descritos en lo referente a la localización y regulación de IGF-I y de su receptor en el SHN, se analizó el posible papel regulador de IGF-I sobre la neurohormona AVP, midiéndose los niveles de AVP en ratas deshidratadas a las cuales se les administró previamente anticuerpos α -IGF-I por vía icv.

Tras 24h de deshidratación, el contenido de AVP-IR disminuyó significativamente ($Sch=4.38$, $p<0.005$) en las neurohipófisis de los animales deshidratados tratados con Ab-IGF-I, respecto a aquellos tratados con Ab-IGF-I sin deshidratar (Fig. 40A). Se apreció una disminución en los niveles de AVP-IR en las neurohipófisis de los animales deshidratados tratados con NRS, respecto a los que tuvieron acceso a agua normal tratados con NRS, aunque dicho descenso no fue estadísticamente significativo (Fig. 40A). En las restantes áreas estudiadas no se observó ningún cambio en el contenido de AVP-IR en ningún grupo (Figs 40B,C).

Fig. 1. (A) Curva standard del RIA de IGF-I y reacción de cruce con IGF-II y proinsulina. 100 μ l del antisuero α -IGF-I, a una dilución final de 1/15.000, se hicieron reaccionar con 100 μ l de cada concentración de IGF-I₁₋₇₀, IGF-II y proinsulina. (B) Western blot donde se muestra que el antisuero FL-51089 reconoce a IGF-I₁₋₇₀ recombinante humano y no al IGF-II₁₋₆₇ recombinante humano. MW= proteínas de pesos moleculares standar. (C-E) Fotomicrografías que muestran células del asa de Henle inmunoreactivas para IGF-I en la médula del riñón de ratas tratadas con colchicina. Barras de calibrado: C,E= 20 μ m, E= 50 μ m.

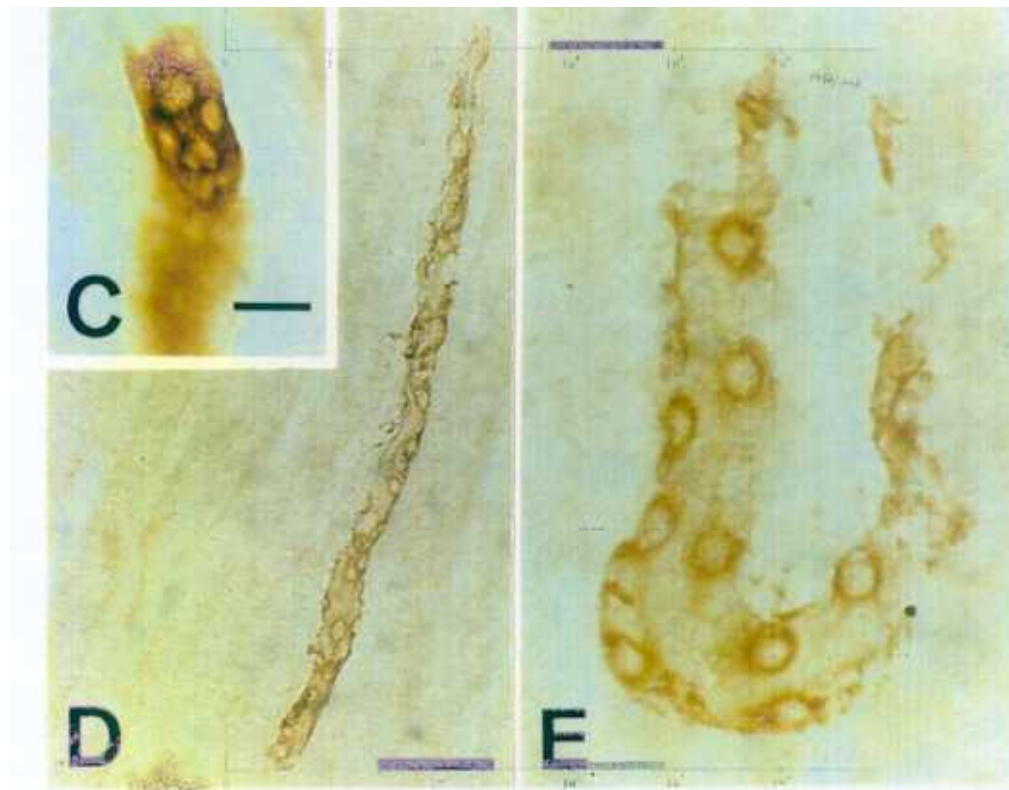
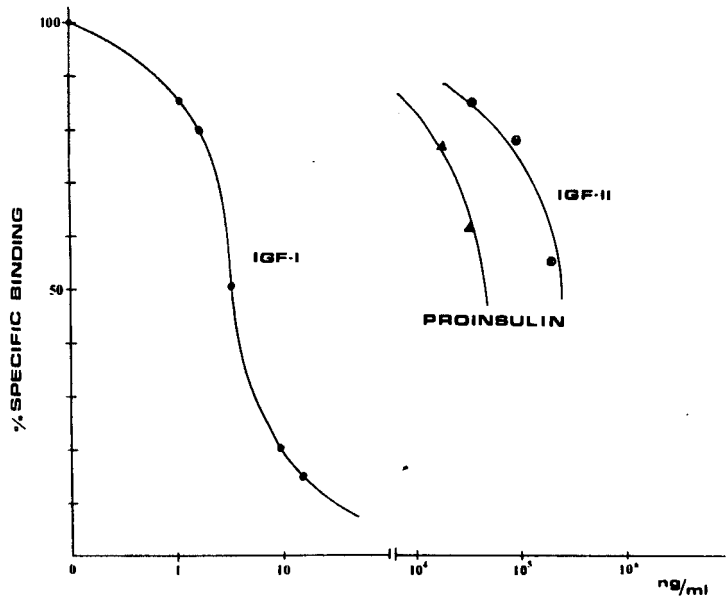


Fig. 2. Fotomicrografías del núcleo anterior comisural hipotalámico de rata (A,B) y de corteza cerebelosa humana (C,D) inmunotefñidas con el antisuero FL-51089 (A,C) o con el mismo antisuero previamente preadsorbido con 1.45 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de IGF-I₁₋₇₀ recombinante humano (B,D). Obsérvese la falta de inmunoreactividad en los controles (B,D). Barras de calibrado: A,B= 100 μm , C,D= 400 μm .

D

E

A

B

C

D

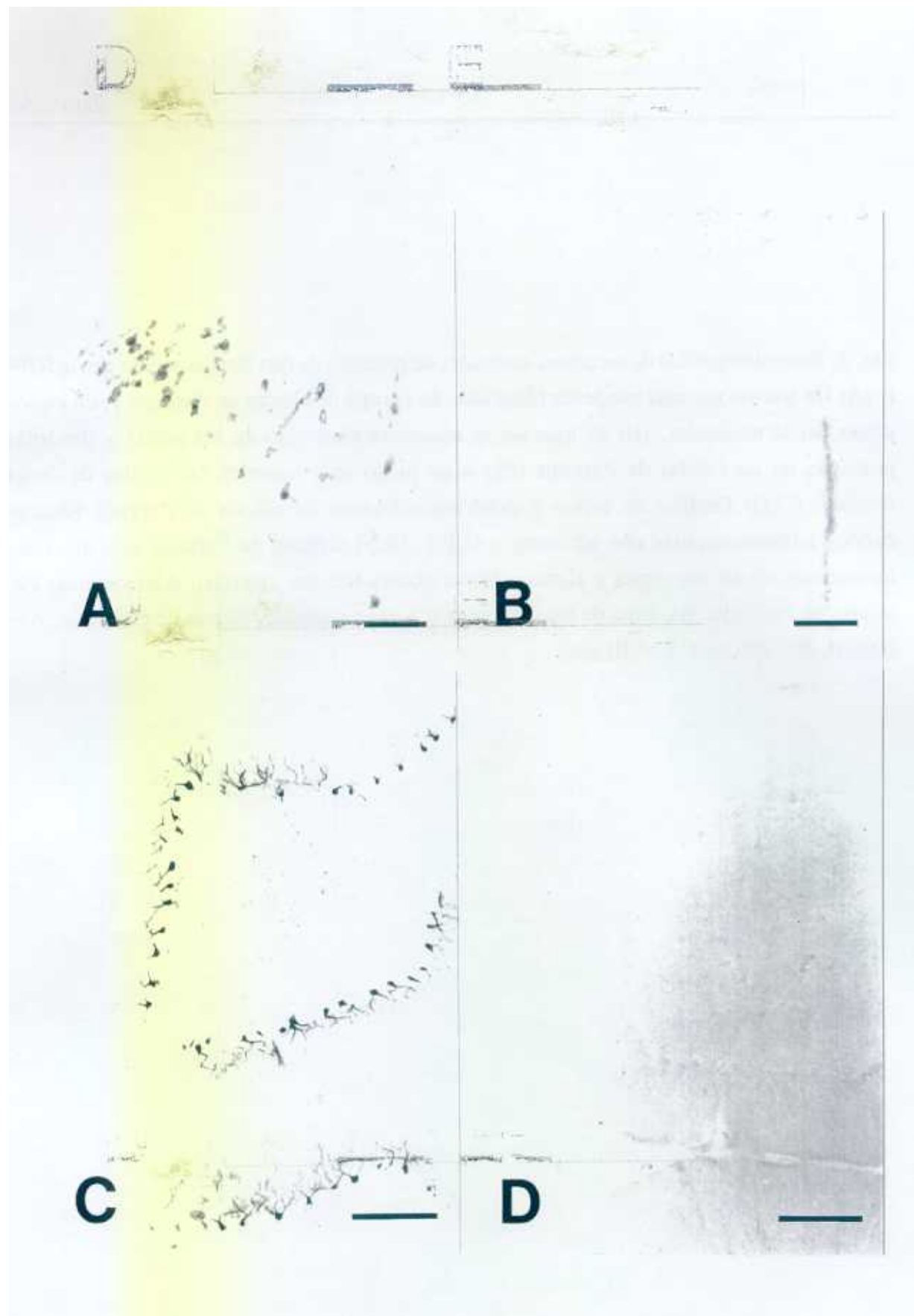


Fig. 3. Fotomicrografías de secciones coronales de cerebelo de rata inmunoteñido con α -IGF-I. (A) Un intenso marcaje puede ser observado en la capa de células de Purkinje y, en menor grado, en la molecular. (B) El marcaje se encuentra contenido en los somas y dendritas primarias de las células de Purkinje (Pk) y de modo muy tenue en las células de Golgi (flecha). (C,D) Detalles de somas y dendritas primarias de células de Purkinje (flechas curvas) inmunomarcadas con antisuero α -IGF-I. (E,F) Células de Purkinje que muestran inmunomarcaje en sus somas y algunos de sus axones (flechas abiertas). Abreviaturas: Pk, células de Purkinje; grl, capa de los granos; mol, capa molecular. Barras de calibrado: A = 200 μ m, B = 20 μ m, C-F = 10 μ m.

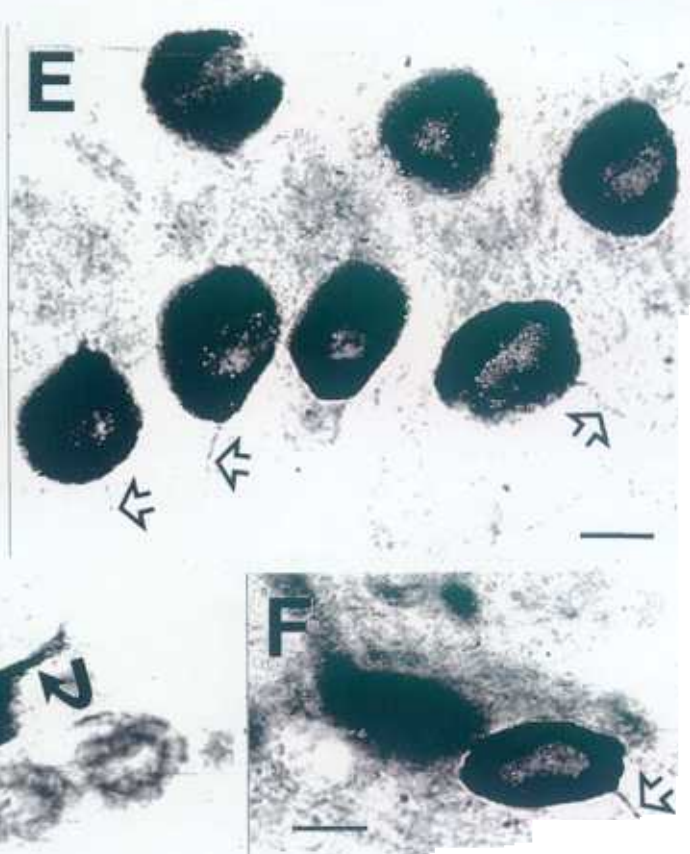
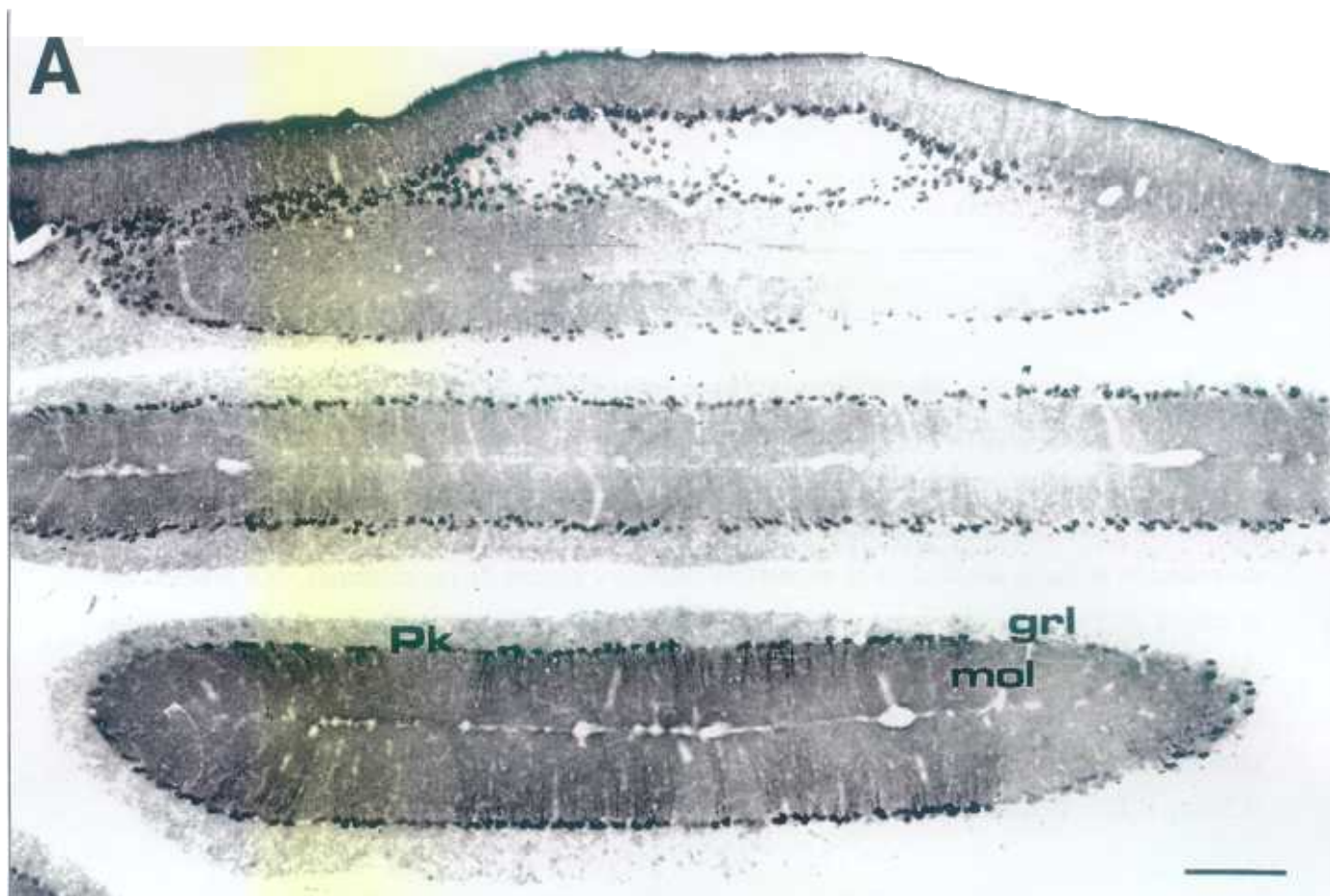


Fig. 4. Fotomicrografías electrónicas que muestran células de Purkinje de rata positivas para IGF-I. (A) El producto de reacción denso a los electrones es observado en algunas cisternas del retículo endoplásmico rugoso. La flecha curva indica un aparato subcisternal de membrana. (B) Detalle del retículo endoplásmico rugoso donde se aprecia que el producto de reacción se halla asociado a la superficie interna y lumen de las cisternas. (C) Núcleo de la célula de Purkinje con inmunoreacción para IGF-I en ciertos segmentos de la membrana nuclear (puntas de flecha). (D) Inmunoreactividad para IGF-I en el interior de un cuerpo multivesicular (flecha). Nótese en la proximidad de estructuras inmunoreactivas para IGF-I como otras membranas celulares permanecen sin inmunoreacción. Barras de calibrado: A,C= 0.5 μ m, B,D= 0.1 μ m.

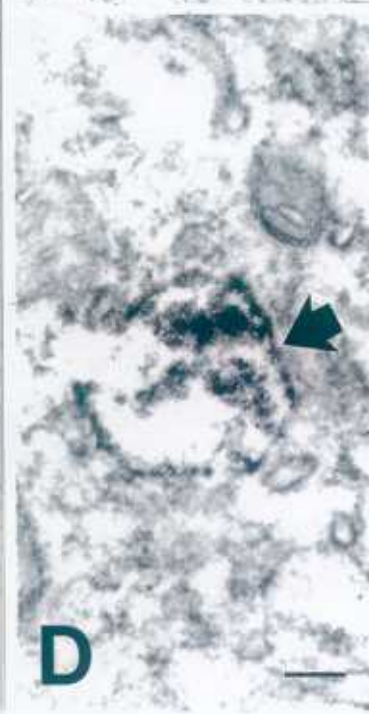
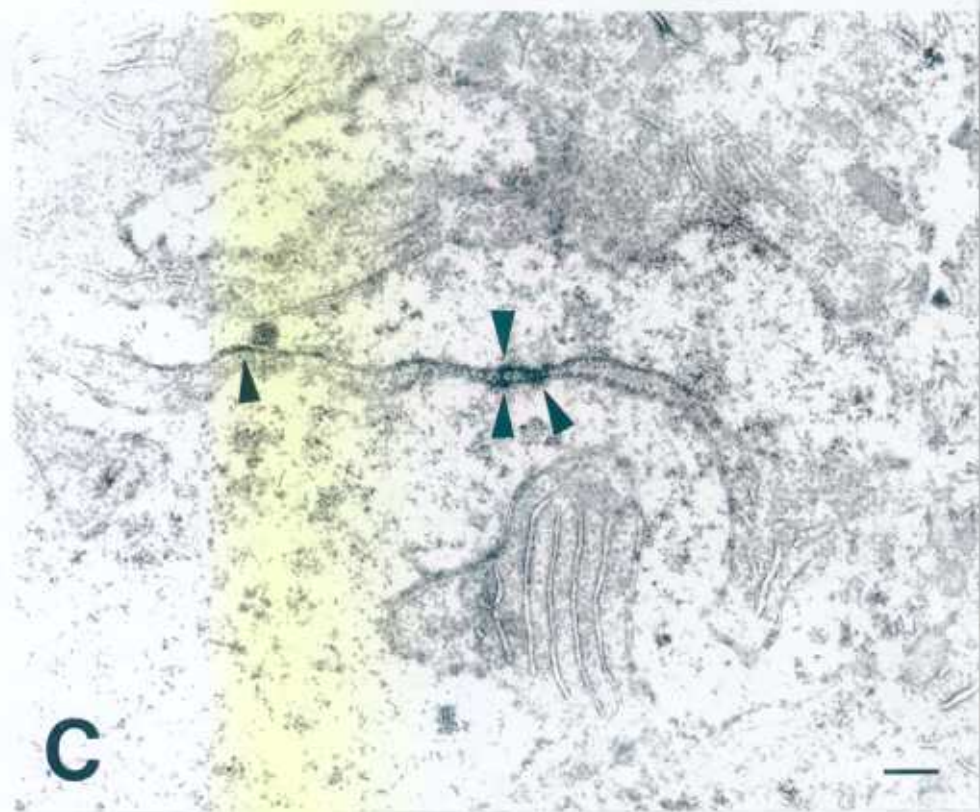
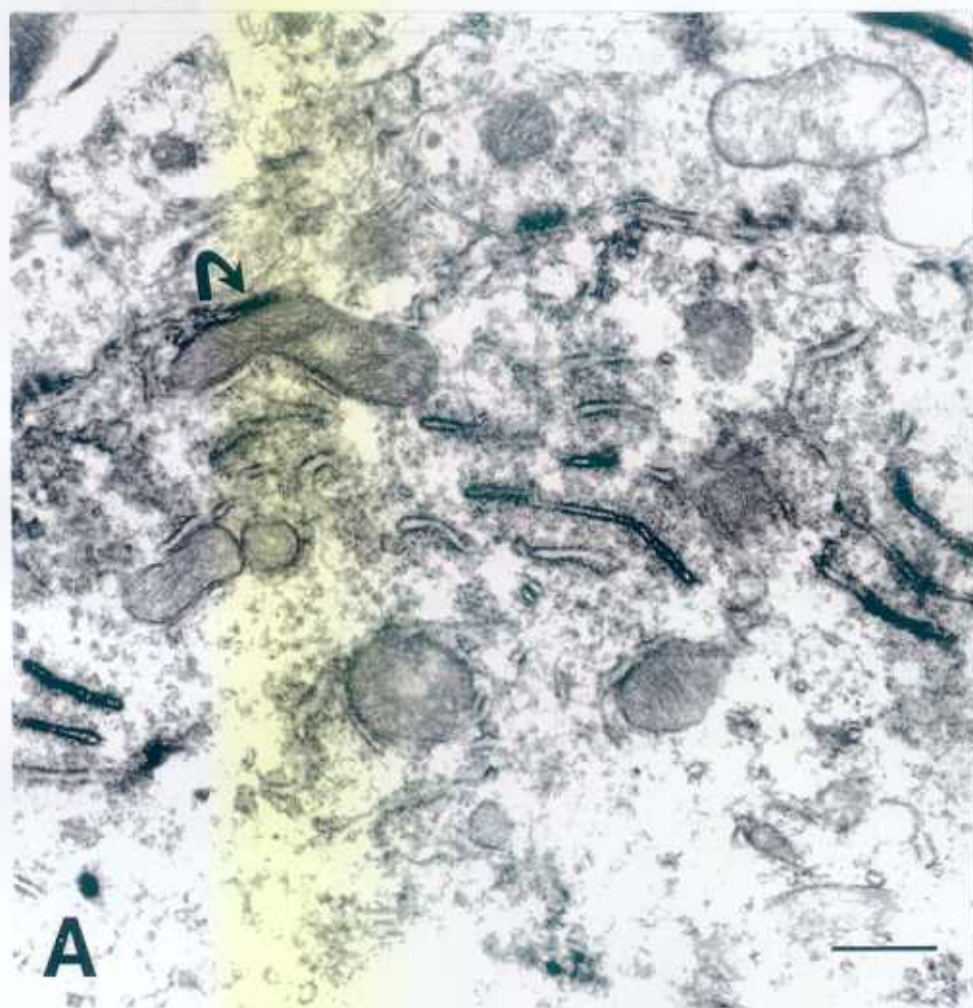


Fig. 5. Fotomicrografías de secciones coronales hipotálamicas de rata incubadas con α -IGF-I y visualizado con anticuerpos conjugados con fluoresceína. (A) Neuronas magnocelulares positivas del núcleo paraventricular. (B) Detalle del núcleo paraventricular, donde se aprecia la localización citoplasmática de IGF-I. (C) Inmunofluorescencia en somas del núcleo supraóptico. El asterisco indica el tercer ventrículo. Abreviaturas: OX, quiasma óptico. Barras de calibrado: A = 100 μ m, B,C = 20 μ m.

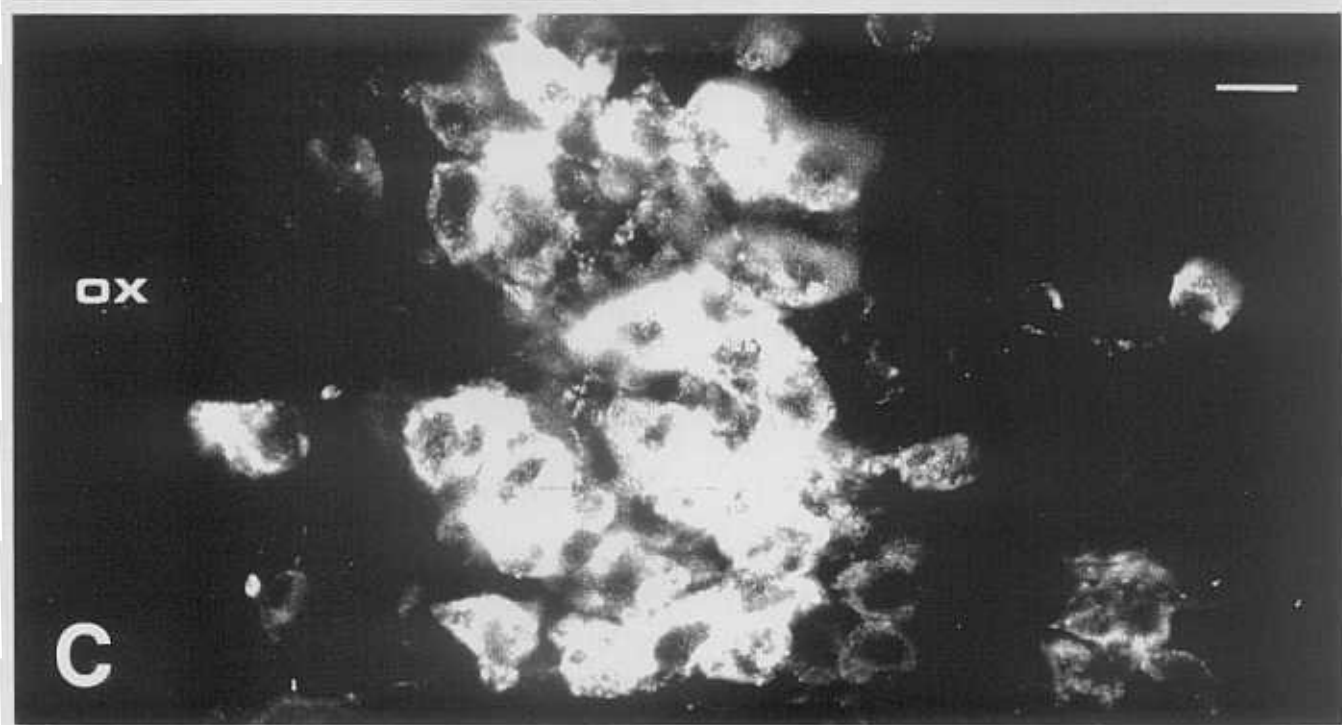
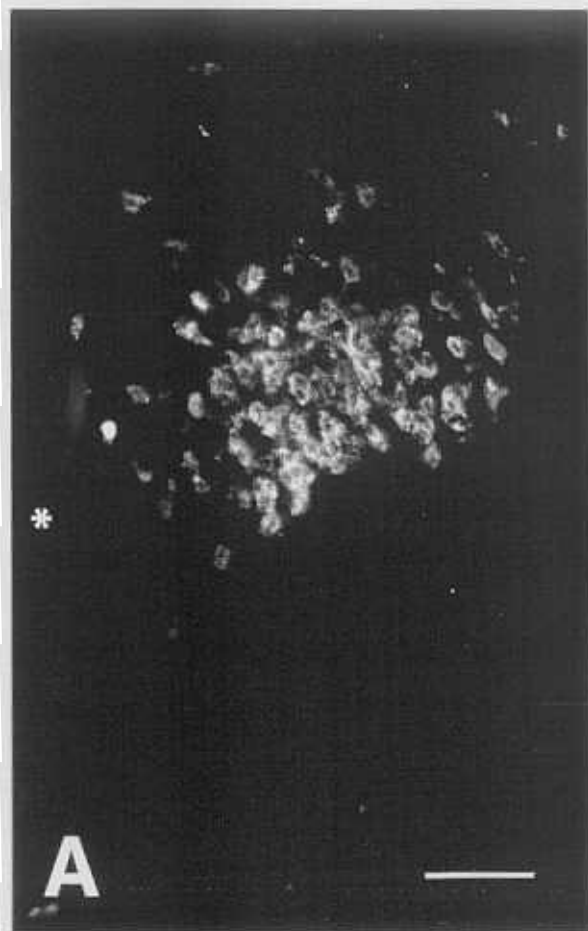


Fig. 6. Fotomicrografías de secciones coronales hipotalámicas de rata marcadas para visualizar IGF-I siguiendo la técnica del la PAP. (A) Distribución de células inmunoreactivas para IGF-I a nivel del hipotálamo anterior. Neuronas positivas se observan en los núcleos de la estría terminal (BST), comisural anterior (AC), periventricular (Pe) y en el área hipotalámica anterior (AHy). (B) Mayor aumento de las neuronas perivasculares positivas mostradas en A (flecha abierta). Nótese la asociación de las neuronas positivas con el lumen de los vasos sanguíneos (asteriscos). (C) Neuronas positivas para IGF-I detectadas en el área preóptica lateral. (D) Inmunoreactividad para IGF-I en células del núcleo de la estría terminal. Abreviaturas: 3V, tercer ventrículo; f, fornix; ic, capsula interna. Barras de calibrado: A = 200 μ m, B-D = μ m.

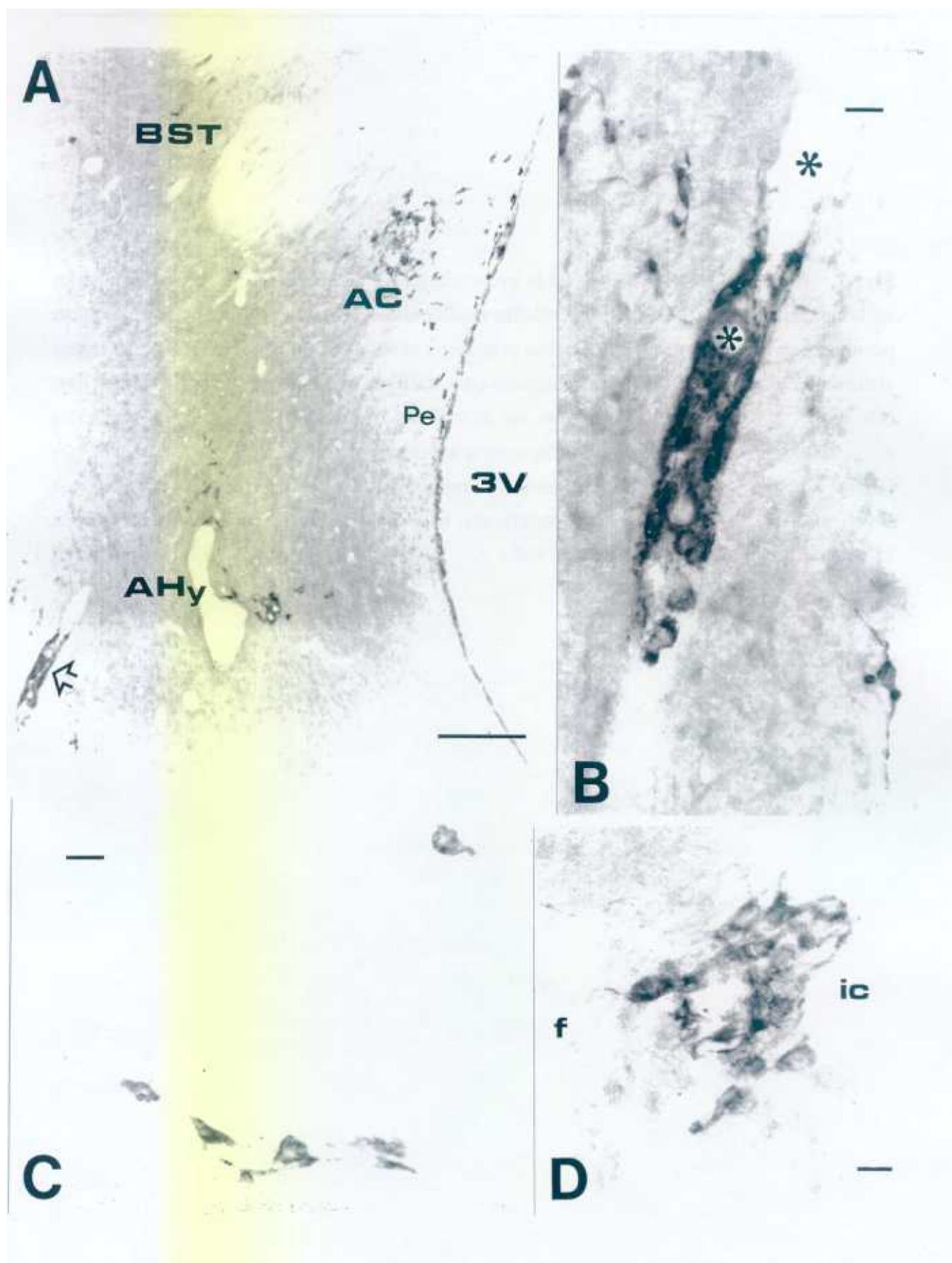


Fig. 7. Fotomicrografías que ilustran la presencia de fibras nerviosas y posibles terminales inmunoreactivos para IGF-I en hipotálamo mediobasal de rata. (A) Distribución de fibras positivas que cursan por la ziEM (flechas grandes) y zeEM (flechas pequeñas). (B) Obsérvese el elevado número de fibras inmunoreactivas para IGF-I en el lóbulo posterior de la hipófisis. (C) Fibras varicosas inmunoreactivas en hipotálamo ventrolateral. El recuadro muestra estructuras puntiformes positivas semejantes a terminales nerviosos (algunas indicadas por flechas abiertas) en la región periventricular hipotalámica, los asteriscos indican el tercer ventrículo. Abreviaturas: 3V, tercer ventrículo; PL, lóbulo posterior hipofisario; IL, lóbulo intermedio hipofisario. Barras de calibrado: A = 50 μ m, B = 100 μ m, C = 20 μ m, recuadro en C = 10 μ m.

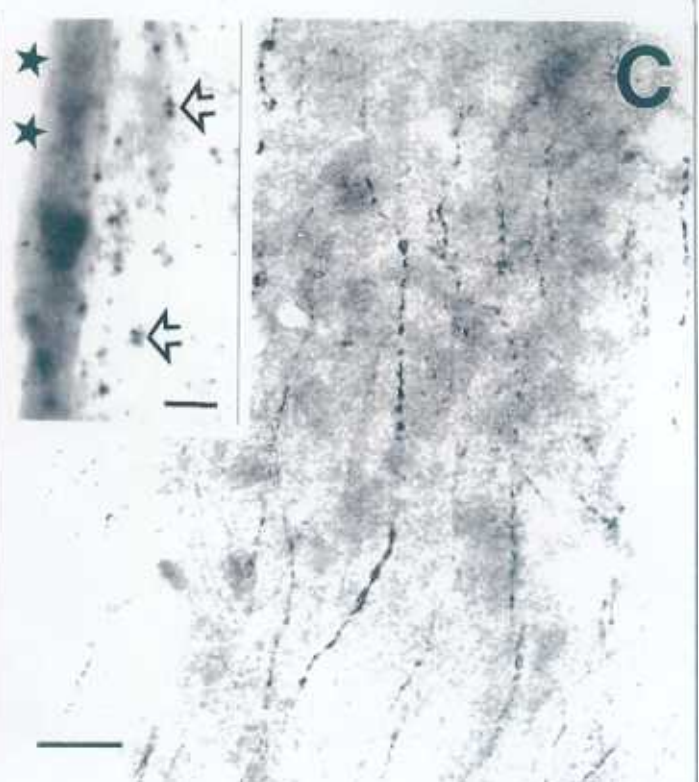
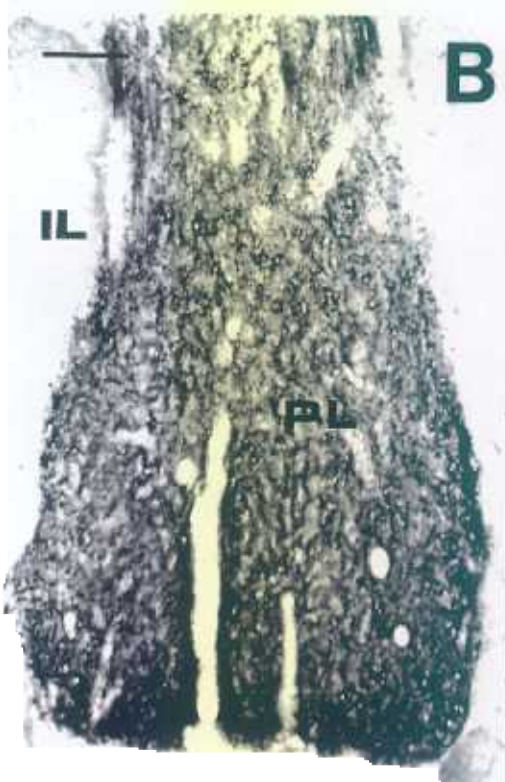
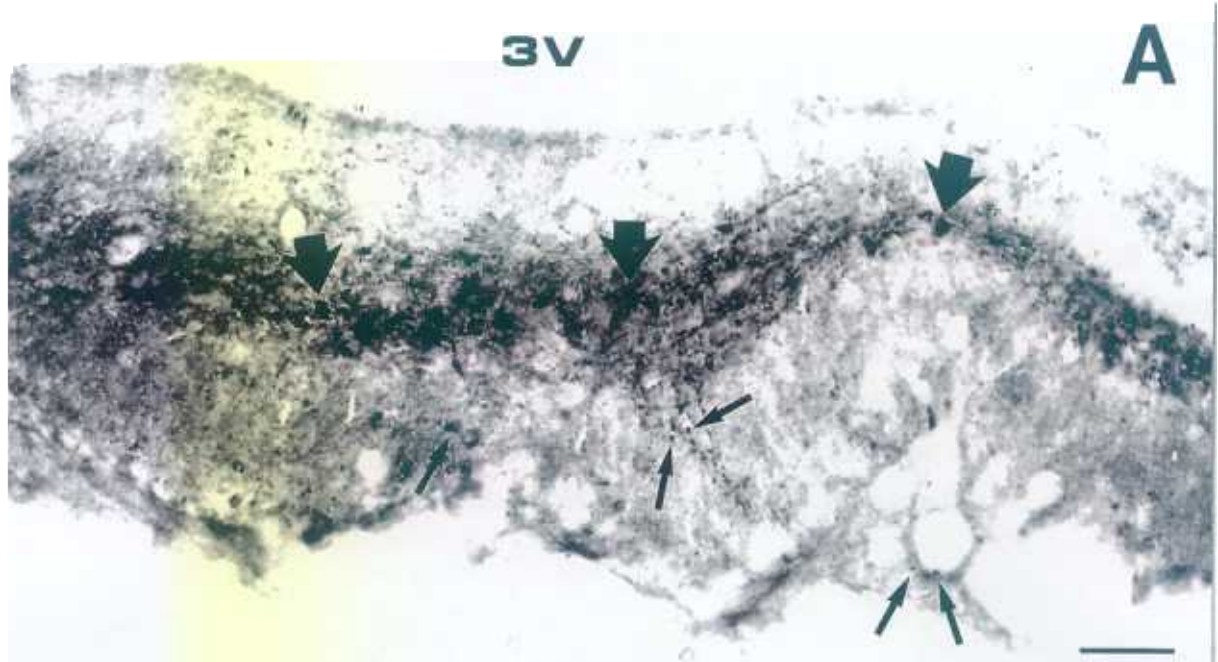
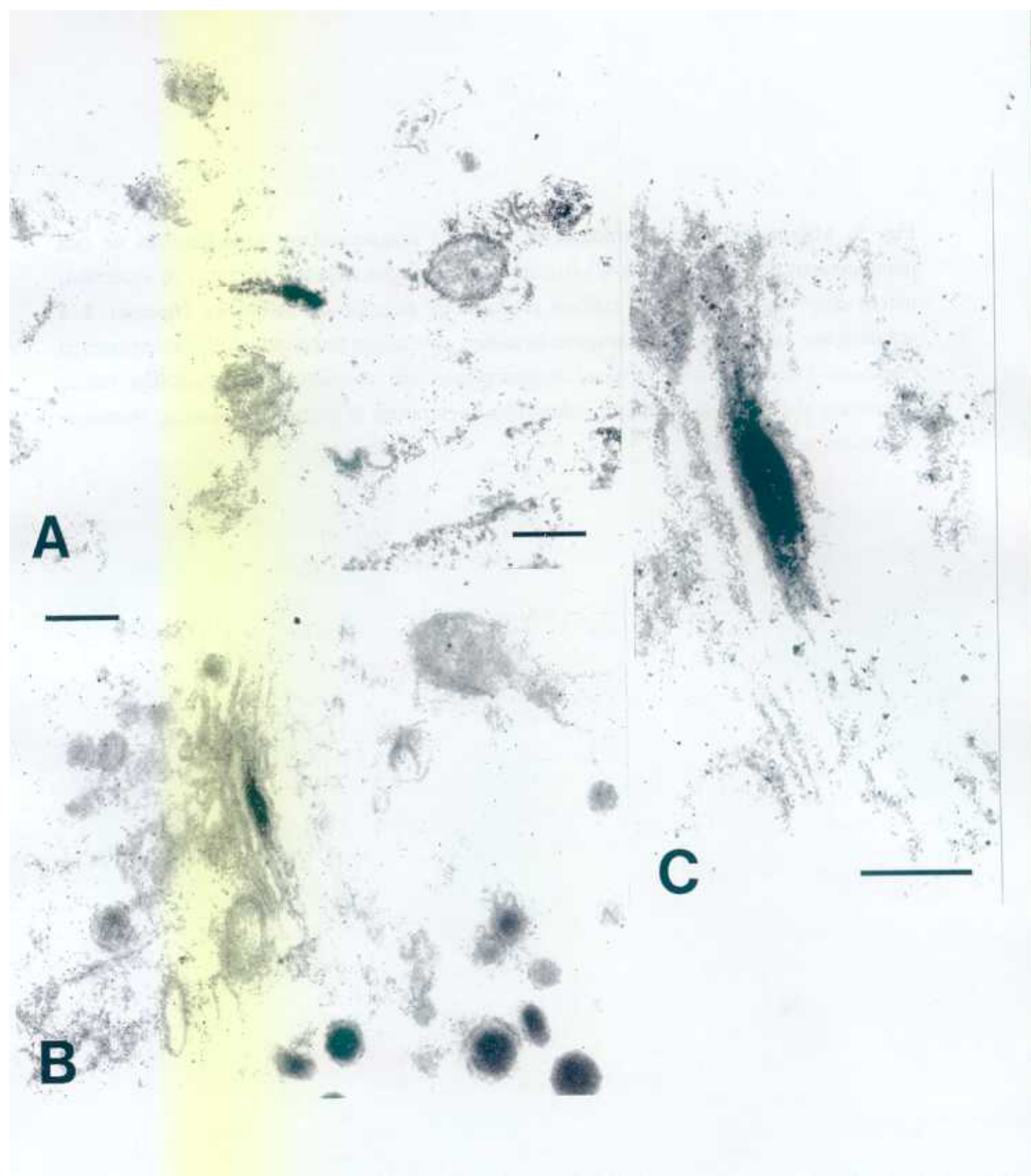


Fig. 8. Microfotografías electrónicas de neuronas magnocelulares hipotálamicas de rata procesadas para la localización de IGF-I. (A) Imagen que muestra un intenso marcaje en el interior de una cisterna del retículo endoplásmico. (B) Producto de reacción asociado a cisternas del aparato de Golgi, obsérvese los granulos de secreción en proximidad al Golgi. (C) Detalle a mayor aumento de la imagen anterior, donde se aprecia el inmunomarcaje en el interior de las cisternas del Golgi. Barras de calibrado: A,B= 200nm; C= 100nm



A



B

C



Fig. 9. Microfotografías electrónicas de neuronas magnocelulares hipotálamicas de rata inmunoreactivas para IGF-I. (A-C) Distintas imágenes que muestran gránulos de secreción, notese como algunos de ellos exhiben producto de reacción en su interior (flechas). Los gránulos que contienen la inmunoreacción suelen presentarse fracturados. Probablemente, al realizarse los cortes ultrafinos, el inmunoprecipitado obtenido en preinclusión ofrece resistencia al paso de la cuchilla produciendo fracturas en la sección histológica. Barras de calibrado: A-C = 100nm.

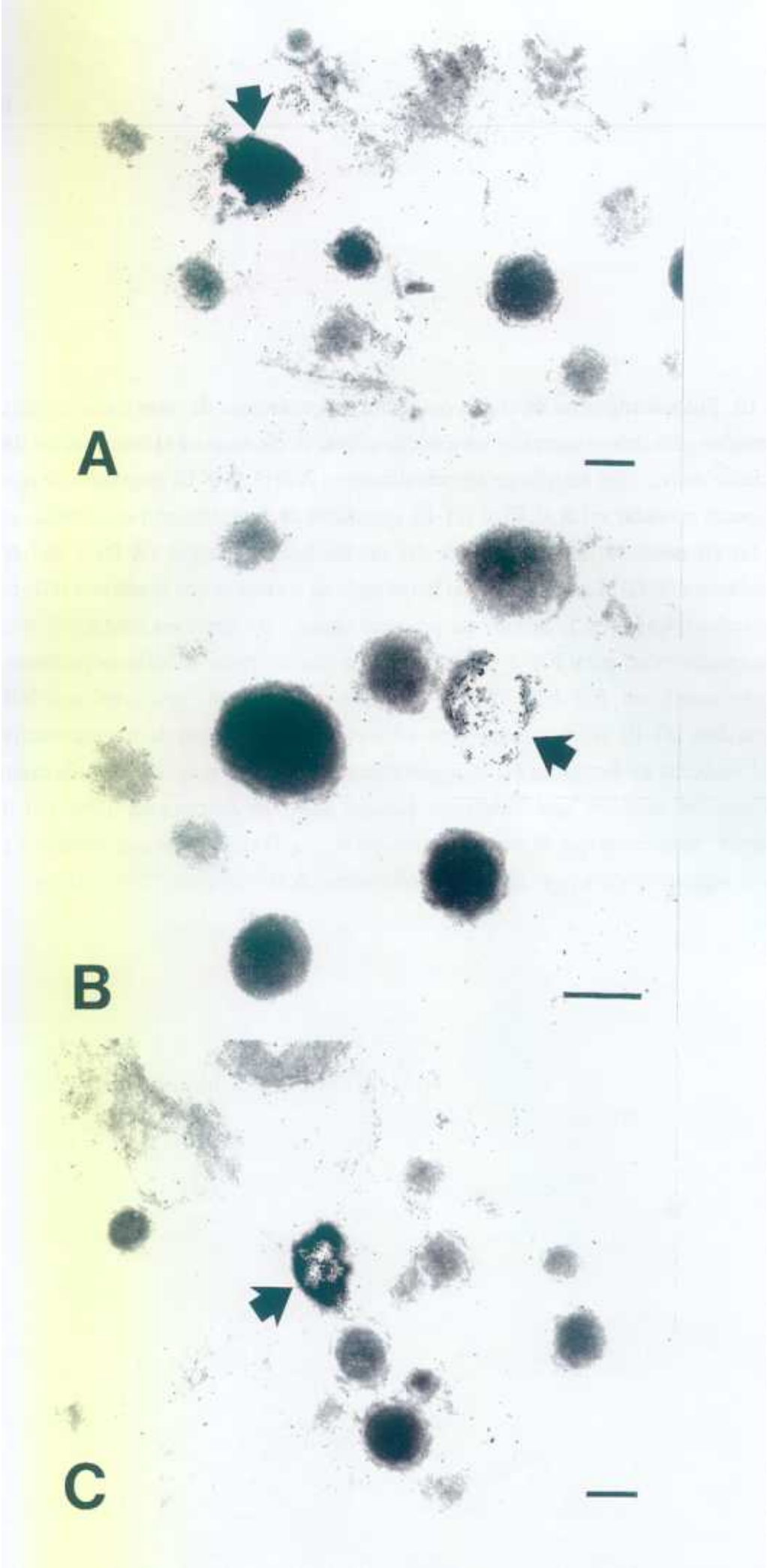


Fig. 10. Fotomicrografías de cortes coronales hipotalámicos de ratas tratadas con colchicina procesados para dobles marcajes inmunocitoquímicos. Se muestra la distribución de IGF-I-IR (producto de reacción marrón de aspecto difuso en A-G), AVP-IR (producto de reacción azul de aspecto granular en A,C,E) y OT-IR (producto de reacción azul de aspecto granular en B,D,G) en neuronas magnocelulares del núcleo paraventricular (A-D) y del área lateral hipotalámica (E-G). Obsérvese como la mayoría de neuronas que contienen IGF-I-IR no son vasopresinérgicas (A,C), aunque un pequeño número de neuronas magnocelulares exhiben inmunoreactividad para IGF-I y AVP (E). La mayor parte de células positivas para OT también contienen IGF-I-IR (B,D). En muy pocos casos, neuronas con IGF-I-IR no presentaban OT-IR (F) y algunas otras oxitocinérgicas carecían de inmunoreactividad para IGF-I (cabezas de flecha en G). Ningún cuerpo celular, ni ninguna fibra de color azul fue detectada en regiones que contienen células positivas únicamente para IGF-I (corteza cerebral), sugiriendo que la primera reacción con la DAB provee una completa protección para el segundo anticuerpo. Barras de calibrado: A,B= 100 μ m; C-G= 10 μ m.

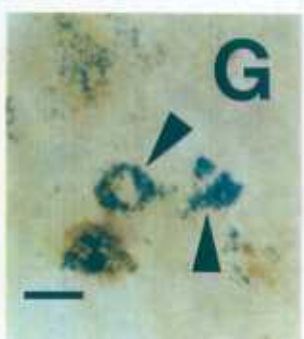
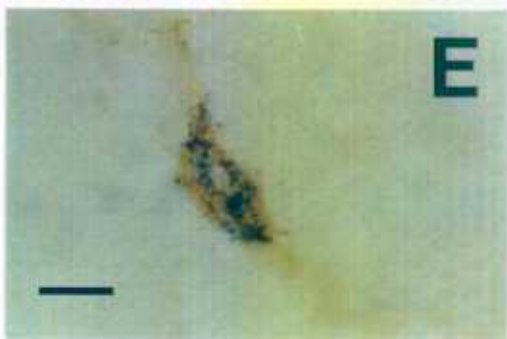
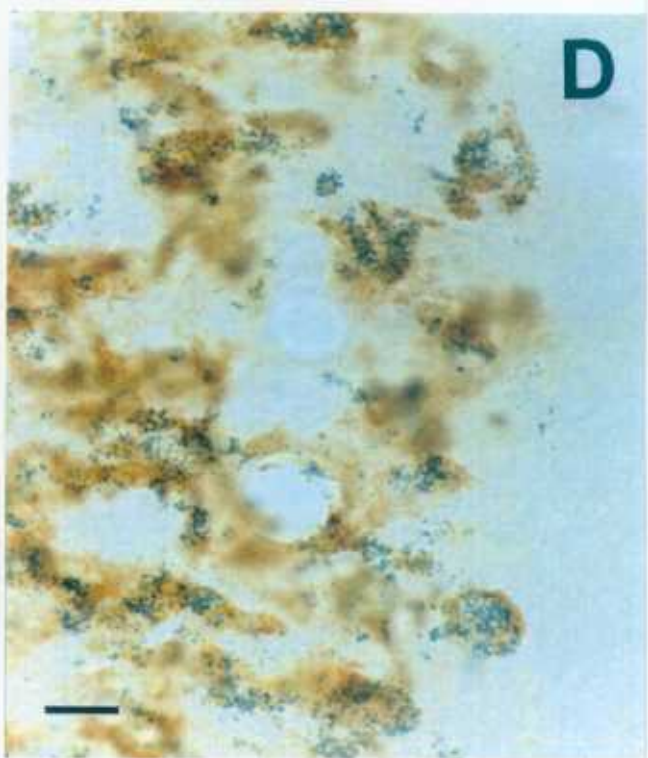
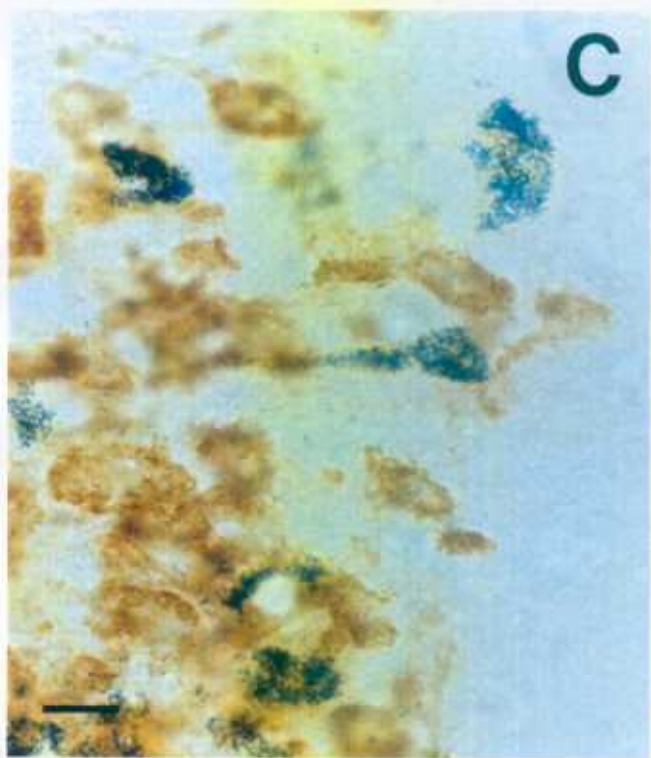
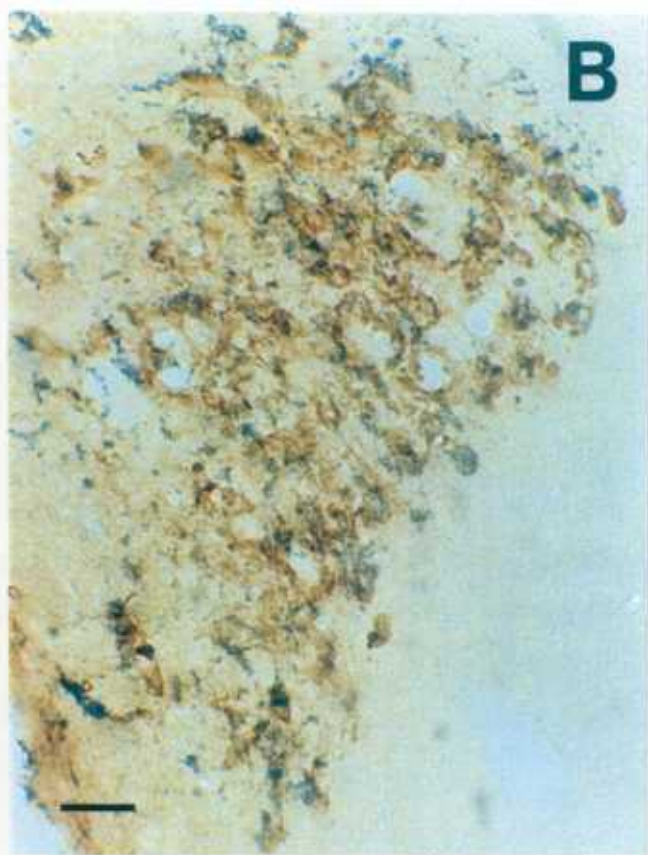
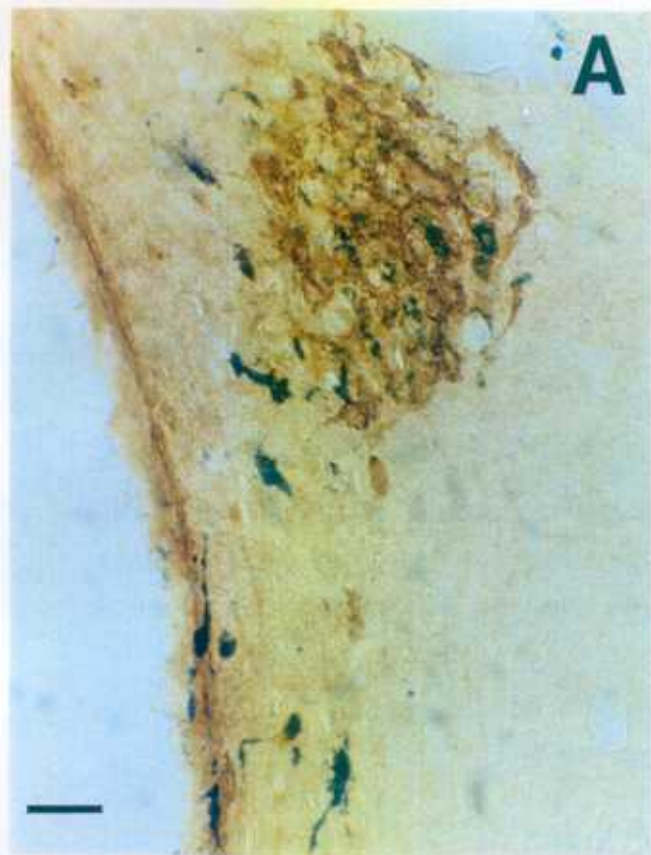


Fig. 11. Fotomicrografías obtenidas de cortes seriados coronales del núcleo periventricular hipotalámico de ratas tratadas con colchicina donde se verifica la colocalización de las inmunoreactividades para OT (A) e IGF-I (B) en las mismas neuronas (flechas). Abreviatura: 3V, tercer ventrículo. Las estrellas en A y B indican un mismo vaso sanguíneo. Barras de calibrado: 15 μ m.

A



3V



B



3V



Fig. 12. Microfotografías que muestran inmunoreactividad para IGF-I en la corteza cerebral de ratas tratadas con colchicina. (A-C) Células y fibras positivas para IGF-I en la corteza somatosensorial. (A) Neurona multipolar (flecha abierta) de la capa III inmunoteñida en su citoplasma y prolongaciones dendríticas. Algunas fibras positivas están señaladas por pequeñas flechas. Los núcleos teñidos de la sección histológica corresponden a una contrateñición con violeta de cresilo. (B) Neurona multipolar positiva de la capa IV, el tejido se halla contrateñido con violeta de cresilo. (C) Neurona, aparentemente horizontal, positiva para IGF-I en la capa II superficial. (D,E) Microfotografías electrónicas de neuronas positivas para IGF-I. Obsérvese como el precipitado de la inmunoreacción se localiza específicamente en el aparato de Golgi. (E) Mayor aumento de una cisterna del aparato de Golgi, donde se observa la positividad para IGF-I en la luz de dos cisternas. Barras de calibrado: A,B= 20 μ m; C= 10 μ m; D= 500 nm; E= 100 nm.

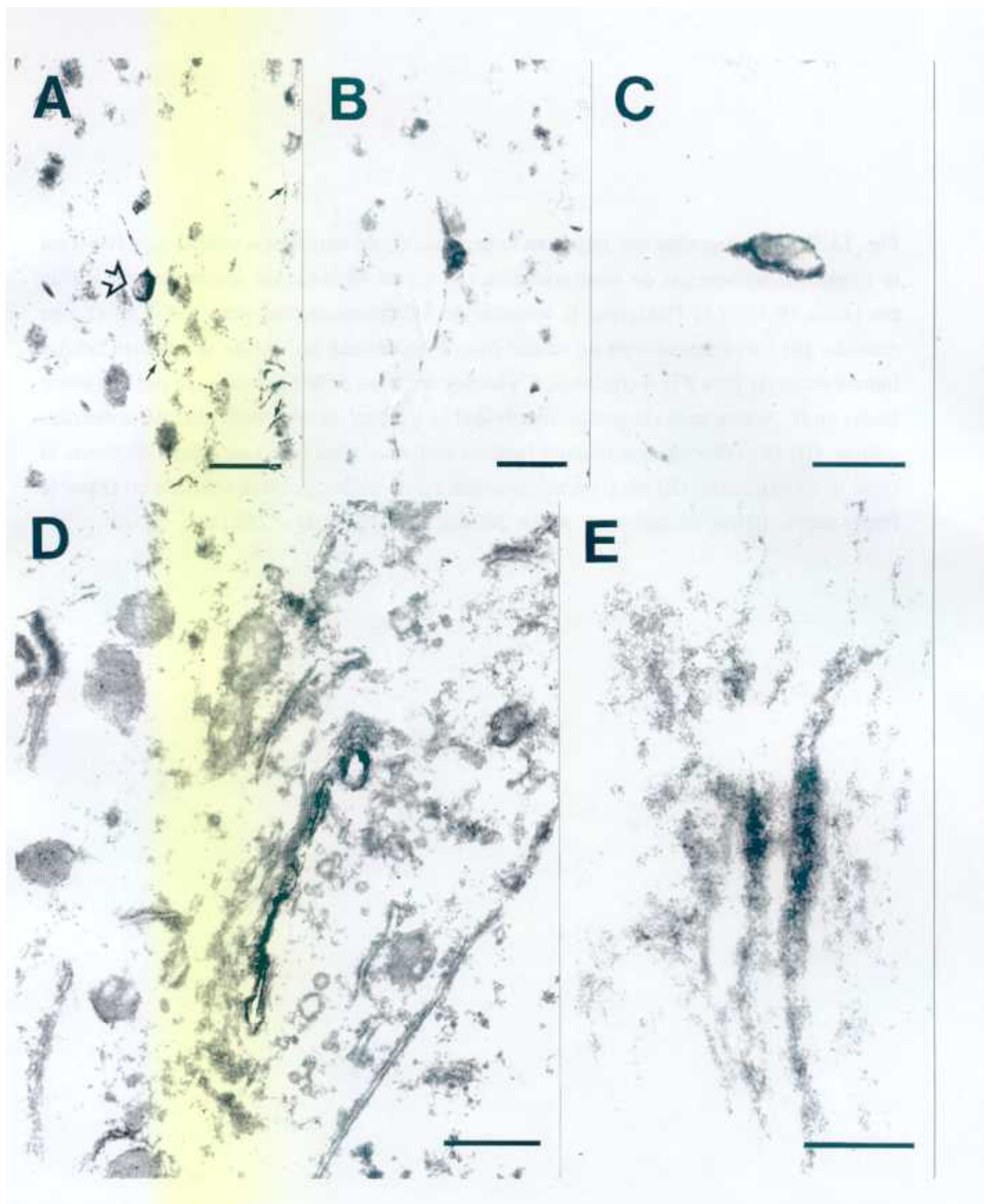


Fig. 13. Fotomicrografías que muestran la localización de inmunoreactividad para IGF-I en la formación hipocampal de ratas controles (A) y tras 48 horas de administración icv de colchicina (B-E). (A) Obsérvese la ausencia de inmunoreactividad para IGF-I en el giro dentado. (B) Giros dentados de un animal tratado con colchicina, donde se aprecian células inmunoreactivas para IGF-I (flechas). (C) Mayor aumento de la zona indicada por una doble flecha en B. Nótese como la inmunoreactividad se localiza en los citoplasmas de numerosas células. (D) Giro dentado que muestra inmunoreactividad para IGF-I en células dispersas lo largo de su extensión. (E) Magnificación de una célula inmunopositiva señalada en D por la flecha curva. Barras de calibrado: A,B= 500 μ m; C= 20 μ m; D= 250 μ m; E= 5 μ m.

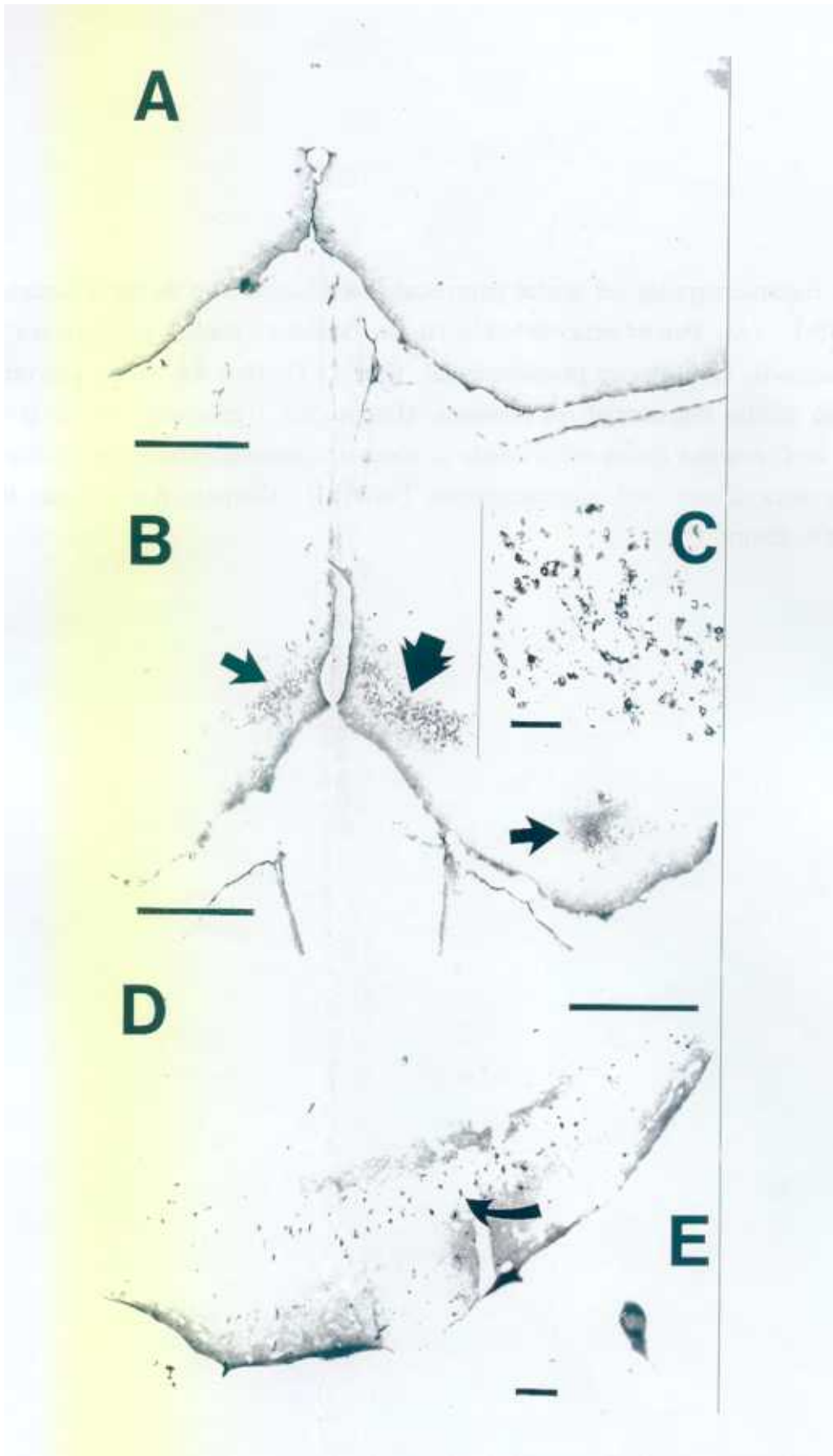


Fig. 14. Fotomicrografías del núcleo paraventricular hipotalámico de ratón inmunoteñidos para IGF-I. (A) Panorámica del hipotálamo anterior donde se aprecian células inmunomarcadas en el núcleo paraventricular. (B y C) Detalles del núcleo paraventricular mostrando células magnocelulares positivas. (D) Imagen a gran aumento de la neurona señalada en C con una flecha curva donde se observa la inmunoreacción en el citoplasma y prolongaciones de neuronas magnocelulares. Barras de calibrado: A= 200 μ m; B y C= 50 μ m; D= 20 μ m.

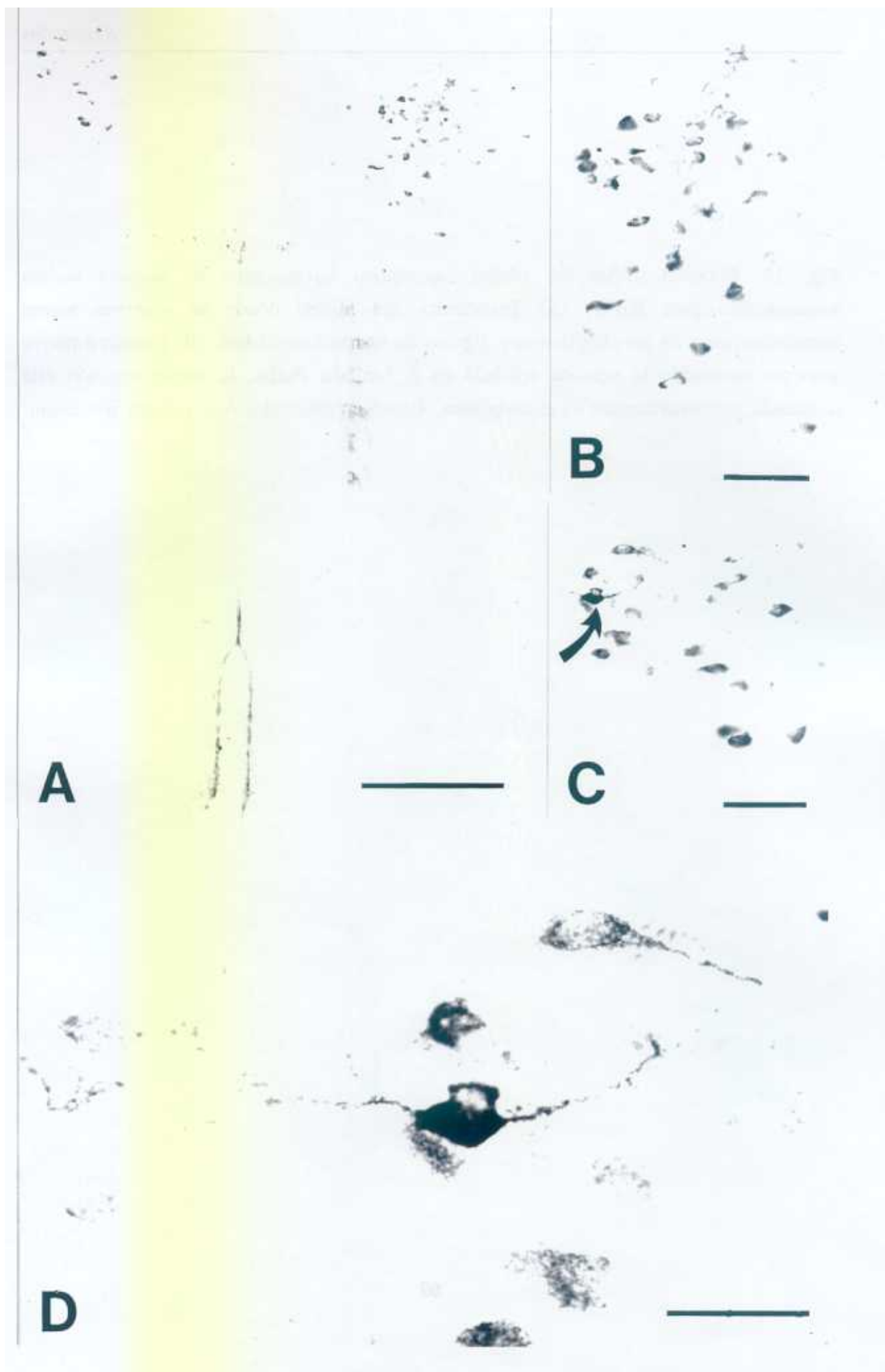


Fig. 15. Microfotografías del núcleo supraóptico hipotalámico de *Macaca mulata* inmunoteñido para IGF-I. (A) Panorámica del núcleo donde se observan somas inmunomarcadas en sus citoplasmas y algunas de sus prolongaciones. (B) Imagen a mayor aumento mostrando la neurona señalada en A con una flecha, la inmunoreacción esta localizada mayoritariamente en el citoplasma. Barras de calibrado: A= 100 μ m; B= 20 μ m.

A



B

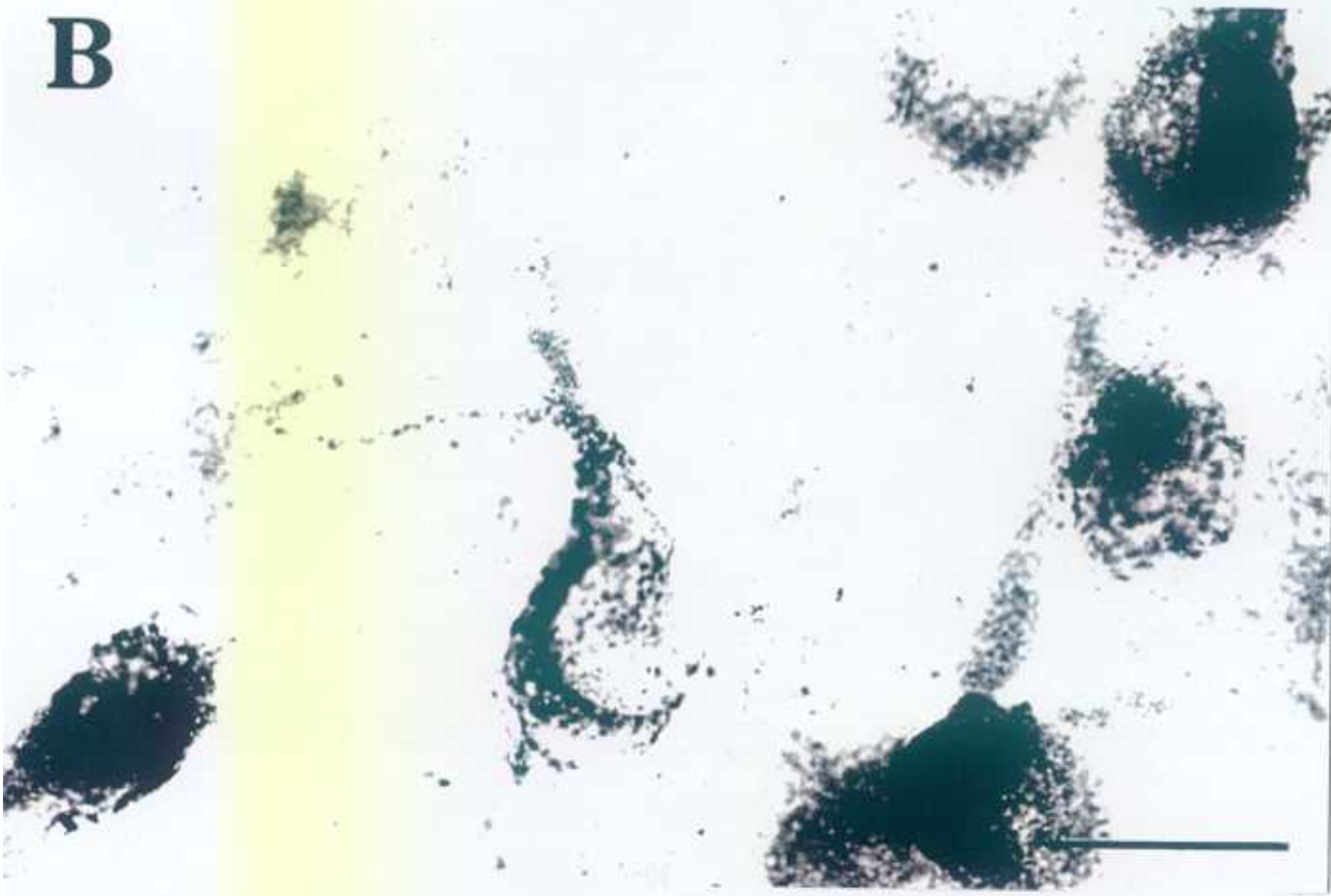


Fig. 16. Fotomicrografías de secciones histológicas de cerebelo humano que muestran la distribución de neuronas positivas para IGF-I. (A) Panorámica mostrando como la distribución de la inmunoreactividad para IGF-I se localiza en las neuronas de Purkinje. (B) Fotomicrografía a mayor aumento de las células de Purkinje inmunomarcadas. Nótese como la inmunoreactividad esta presente únicamente en las células de Purkinje. La flecha curva en B indica un balonamiento en un axón de una célula de Purkinje. (C,D) Detalles de las células de Purkinje inmunoreactivas para IGF-I. Un intenso marcaje es visualizado en los cuerpos celulares, dendritas en la capa molecular y axones a través de la granular. La flecha curvada en C señala un axón arciforme que presenta un torpedo axonal. Apreciase en D el extenso arbol dendrítico inmunopositivo en la capa molecular, el producto de la inmunoreacción ocupa dendritas proximales y distales, incluso espinas dendriticas. Barras de calibrado: A = 5mm; B = 200 μ m; C = 50 μ m; D = 25 μ m.

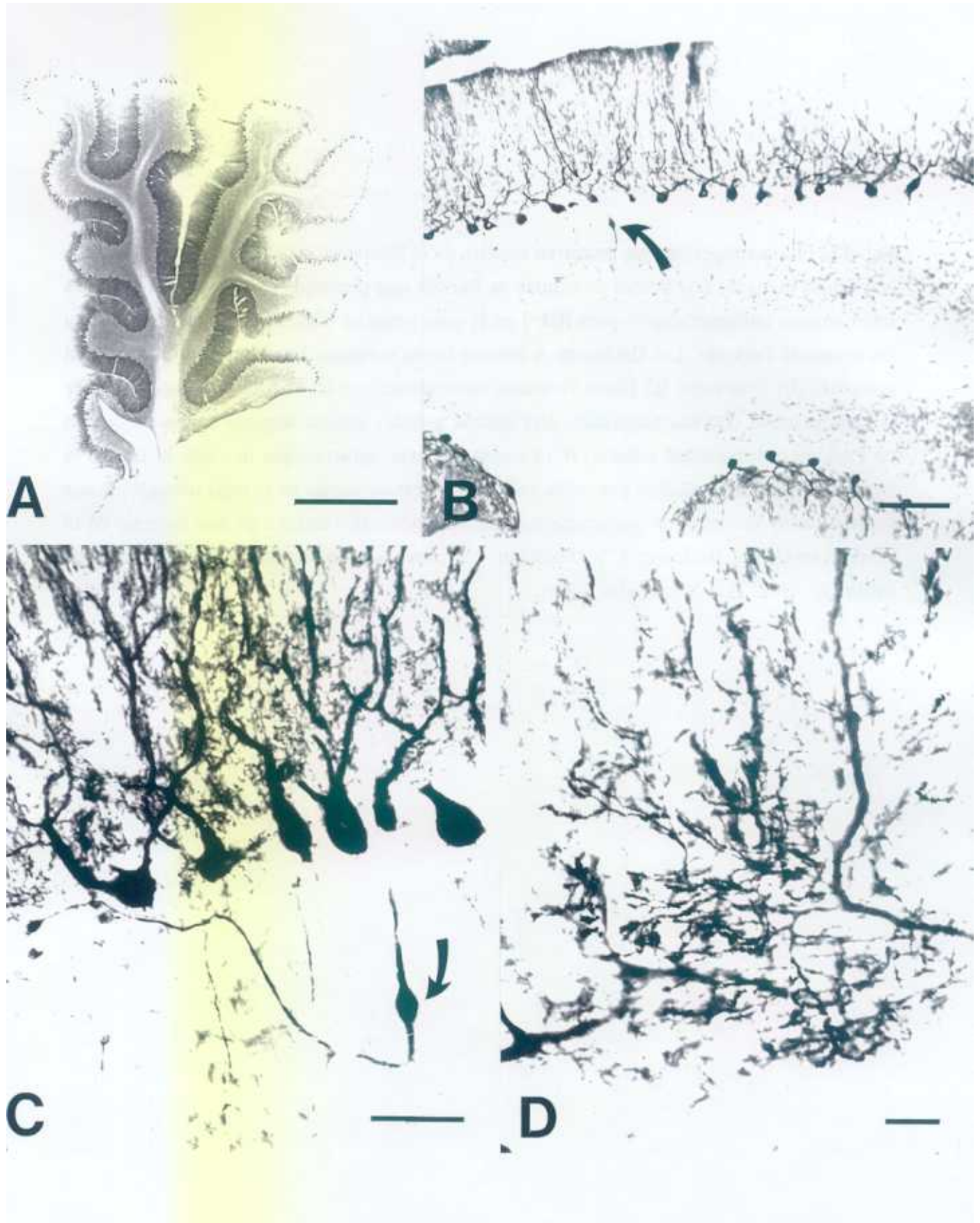


Fig. 17. Fotomicrografías que muestran detalles de la localización de IGF-I-IR en la corteza cerebelosa humana. (A) Somas de células de Purkinje que presentan balonamientos axonales intensamente inmunoreactivos para IGF-I en la capa granular (flechas curvadas) proximos a los somas de Purkinje. Las flechas en A indican fibras varicosas inmunoreactivas en la capa granular. (B) Obsérvese las fibras varicosas inmunoreactivas en la zona infraganglionar de la capa granular (flechas pequeñas). Las flechas grandes señalan algunos somas de células de Purkinje intensamente teñidos. (C) Imagen a mayor aumento que muestra en detalle la zona indicada por las flechas pequeñas en B. Las fibras varicosas en la zona infraganglionar forman cestos alrededor de estructuras no inmunoteñidas. (D) Imagen de otro ejemplo de lo descrito en C. Las flechas en C y D señalan procesos varicosos inmunoreactivos. Barras de calibrado: A,C,D= 20 μ m; B= 50 μ m.

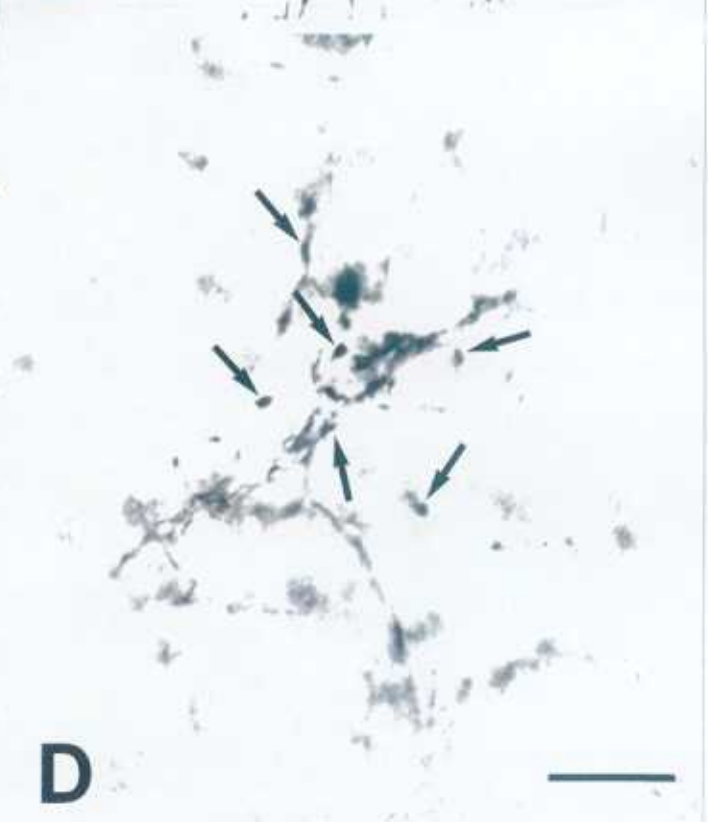
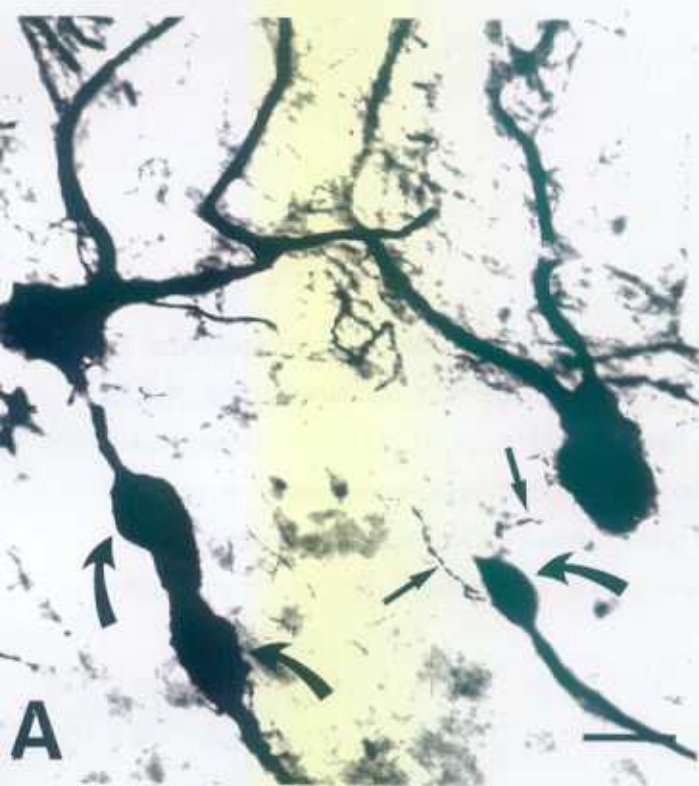


Fig. 18. Fotomicrografías del mismo campo (A y C; B y D) obtenidas de secciones de corteza cerebelosa humana procesadas para doble marcaje inmunofluorescente. (A,B) Inmunoreactividad para IGF-I visualizada con filtro de rodamina. (C,D) Inmunoreactividad para calbindina visualizada con filtro para fluoresceína. Obsérvese, comparando A con C y B con D, que la mayoría de células de Purkinje que expresan calbindina-IR también son IGF-I positivas, exceptuando algunos pocos casos (cabezas de flechas). Barras de calibrado: A,C = 200 μ m; B,D = 20 μ m.

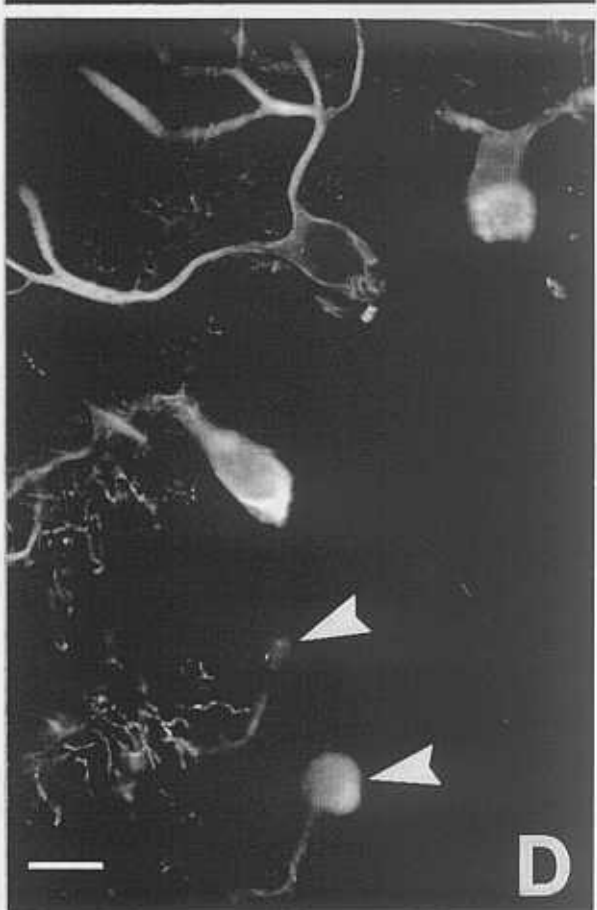
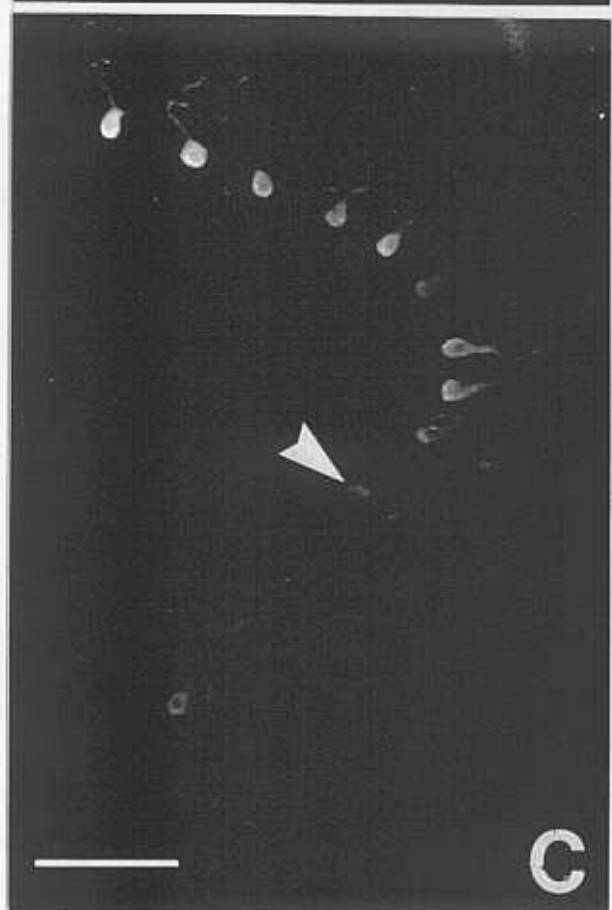
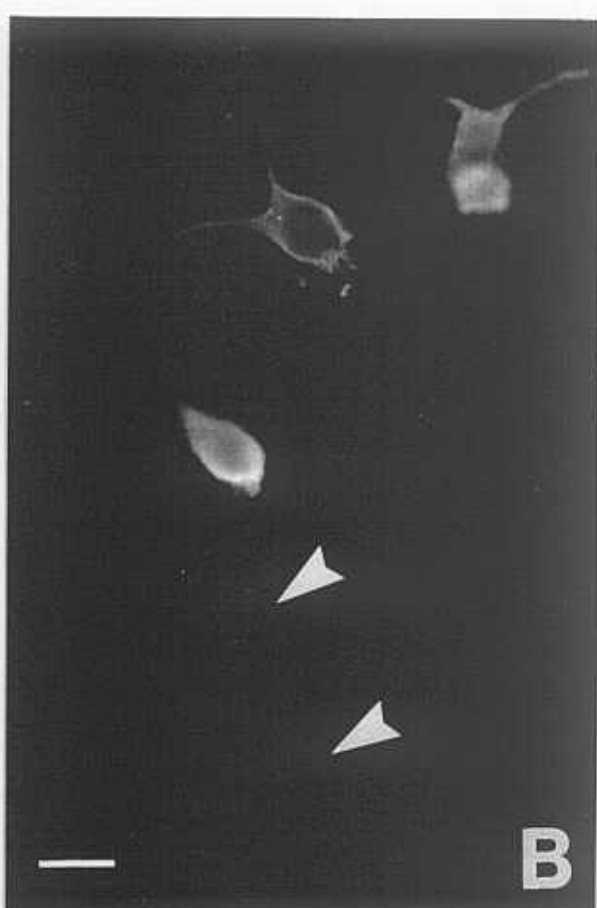
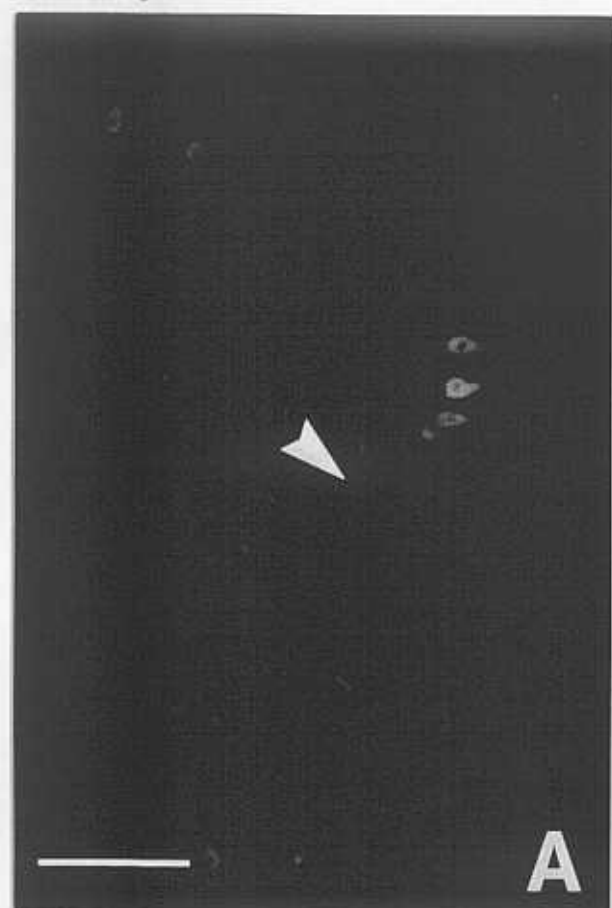


Fig 19. Fotomicrografías de secciones de corteza cerebelosa humana procesadas para dobles marcajes inmunocitoquímicos. (A,B) Obsérvese como la mayoría de células de Purkinje positivas para IGF-I (precipitado marrón difuso) también expresan calbindina-IR (precipitado azul granular). Las flechas abiertas en A y B señalan neuronas de Purkinje positivas para calbindina sin que muestren IGF-I-IR. (C-E) Ilustra como muchas células de Purkinje que contienen LNGFR-IR (precipitado marrón difuso) son también positivas para IGF-I (precipitado azul granular). La flecha abierta en D indica una neurona únicamente inmunotegida para IGF-I. La flecha en C y D señalan una misma célula de Purkinje doblemente inmunomarcada. En E se muestra una célula de Purkinje que contiene inmunoreactividades para LNGFR e IGF-I, las pequeñas flechas indican su axón. Barras de calibrado: A-C= 50 μ m; D= 20 μ m; E= 10 μ m.

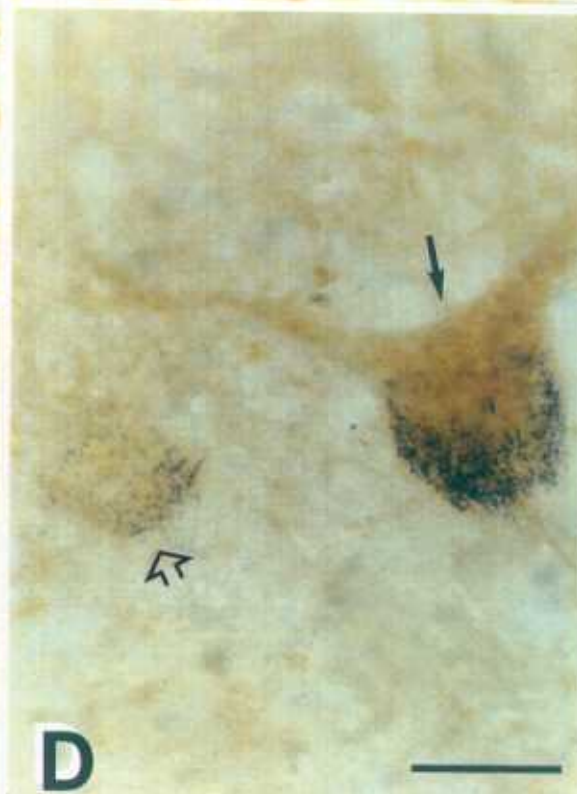
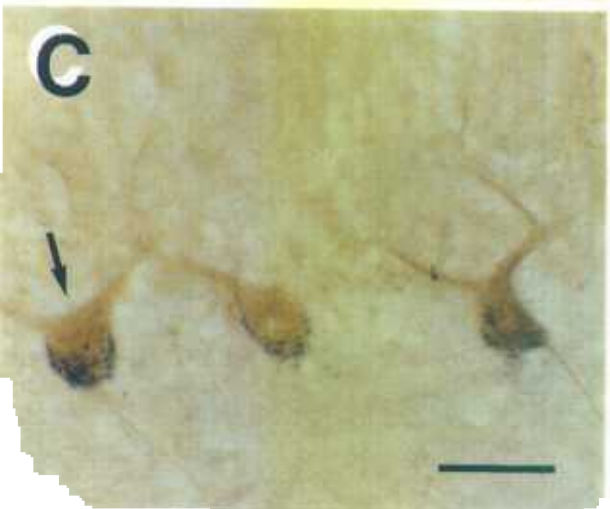
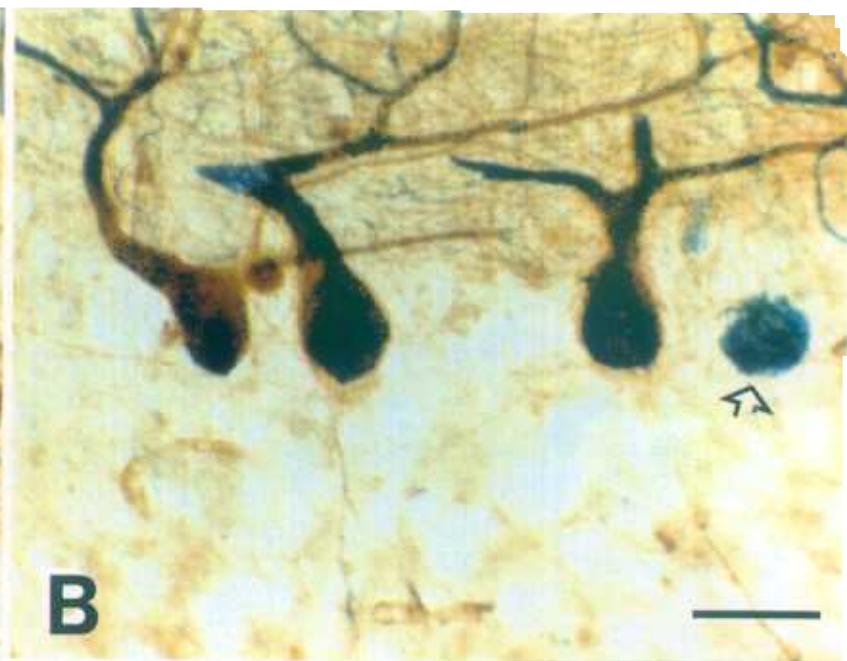
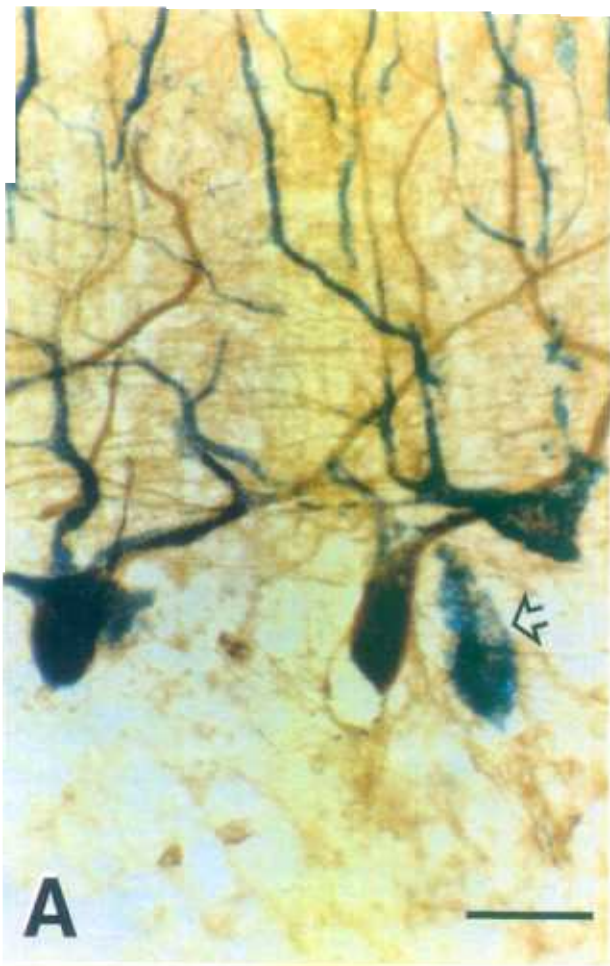


Fig. 20. Fotomicrografías de secciones histológicas de la corteza somatosensorial humana inmunoteñida para IGF-I. (A) Neurona positiva para IGF-I localizada en la zona superficial de la capa II. (B) Abundantes fibras nerviosas inmunoreactivas (flechas) distribuidas en capas superficiales de la corteza (II-III). (C,D) Fibras nerviosas de grueso calibre inmunoteñidas con α -IGF-I en la capa IV. Barras de calibrado: A = 10 μ m: B-C = 15 μ m.

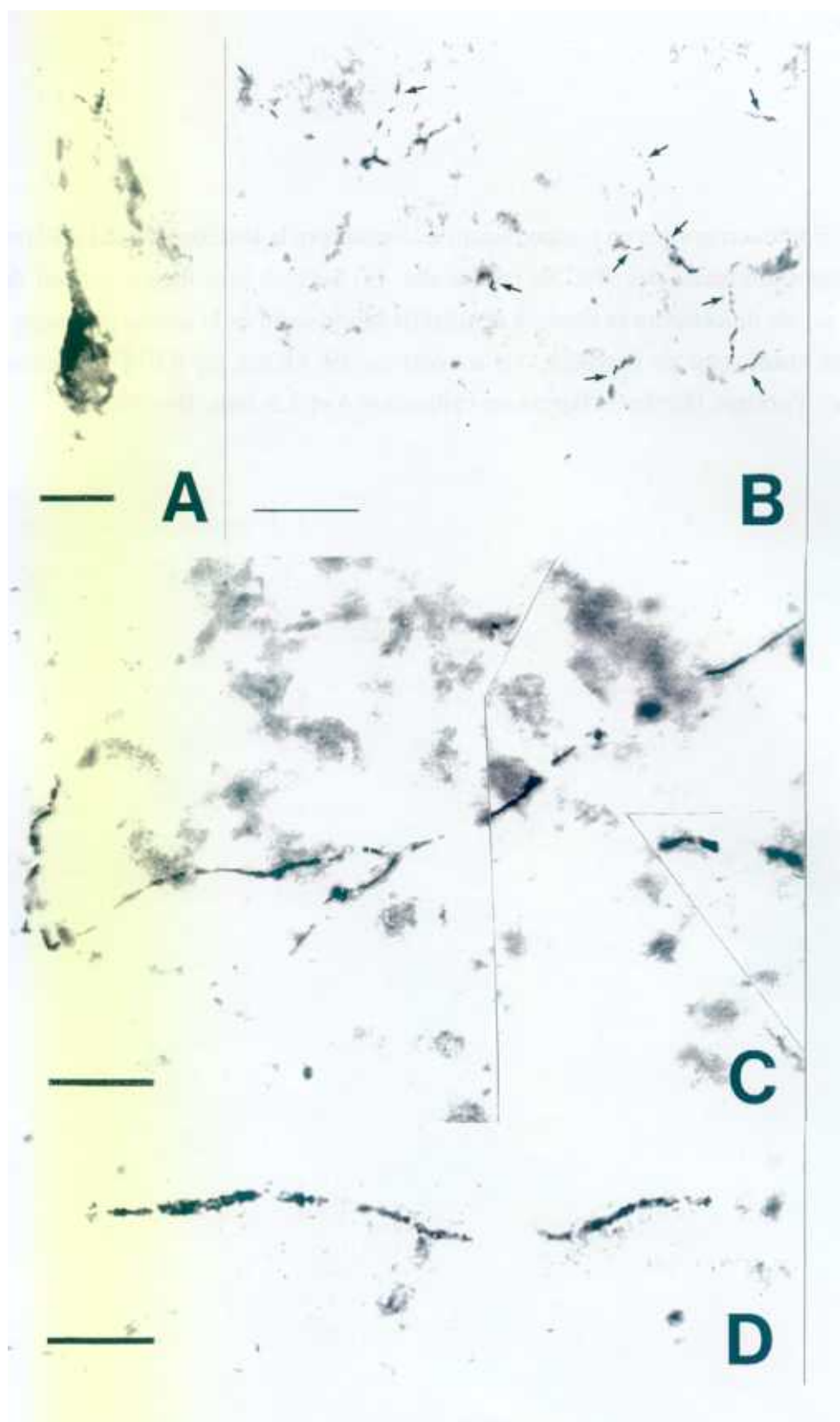


Fig. 21. Fotomicrografías en campo oscuro que muestran la localización del ARNm de IGF-I en secciones coronales del SNC de rata adulta. (a) Sección histológica al nivel del cerebro anterior donde únicamente se observa la señal de hibridación en la corteza piriforme (flechas). (b) Corte histológico de cerebelo, los transcritos del ARNm de IGF-I se localizan en las células de Purkinje (flechas). Barras de calibrado: A = 2.5 mm, B = 20 μ m.

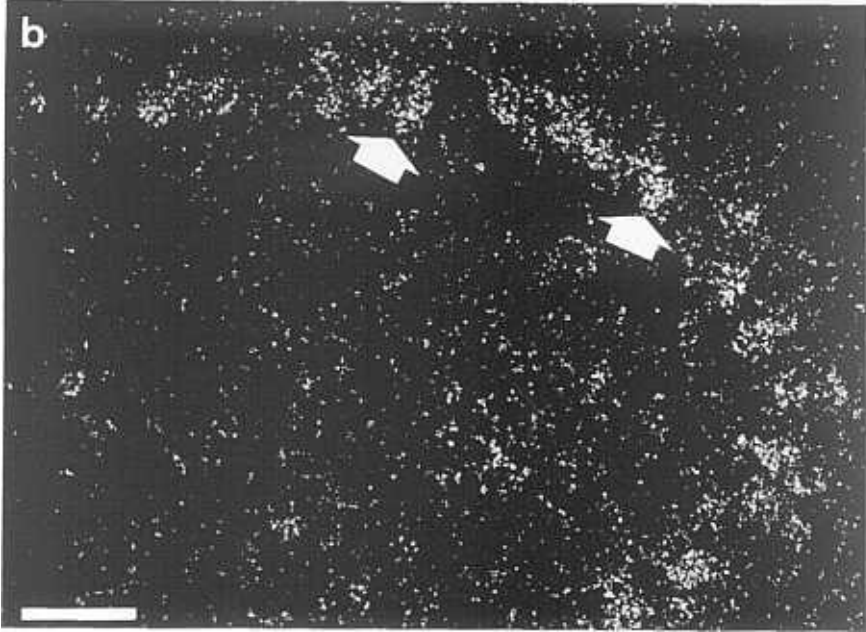
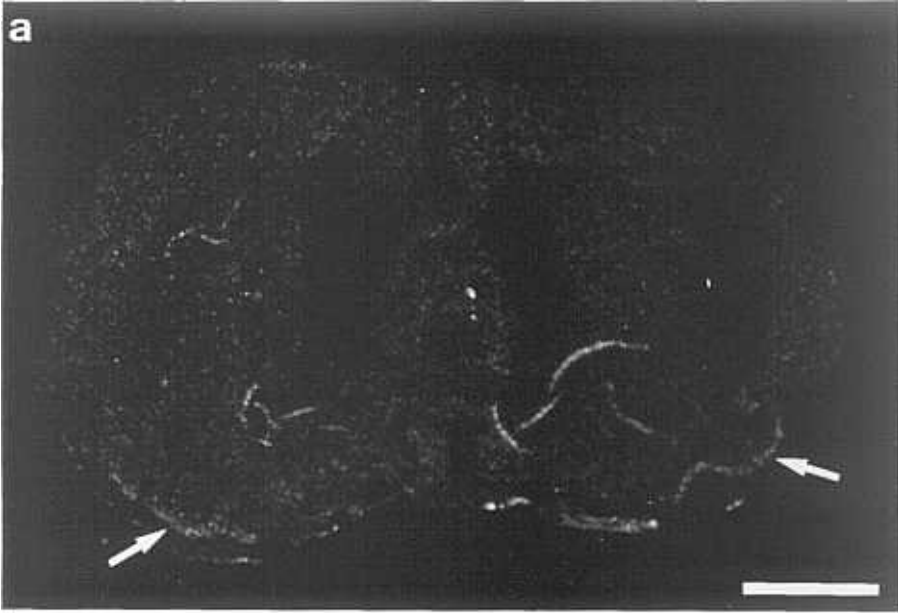


Fig. 22. Autorradiografías de secciones parasagitales de SNC de rata adulta. (A) Distribución del ARNm de R-IGF-I. (B) Sección contigua a A, tratada con RNasa A y procesada para hibridación del ARNm del R-IGF-I. Abreviaturas: II-III y VI capas de la corteza cerebral, A núcleo talámico anterior, AO núcleo olfativo anterior, CA3 campo del asta de Ammon, VL núcleo talámico ventrolateral. Barras de calibrado: 2.5 mm.

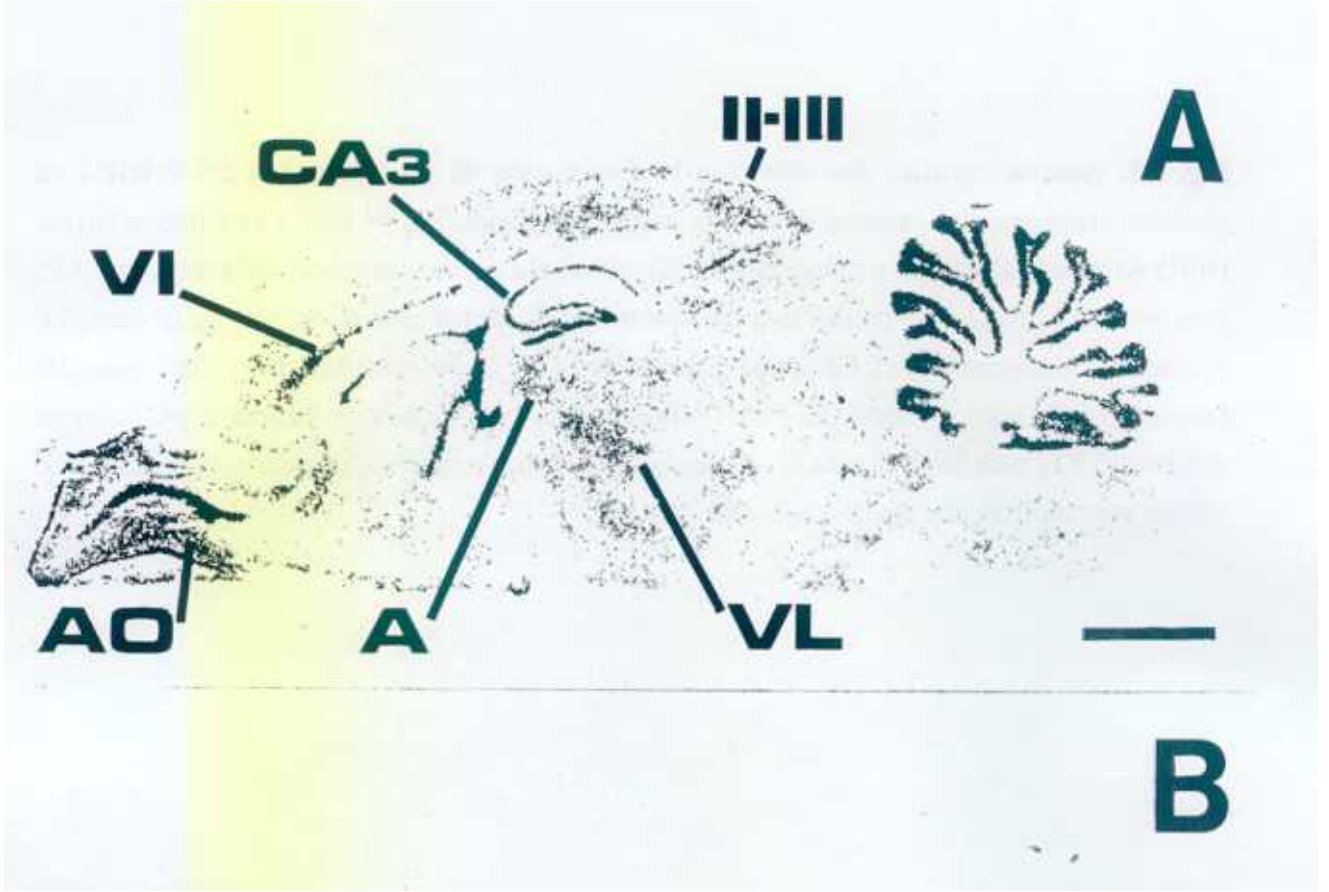


Fig. 23. Autorradiografías que muestran la distribución de los transcritos del R-IGF-I en secciones coronales del cerebro de la rata mediante hibridación *in situ*. (A) bulbo olfativo. (B,C) Areas telencefálicas y diencefálicas. (D) Cerebelo y tronco cerebral. Abreviaturas: AP, área postrema; CA2, campo del asta de Ammon; CP, plexos coroideos; DG, giro dentado; En, núcleo endopiriforme; Gl, capa glomerular; Grl, capa granular; IGr, capa granular interna; LOT, núcleo lateral del tarcto olfativo; Mi, capa de células Mitrals; PC, corteza piriforme; PT, pars tuberalis; Sch, núcleo supraquiasmático; SFO, órgano subfornical; SO, núcleo supraoptico. Barras de calibrado: 2.5 mm.

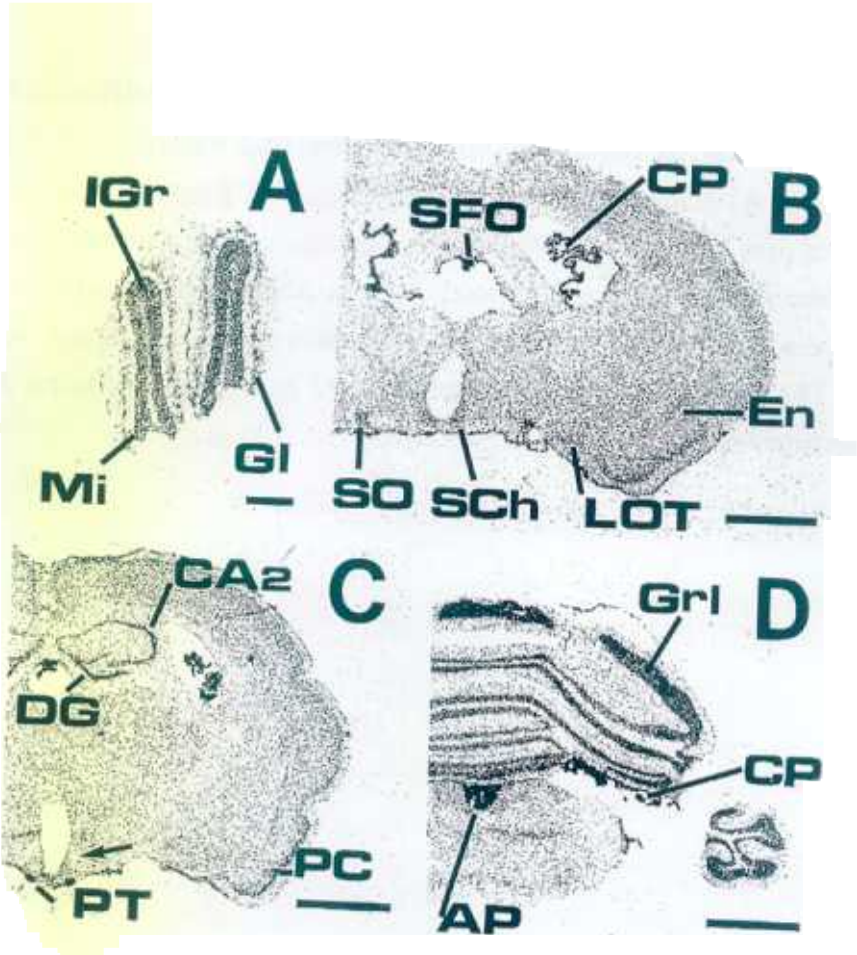


Fig. 24. Secciones coronales del SHN mostrando la distribución del ARNm del R-IGF-I. (A) Fotomicrografías tomadas en campo oscuro de la superficie ventrolateral del hipotálamo basal. (Recuadro en A) autoradiograma de la hipófisis. (B) Fotomicrografías tomadas en campo claro de la pars tuberalis. (C,D) Fotomicrografías tomadas en campo oscuro de los núcleos supraóptico y paraventricular, respectivamente. Abreviaturas: ezME zona externa de la eminencia media, izME zona interna de la eminencia media, 3V tercer ventrículo, ox quiasma óptico, PD pars distalis, PI pars intermedia, PT pars tuberalis. Barras de calibrado: A = 50 μ m, recuadro en A = 1mm; B = 20 μ m; C, D = 100 μ m.

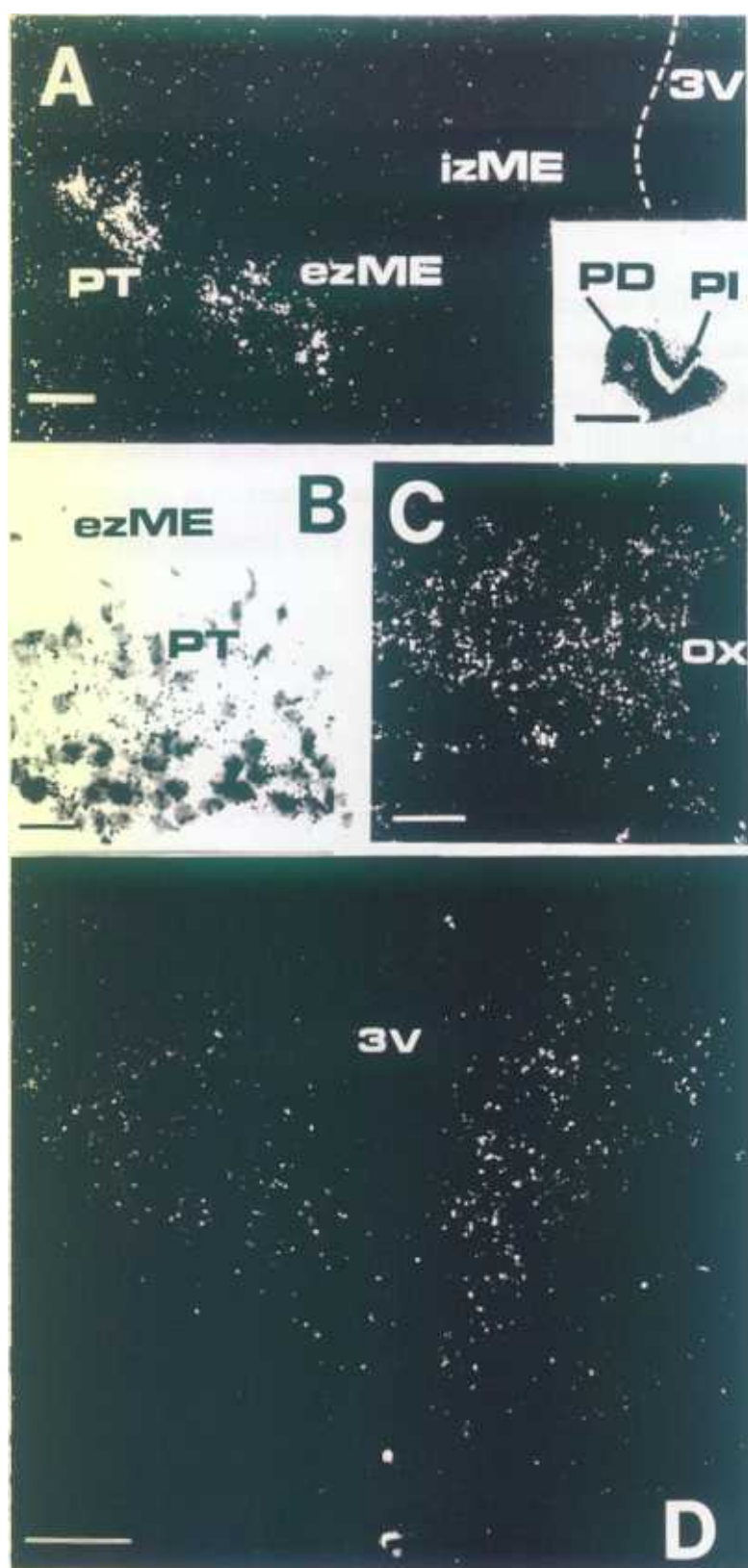


Fig. 25. Fotomicrografías tomadas en campo oscuro de las tres áreas del SNC de la rata con mayor intensidad de marcaje para el ARNm del R-IGF-I. (A) Bulbo olfativo, el marcaje se localiza en células Mitrales (flechas blancas), glomérulos (flechas negras) y en neuronas penachadas (flecha doble). (B) Cerebelo, las flechas blancas señalan la capa de células de Purkinje. (C) Hipocampo, la señal de hibridación es localizada en neuronas piramidales del cuerno de Ammon y en células granulares del giro dentado. Barras de calibrado: A-C 100 μ m.

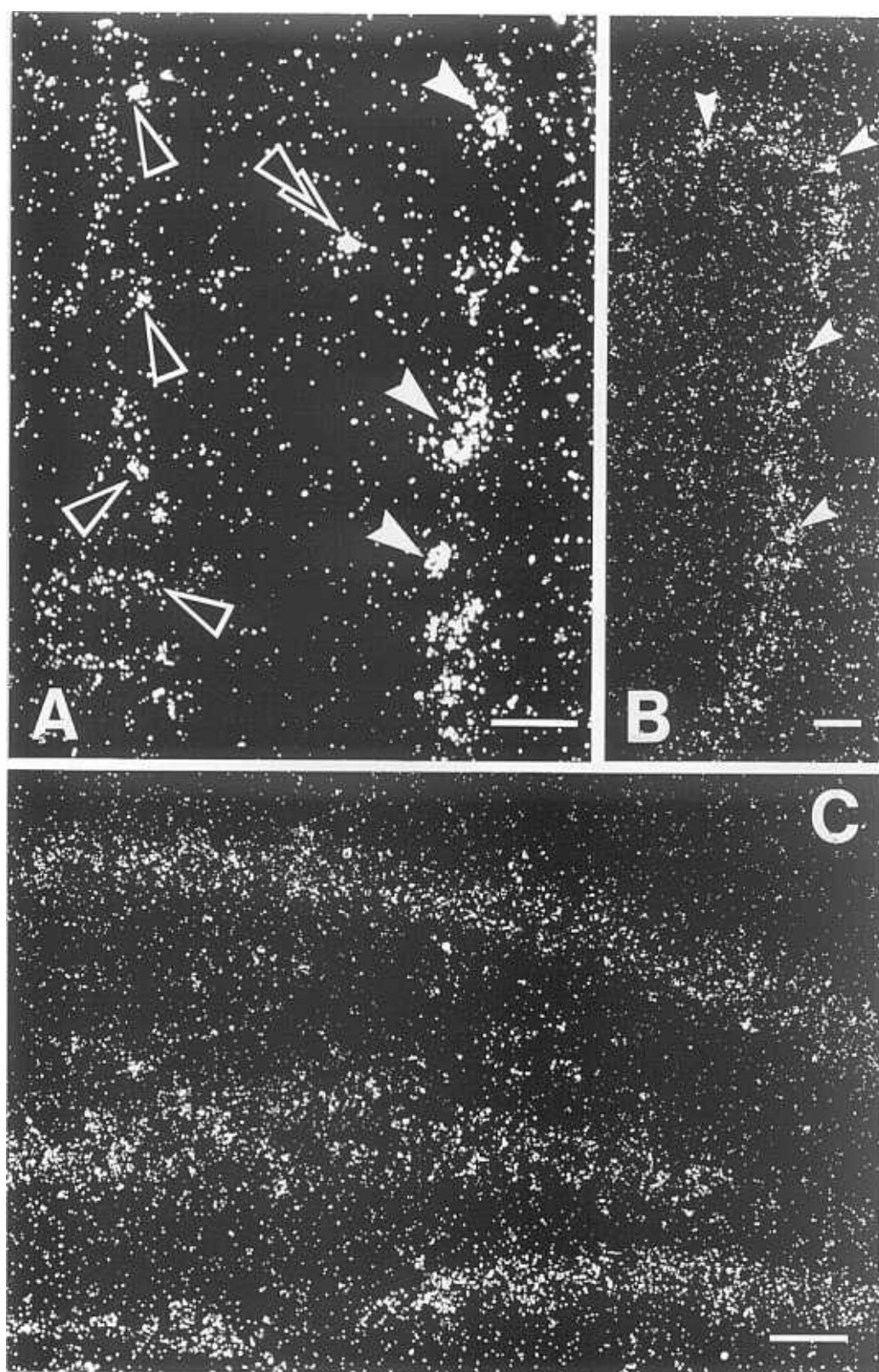


Fig. 26. Fotomicrografías tomadas en campo oscuro que muestran la presencia del ARNm del R-IGF-I en distintas áreas de la corteza cerebral de la rata. (A) Células positivas (puntas de flecha) en capas superficiales (II-III) de la corteza somatosensorial. (B) Neuronas que expresan el ARNm del R-IGF-I en la capa IV de la corteza somatosensorial. (C) Localización de los transcritos en la corteza piriforme. Barras de calibrado: A-C 100 μ m.

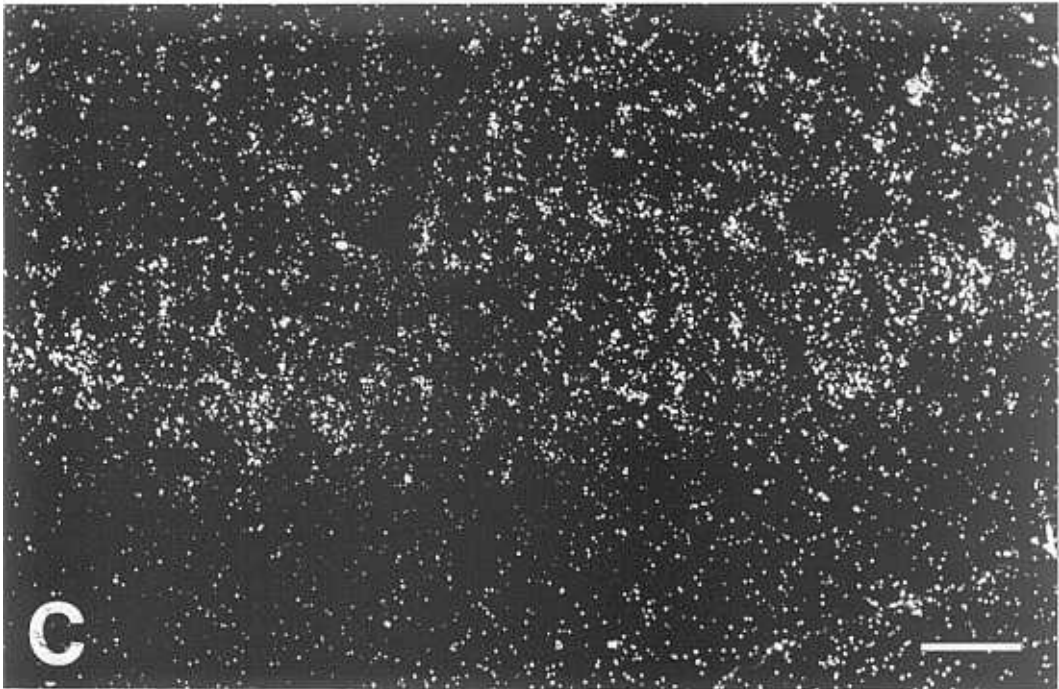
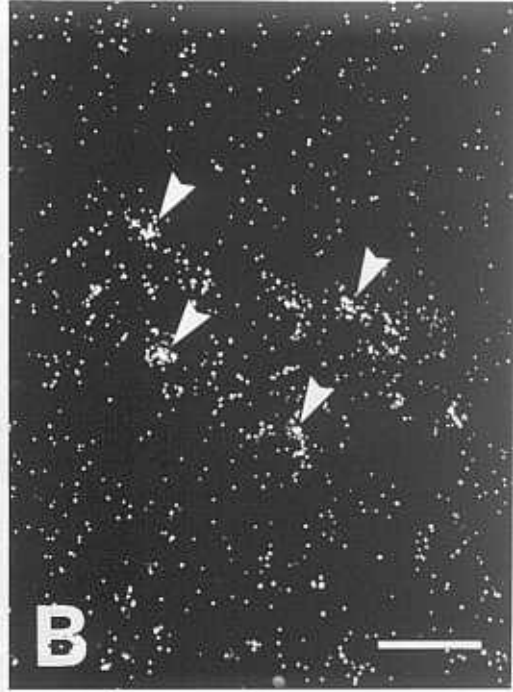


Fig. 27. Fotomicrografías que muestran las EM de ratas jóvenes (A,B) y envejecidas (C-H) inmunomarcadas para IGF-I. Panorámica (A) y gran aumento (B) de fibras débilmente teñidas para IGF-I en la capa fibrilar de la ziEM (flecha abierta). Panorámica (C,E,G) y gran aumento (D,F,G, respectivamente) de fibras intensamente marcadas para IGF-I que se hallan en la capa fibrilar, hipopendimal y ependimal de la EM. Nótese a mayor aumento que el intenso producto de reacción se encuentra en grandes dilataciones de axones que se extienden por capas subependimales, ependimocitos y, aparentemente, en el lumen del tercer ventrículo (flechas curvas). Las estrellas indican el tercer ventrículo. Barras de calibrado: A,C,E,G= 10 μ m, B,D,F,H= 30 μ m.



Fig. 28. Fotmicrografías que muestran la distribución de SOM-IR en secciones coronales del hipotálamo de ratas controles (A) y diabéticas (B). Las flechas grandes indican somas neuronales-IR mientras que las pequeñas fibras nerviosas inmunoreactivas en el núcleo periventricular. Abreviatura: 3V, tercer ventrículo. Barras de calibrado = 50 μm .

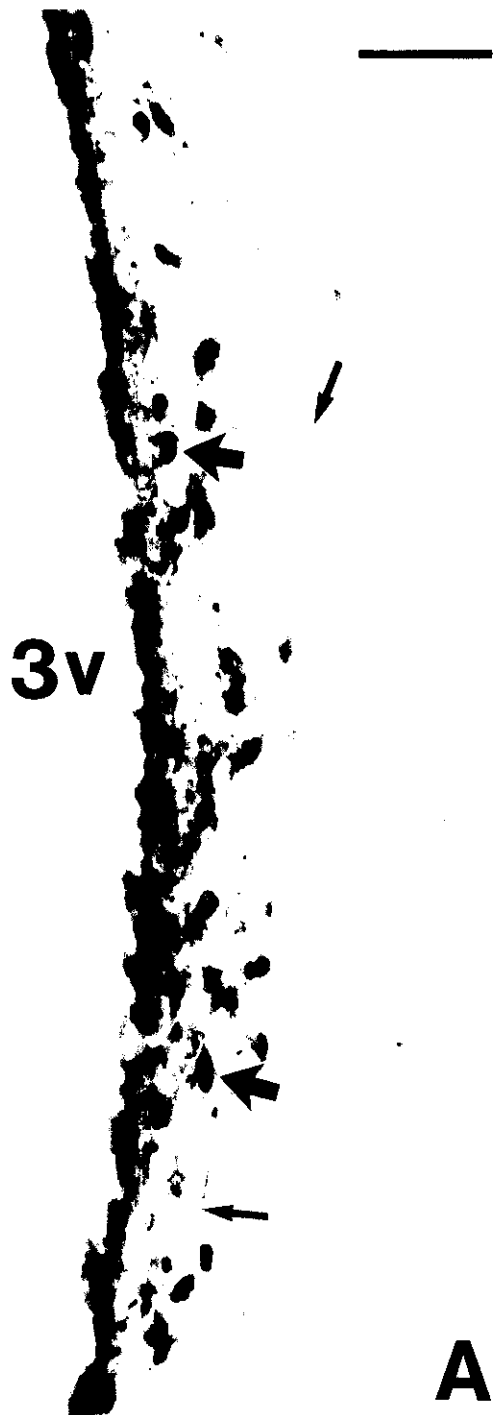


Fig. 29. Fotmicrografías que muestran la distribución de SOM-IR en secciones coronales de EM de ratas controles (A) y diabéticas (B). Las fibras nerviosas varicosas inmunoreactivas cursan principalmente por la zeEM (cabezas de flecha). Note la ausencia de alteraciones en el patrón de inmunotinción entre animales controles y diabéticos. Abreviatura: 3V, tercer ventrículo. Barras de calibrado = 50 μ m.

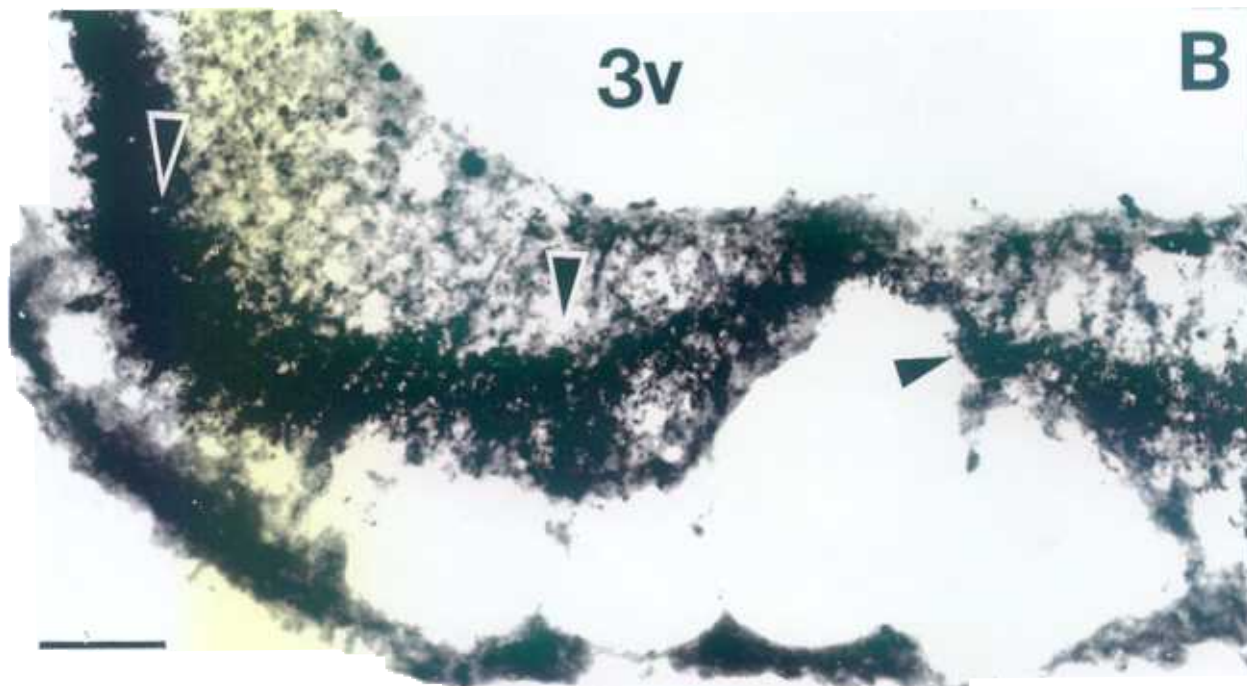
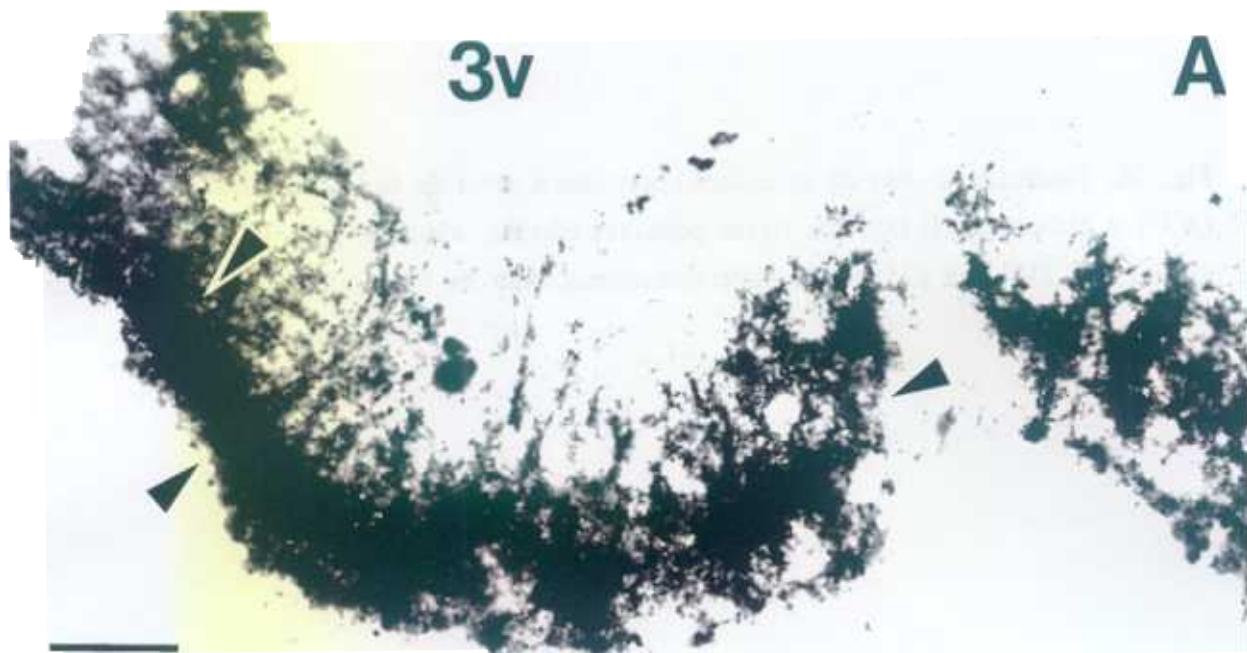


Fig. 30. Fotomicrografías de secciones coronales a nivel de la EM de animales controles (A,C) y diabéticos (B,D). Las fibras positivas (flechas abiertas) para GRF (A,B) y para galanina (C,D) en la EM no muestran diferencias entre las ratas controles y las diabéticas. Escala: 50 μ m.

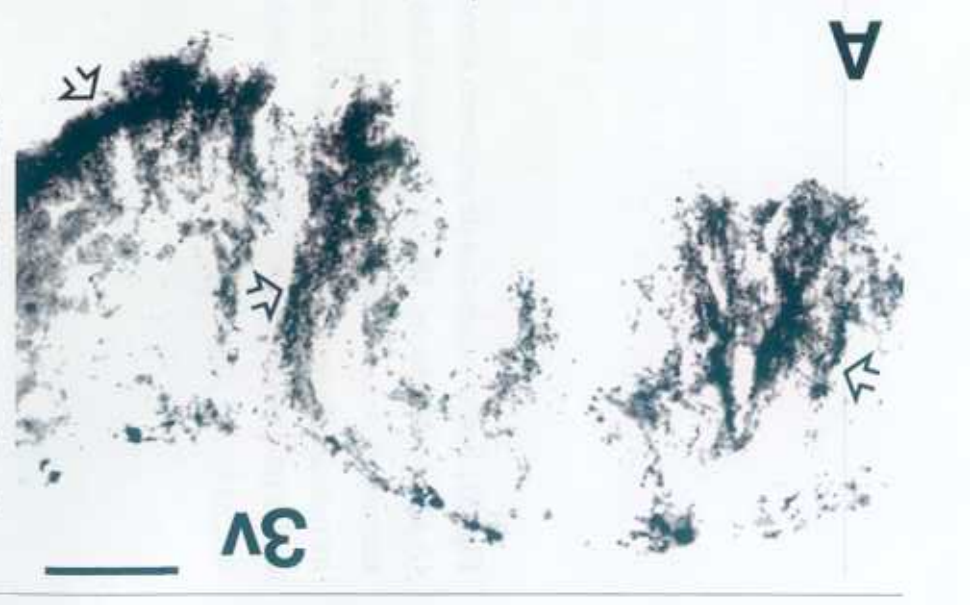
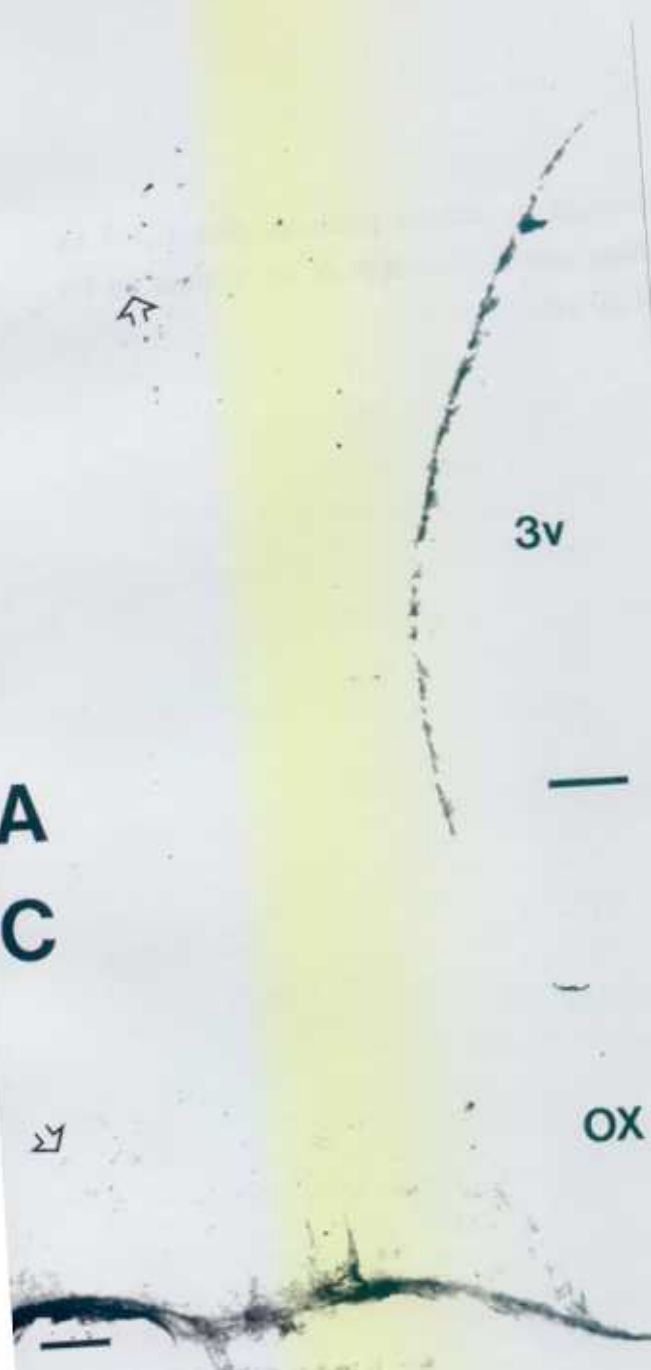


Fig. 31. Fotomicrografías de secciones coronales del hipotálamo anterior de ratas controles (A,C) y diabéticas (B,D) inmunoteñidas para IGF-I. Las flechas señalan neuronas magnocelulares en los núcleos paraventricular (A,B) y supraoptico (C,D). Obsérvese el incremento de neuronas magnocelulares positivas en los núcleos paraventricular y supraoptico de las ratas diabéticas respecto a las controles. Abreviaturas: ox, quiasma optico. Barras de calibrado: 50 μ m.

A
C



B
D

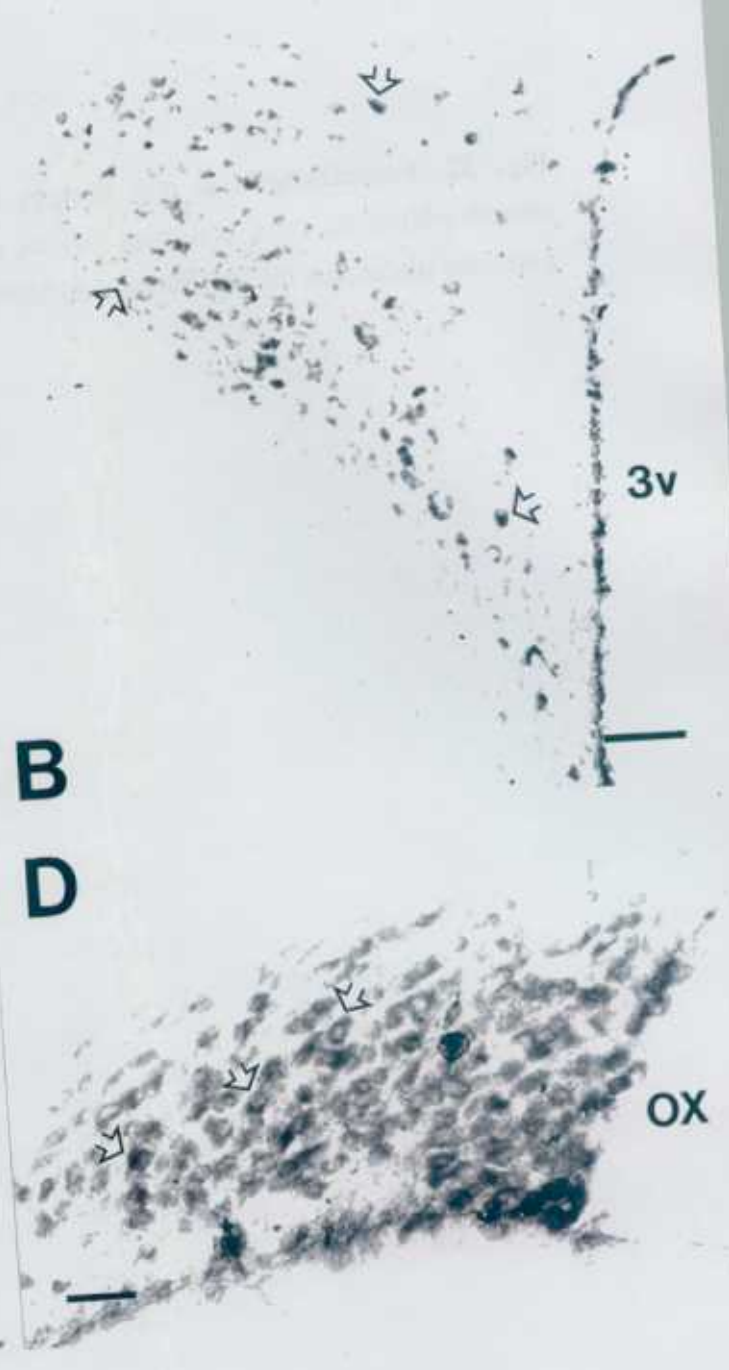


Fig. 32. Fotomicrografías que ilustran la ausencia de células positivas para IGF-I en adenohipófisis de ratas controles (A) en contraste con la presencia de las mismas en los animales diabéticos (B,C). Barras de calibrado: 20 μ m.

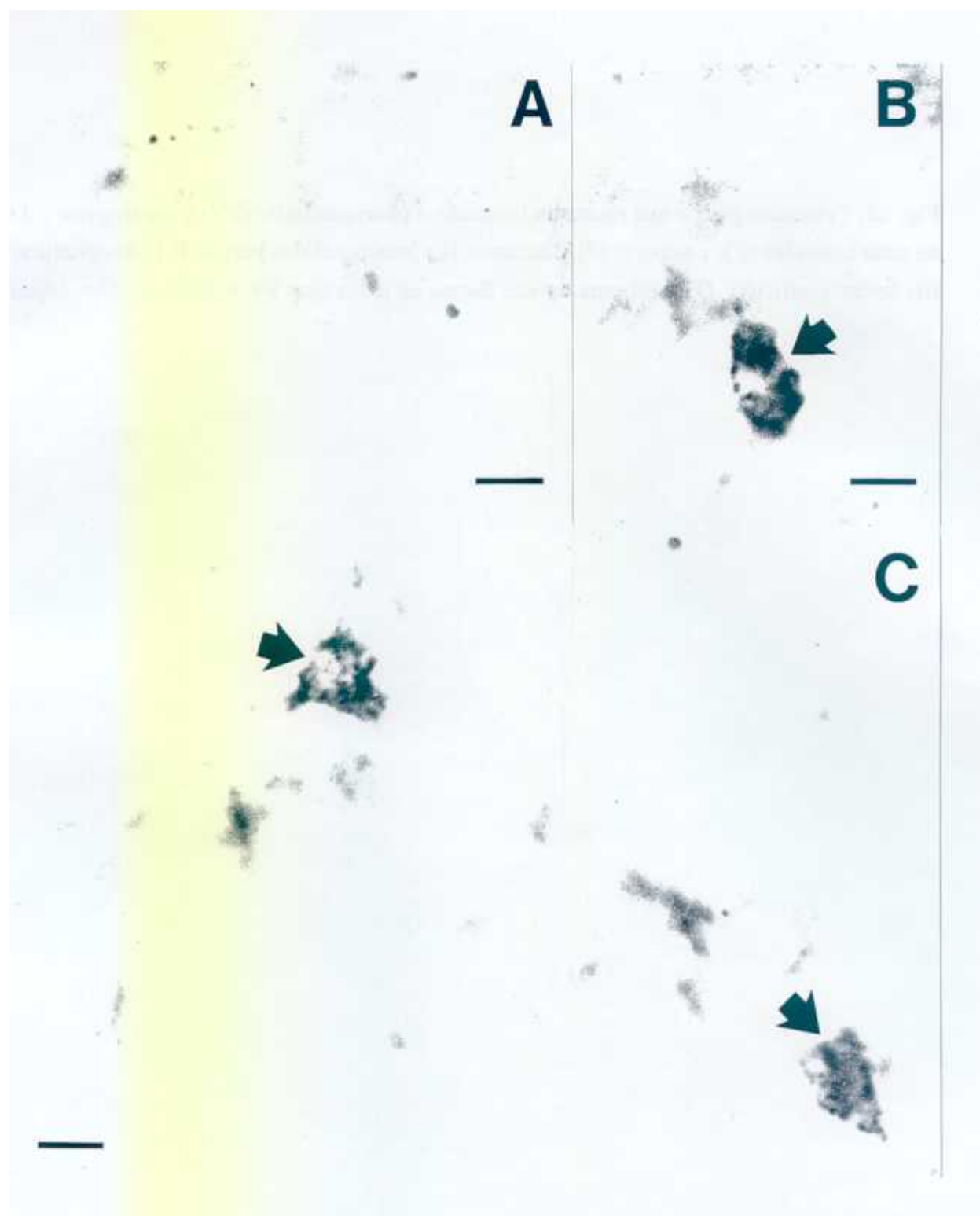


Fig. 33. Fotomicrografías que muestran los núcleos paraventricular (PV) y supraóptico (SO) de ratas controles (C), postparto (P) y lactantes (L) inmunotñidos para IGF-I. Abreviaturas: III, tercer ventrículo; OX, quiasma óptico. Barras de calibrado: PV = 100 μ m, SO = 50 μ m.

C

III

OX

P

III

OX

L

III

OX

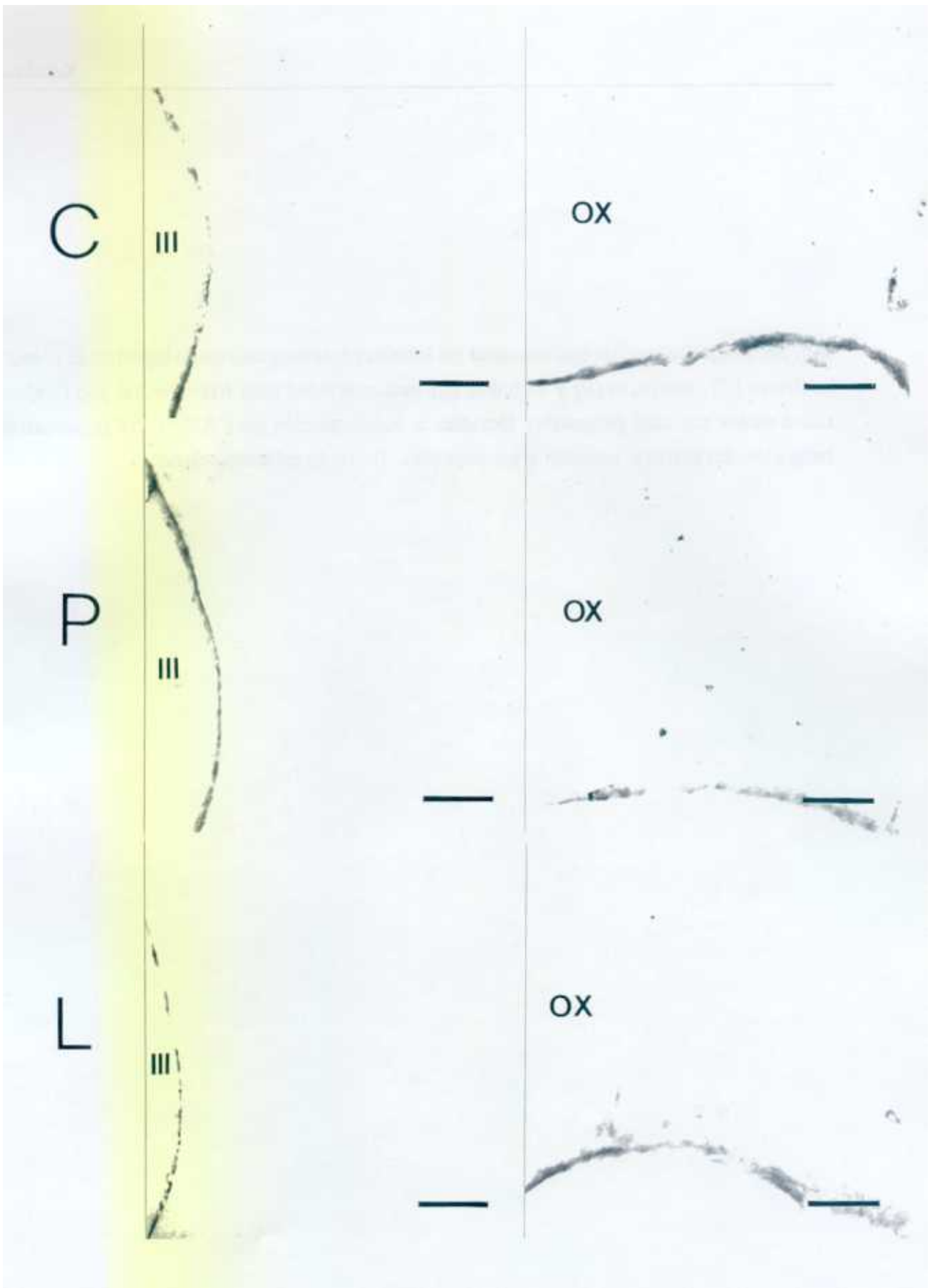


Fig. 34. Fotomicrografías que muestran los lobulos neurointermedios de hipófisis de animales controles (C), postparto (P) y lactantes (L) inmunoteñidos para IGF-I, AVP y OT. Nótese como en los animales postparto y lactantes la inmunotinción para AVP y OT presentan una reducción del marcaje respecto a los controles. Barra de calibrado: 1mm.

OT

AVP

IGF-I

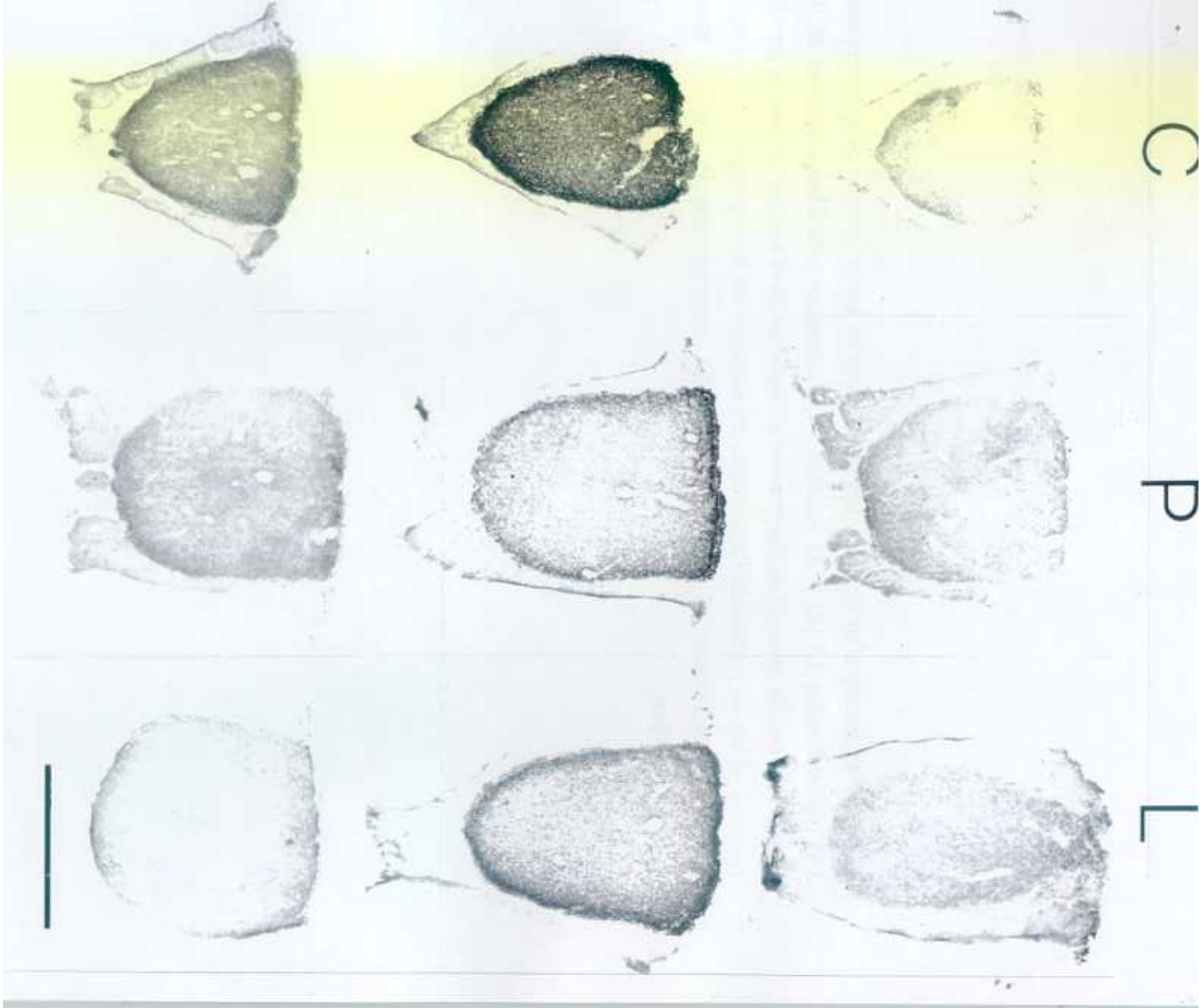


Fig 35. Fotomicrografías de secciones histológicas de adenohipofisis de animales controles (A), inmovilizados 15 (B) y 45 minutos (C) procesadas para inmunomarcaje de ACTH. Obsérvese como la inmovilización provocó un aumento en el número de células positivas así como en el de su intensidad de marcaje. El aumento de inmunoreactividad es mayor en animales inmovilizados 15 minutos (B) que los inmovilizados 45 minutos. Barras de calibrado: 200 μ m.

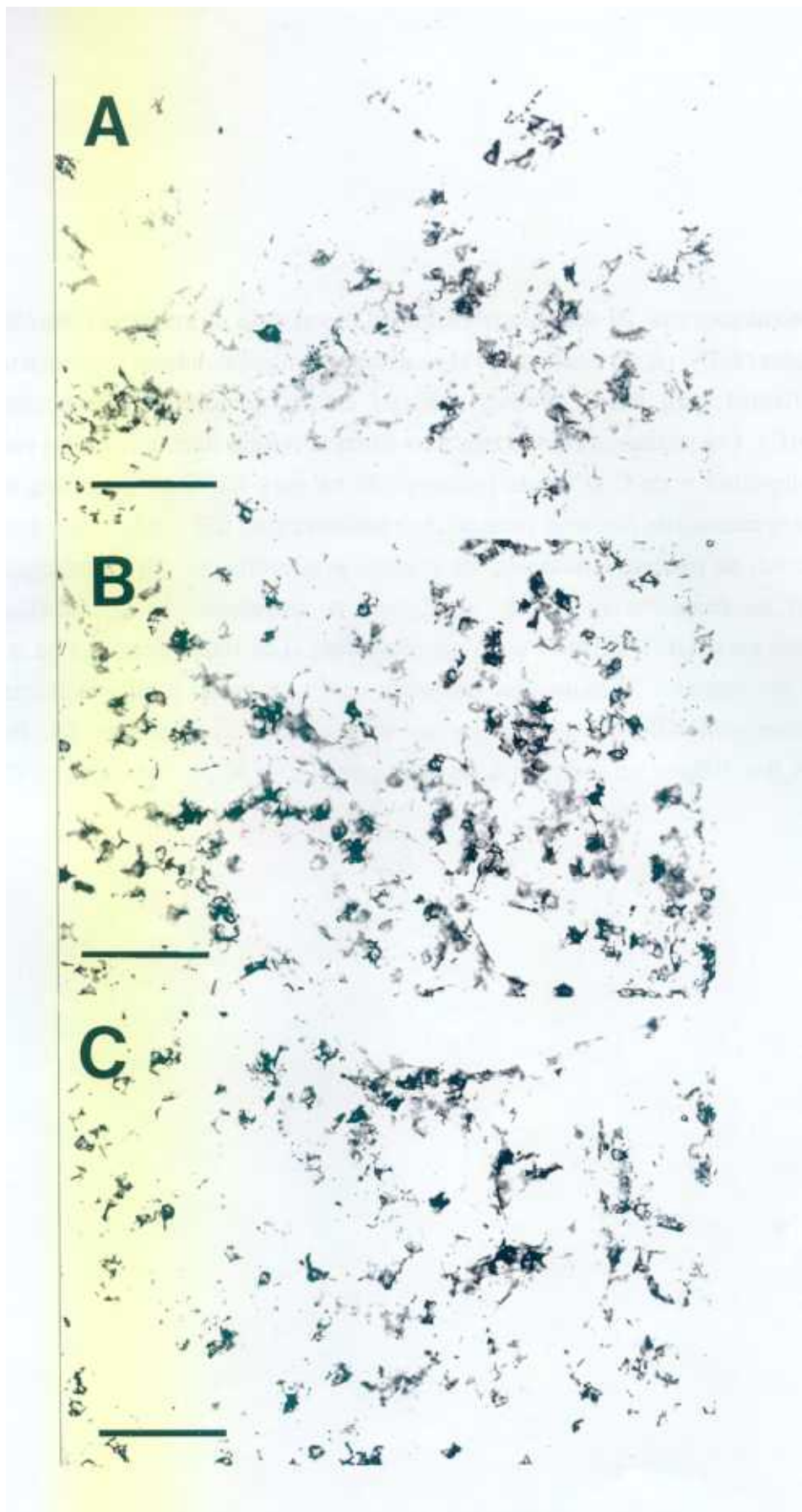


Fig. 36. Fotomicrografías de secciones frontales del hipotálamo de animales controles (A,C) y deshidratados (B,D). (A,C) Únicamente algunas células magnocelulares contienen una débil inmunoreactividad para IGF-I (flechas abiertas) en los núcleos paraventricular (A) y supraóptico (C). Los recuadros en A,B muestran fibras nerviosas inmunoreactivas para IGF-I en la neurohipófisis y en C,D somas inmunopositivos para IGF-I en la corteza cerebral. (B,D) Un gran número de neuronas intensamente positivas para IGF-I (algunas indicadas por flechas abiertas) se pueden apreciar en los núcleos paraventricular (B) y supraóptico (D). Comparando los recuadros en A y B, se observa un incremento en la intensidad de la inmunotinción para IGF-I en fibras de la neurohipófisis. Los somas celulares de la corteza cerebral de los animales deshidratados (recuadro en C) muestran la misma intensidad de inmunomarcaje para IGF-I en que en los animales control (recuadro en D). Barras de calibrado: A,B= 100 μ m; recuadro en A,B= 300 μ m; C,D= 50 μ m; recuadro en C,D= 10 μ m

A**3V****B****3V****C****OX****D****OX**

Fig. 37. (A) Autorradiograma del ensayo de protección de ribonucleasas para la detección y cuantificación del ARNm de IGF-I de hipotálamos de ratas controles y deshidratadas. (1) Ribosonda de IGF-I marcada con ^{32}P sin tratar con ARNasas. (2) Ribosonda de IGF-I marcada con ^{32}P tratada con ARNasas. (3) Ribosonda nativa de IGF-I marcada con ^{32}P sin ningún tratamiento. (4) 33 μg de ARN hipotalámico de ratas controles procesados para el ensayo de protección de ribonucleasas de IGF-I. (5) 33 μg de ARN hipotalámico de ratas deshidratadas procesados para el ensayo de protección de ribonucleasas de IGF-I. (6) ARNt de levadura procesados para el ensayo de protección de ribonucleasas de IGF-I. (7) pBR 322 marcado con ^{32}P y digerido con Msp I (marcador de peso molecular). (B) Densitometría de las bandas hibridadas con la ribosonda de IGF-I de hipotálamos controles y deshidratados. Obsérvese como en los hipotálamos de animales deshidratados hay una mayor expresión del ARNm de IGF-I.

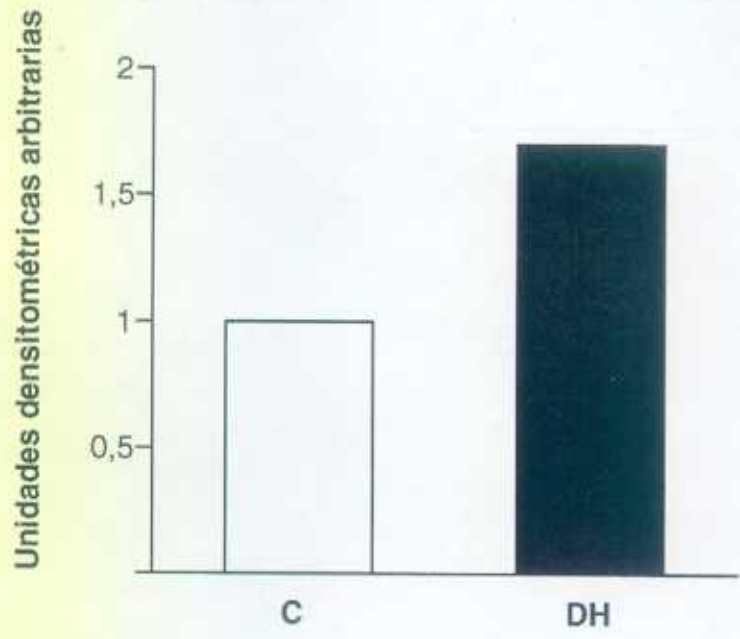
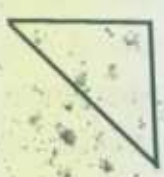


Fig. 38. Fotomicrografías realizadas en campo claro (A,C) y campo oscuro (B,D) mostrando la hibridación *in situ* para el ARNm de R-IGF-I combinada con inmunocitoquímica para la proteína c-Fos en el núcleo supraóptico de secciones coronales procedentes de ratas control (A,B) y ratas deshidratadas intermitentemente durante seis días (C,D). Notesé en las figuras de campo oscuro (B,D) el incremento en el número de granos de plata en los animales deshidratados. Los recuadros en las figuras B y D son ampliaciones de las áreas delimitadas en A y C (triángulos) para observar como la señal de hibridación se localiza sobre neuronas magnocelulares activadas osmoticamente e inmunoteñidas para c-Fos en animales control (A) y deshidratados (C). Barras de calibrado: A-D 50 μm , insets 20 μm .

A

OX



C

OX



B

OX



D

OX

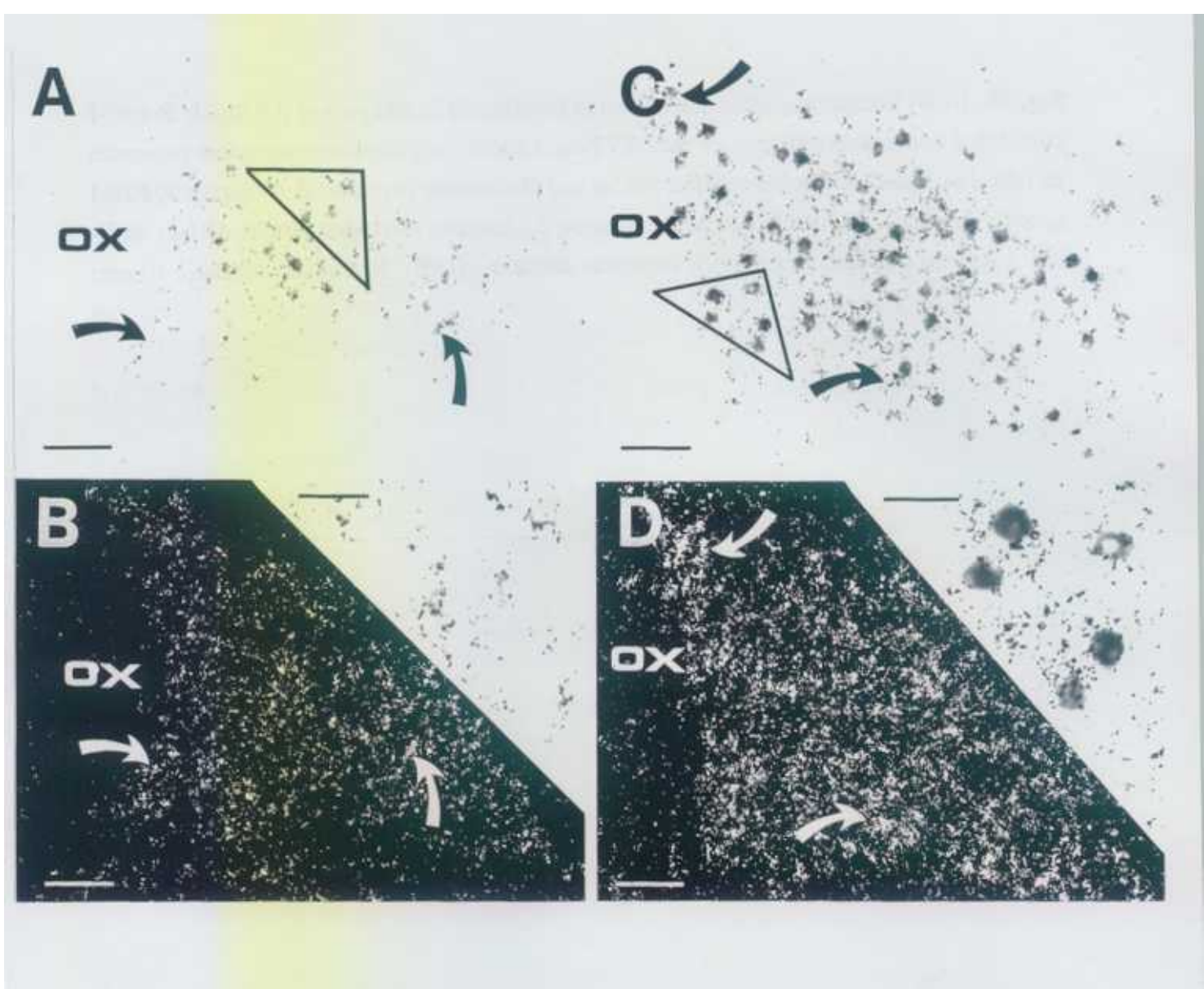
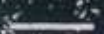


Fig. 39. (A,B) Fotomicrografías que muestran hibridación *in situ* para el ARNm de R-IGF-I combinada con inmunocitoquímica para AVP en el núcleo supraóptico de secciones coronales de rata. Las puntas de flechas señalan células que únicamente expresan el ARNm de R-IGF-I (granos de plata). Las flechas indican neuronas doblemente marcadas para el ARNm de R-IGF-I (granos de plata) y para AVP (reacción difusa del DAB). Barras de calibrado: 10 μ m.

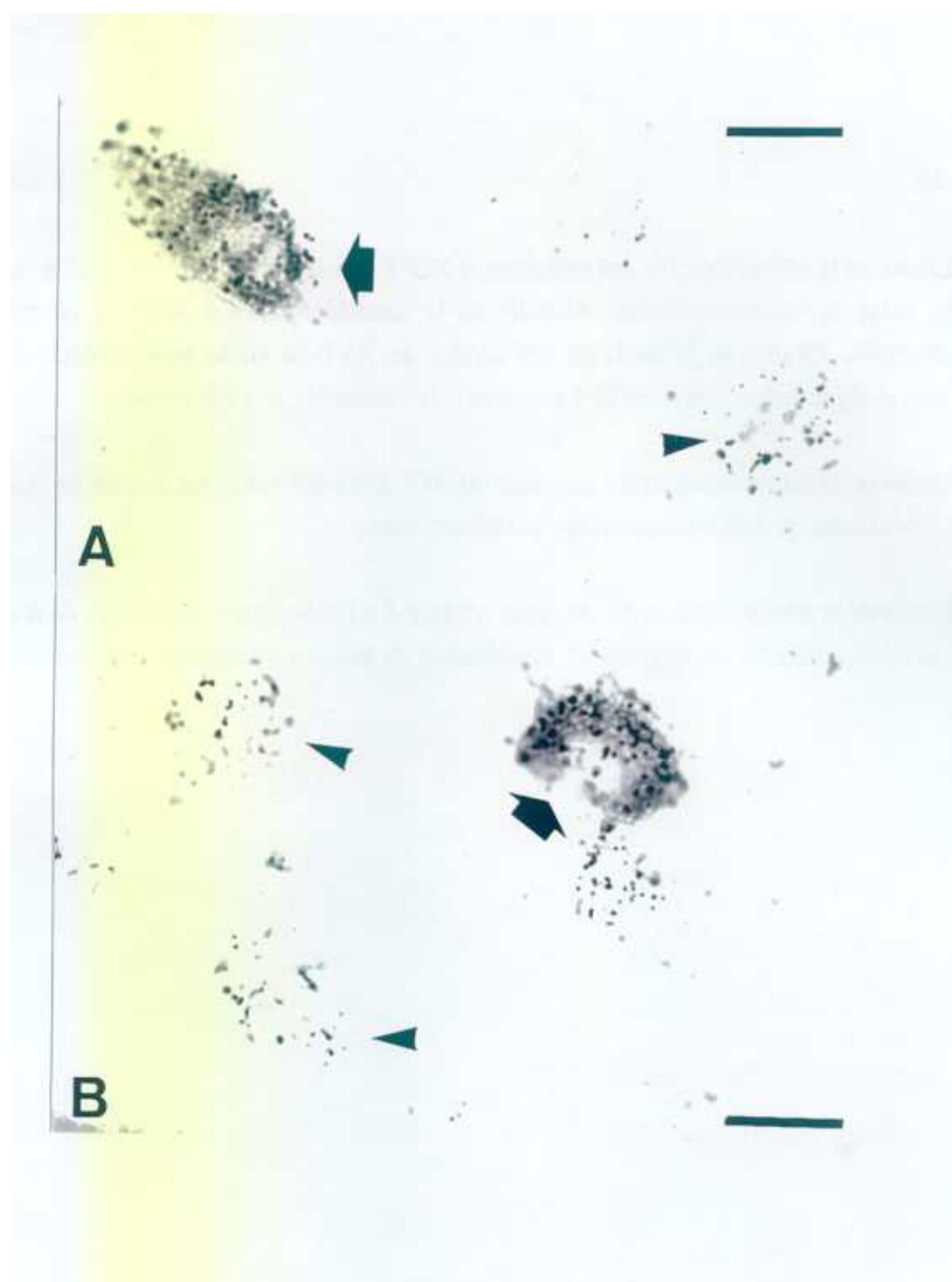


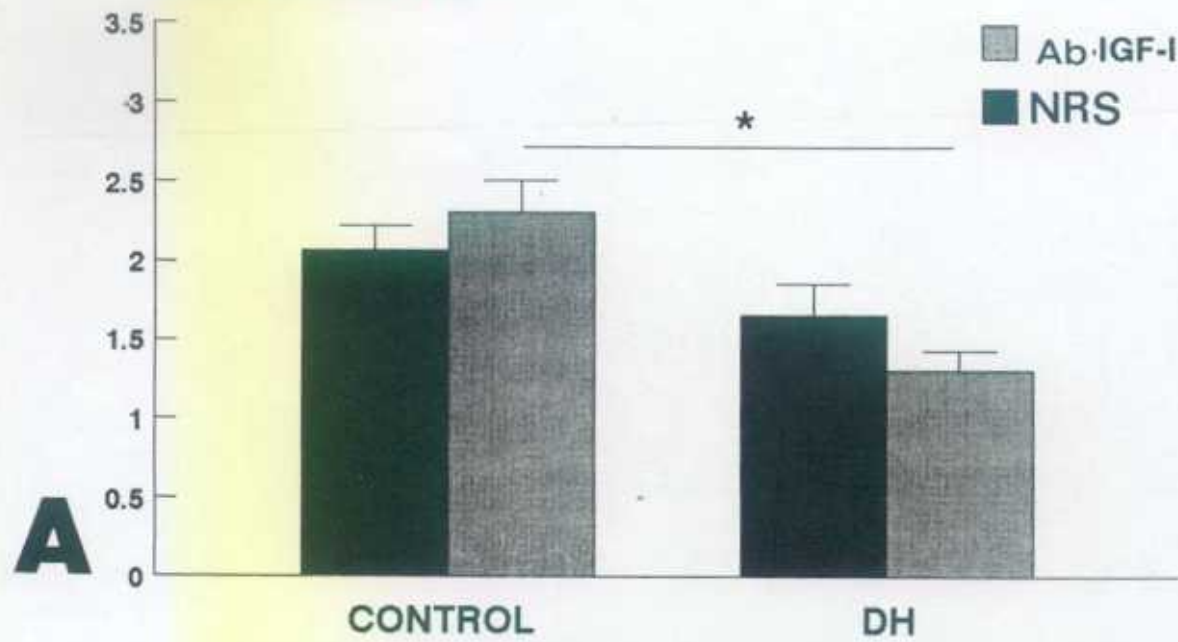
Fig. 40.

(A) Efecto de la administración del antisuero α -IGF-I (Ab-IGF-I) o suero normal de conejo (NRS) sobre la concentración de AVP-IR en la neurohipófisis de animales controles y deshidratados. Obsérvese la caída en los niveles de AVP-IR en la neurohipófisis de los animales deshidratados con Ab-IGF-I respecto a las controles con Ab-IGF-I.

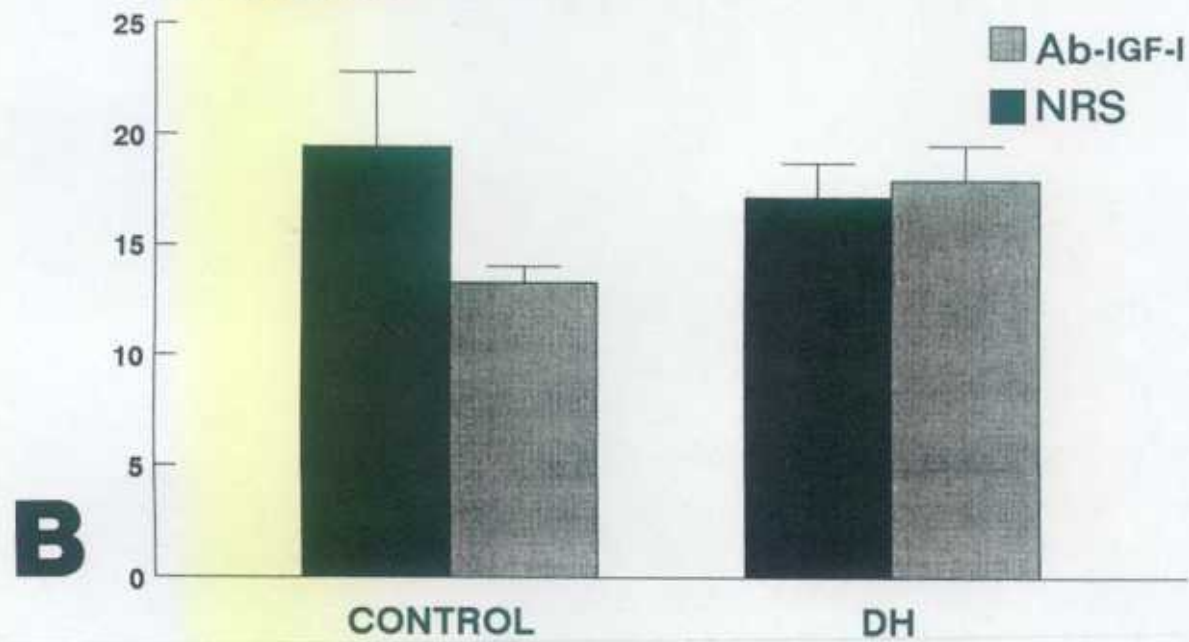
(B) Efecto de la administración de antisuero Ab-IGF-I o NRS sobre los niveles de AVP-IR en el hipotálamo de animales controles y deshidratados.

(C) Efecto de la administración de antisuero Ab-IGF-I o RNS sobre el contenido de AVP-IR en el cerebro anteriore (excluyendo el hipotálamo) de animales controles y deshidratados.

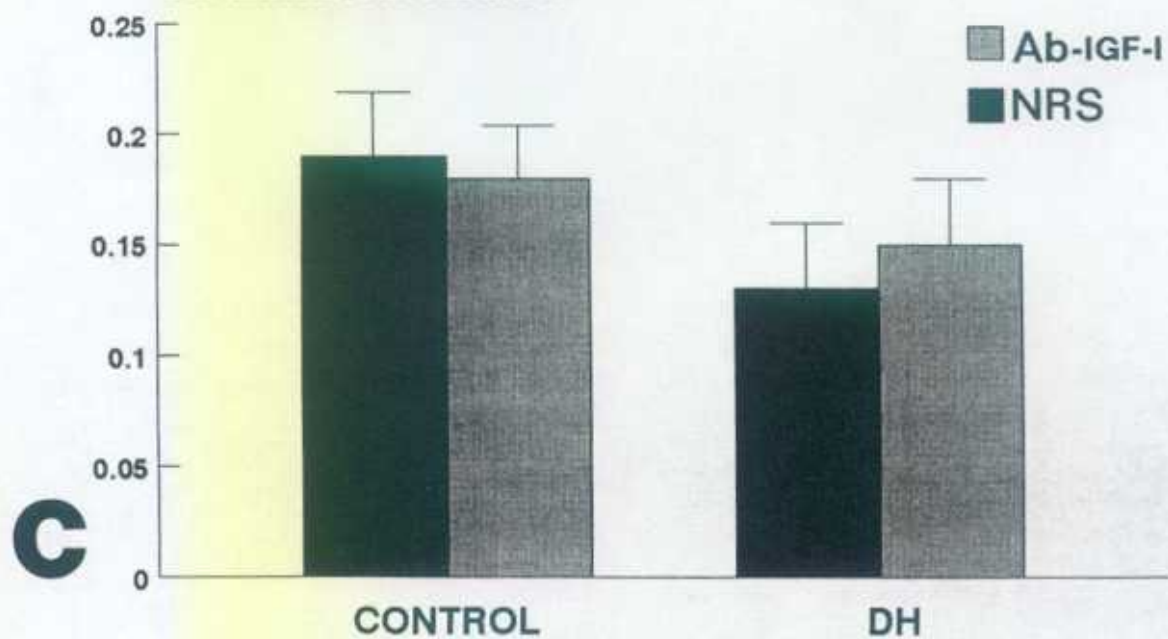
NEUROHIPOFISIS



HIPOTALAMO



CEREBRO ANTERIOR



DISCUSSION

1. DISTRIBUCION DE IGF-I Y SU RECEPTOR EN SNC ADULTO

1.1. Distribución del péptido IGF-I en SNC

La especificidad del antisuero FL-51089 fue verificada por diferentes técnicas. En RIA el antisuero fue capaz de reconocer IGF-I, siendo la reacción de cruce con otros 28 péptidos (incluidos IGF-II e insulina) menor del 0.01%. Mediante Western blot, el antisuero reconoció IGF-I pero no IGF-II. Al incubar secciones histológicas con el antisuero FL-51089, previamente preadsorbido con IGF-I₁₋₇₀ se abolió el marcaje inmunocitoquímico obtenido sin la preadsorción. El inmunomarcaje no presentó ninguna reacción de cruce con otros péptidos ensayados. El antisuero FL-51089 incubado con secciones de órganos no nerviosos presentó un marcaje celular que correspondía con lo descrito por otros autores. Los resultados obtenidos utilizando otro antisuero contra IGF-I en cerebelo humano, donde encontramos la mayor concentración del IGF-I endógeno, correspondían con los obtenidos con el antisuero FL-51089. Los anteriores datos sugieren que el antisuero FL-51089 reconoce específicamente IGF-I endógeno o, alternativamente, algún otro péptido no conocido análogo al IGF-I.

En el SNC de ratas adultas, que no habían estado expuestas a ningún tipo de tratamiento, los niveles más altos de inmunoreactividad para IGF-I fueron detectados en cerebelo. Tras administración *icv* de colchicina se encontró un aumento en la inmunoreactividad para IGF-I en hipotálamo, neocorteza e hipocampo. Las restantes áreas del SNC en ningún caso mostraron inmunoreactividad para IGF-I. En las áreas de cerebro humano estudiadas, observamos un intenso inmunomarcaje para IGF-I en cerebelo y con menor intensidad en la corteza somatosensorial.

Es de destacar el hecho de que las dos áreas estudiadas en el cerebro humano presentaran una mayor intensidad de marcaje para IGF-I que en rata, muy particularmente el cerebelo. Esto podría deberse a que el antisuero FL-51089, generado contra IGF-I₁₋₇₀ humano, reconociera más fácilmente el IGF-I endógeno humano que el de rata. Sin embargo, el alto grado de conservación en la secuencia del IGF-I maduro en las dos especies (Shimatsu y Rotwein, 1987) hace pensar en otros posibles motivos. Estudios de Sara y col. (1986) han demostrado la presencia de una forma truncada de IGF-I (des(1-3)-IGF-I) en cerebro humano. A pesar de que el antisuero fue generado contra la molécula completa (IGF-I₁₋₇₀), no podemos descartar la posibilidad de que, de algún modo, nuestro antisuero reconozca mejor la forma truncada. Por último, las diferencias encontradas en las diferentes especies podría deberse a que el cerebro humano exprese mayores concentraciones de IGF-I endógeno que el de rata. Esta última posibilidad sugeriría que en SNC humano, IGF-I podría jugar un importante papel en su normal funcionamiento.

Trabajos anteriores han demostrado la presencia de IGF-I en SNC de mamíferos (Sara y col., 1982; Sara y col., 1986; Yamaguchi y col., 1990). Mediante la aplicación de técnicas inmunocitoquímicas, se ha descrito la localización celular de IGF-I en cerebro de rata adulta. Algunos autores han encontrado una amplia distribución de células inmunoreactivas en situación basal (Noguchi y col., 1987) o tras la administración de colchicina (García-Segura y col., 1991). Por el contrario, otros únicamente han localizado inmunoreactividad para IGF-I restringida a las células de Purkinje del cerebelo y motoneuronas, incluso tras la administración de colchicina (Hansson y col., 1988b). En nuestros resultados, tan sólo encontramos positividad para IGF-I en células de Purkinje del cerebelo y muy débilmente en hipotálamo y corteza cerebral, así como en hipocampo después de tratar los animales con colchicina. Aunque no existe una explicación conocida para las diferencias encontradas por los distintos autores, las diferencias en los antisueros y protocolos empleados podrían contribuir a la heterogeneidad de los resultados.

Como han mostrado Rotwein y col. (1988), cuando se analiza la expresión de IGF-I en SNC adulto por el ensayo de protección de ribonucleasas, se encuentra una amplia distribución del ARNm de IGF-I. Sin embargo, mediante la aplicación de técnicas de hibridación *in situ*, la expresión del gen de IGF-I en SNC adulto parece ser muy baja y restringida a áreas concretas (Werther y col., 1990; Bondy, 1991), entre las cuales se incluyen el bulbo olfativo, la corteza piriforme y el cerebelo. Nuestros resultados en la localización del ARNm de IGF-I mediante hibridación *in situ* fueron similares a los publicados por Bondy (1991). La consistente localización de inmunoreactividad para IGF-I en células de Purkinje del cerebelo presentada en esta tesis está en buen acuerdo con los estudios de expresión del gen de IGF-I. Sin embargo, en zonas donde la expresión del ARNm de IGF-I esta bien establecida, como es el bulbo olfativo o la corteza piriforme (Werther y col., 1990; Bondy, 1991), nosotros en ningún caso encontramos inmunoreactividad para IGF-I. Esta ausencia de inmunoreactividad para IGF-I en áreas donde se encuentran altos niveles de su ARNm podría estar en relación con el concepto de que IGF-I no es almacenado intracelularmente y está sometido a una liberación constitutiva (Daughaday y Rotwein, 1989). La presencia de inmunoreactividad para IGF-I únicamente en algunas de las áreas donde se ha demostrado la existencia de su ARNm sugiere la existencia de mecanismos postranscripcionales diferenciales en distintas áreas del SNC. Por otro lado, encontramos inmunoreactividad para IGF-I en hipotálamo y en corteza cerebral, sin poder demostrar la presencia de los transcritos correspondientes mediante hibridación *in situ*. En estas áreas del SNC, a pesar de que se ha demostrado la presencia del ARNm de IGF-I por

el ensayo de protección de ribonucleasas (Rotwein y col., 1988; Bach y col., 1991), otros autores tampoco han sido capaces de detectar estos transcritos por hibridación *in situ* (Werther, 1990; Bondy 1991). Estas diferencias en la detección de expresión del ARNm de IGF-I empleando el ensayo de protección de ribonucleasas o técnicas de hibridación *in situ*, han sido planteadas por otros autores (Bach y col., 1991) y probablemente reflejen diferencias intrínsecas a las técnicas en sí, donde la sensibilidad de cada una de ellas podría jugar un importante papel.

Localización de IGF-I en cerebelo

Es bien aceptado que el cerebelo es una de las áreas del SNC con mayor expresión de IGF-I, tanto durante el desarrollo como en el adulto (Andersson y col., 1988; Bondy, 1991; García-Segura y col., 1991; Hansson y col., 1988b; Lee y col., 1992b; Rotwein y col., 1988; Yamaguchi y col., 1990; Binoux y col., 1981; Sara y col., 1982; Werther y col., 1990; Bartlett y col., 1991a,b). La aplicación de técnicas histoquímicas y de lesiones experimentales han permitido postular dos posibles orígenes de IGF-I en cerebelo de rata adulta. Por un lado, se ha sugerido un origen intrínseco de IGF-I, concretamente por las células de Purkinje (Andersson y col., 1988; Bondy, 1991; Hansson y col., 1988b; Lee y col., 1992b; Bartlett y col., 1991a). Por otro lado, la oliva inferior ha sido propuesta como un posible origen de IGF-I-IR en el cerebelo (Torres-Aleman y col., 1991; Nieto-Bona y col., 1993). Nuestros resultados (Aguado y col., 1992a) demuestran la presencia tanto del péptido IGF-I como la de su ARNm en células de Purkinje de la rata, estando en buen acuerdo con estudios anteriores (Andersson y col., 1988; Bondy, 1991; Hansson y col., 1988b). Ocasionalmente, también encontramos algunas células de Golgi en la capa de los granos muy débilmente inmunotefñidas para IGF-I. Debido a que no encontramos ARNm de IGF-I en células de Golgi, el inmunomarcaje podría significar captación del péptido sintetizado por las células de Purkinje o bien una limitación técnica para detectarlo. Estos resultados, junto con el análisis ultraestructural realizado, donde observamos que la inmunoreactividad para IGF-I estaba asociada principalmente al lumen de cisternas del retículo endoplásmico rugoso de las células de Purkinje, claramente indican que las células de Purkinje son capaces de sintetizar IGF-I. La localización subcelular de IGF-I-IR en la membrana nuclear de las células de Purkinje observada en este estudio podría representar inmunomarcaje de cisternas del retículo endoplásmico rugoso en continuidad con la membrana nuclear. Por último, y debido a que las células de Purkinje expresan receptores para IGF-I, la presencia de lisosomas (cuerpos multivesiculares) inmunoreactivos para IGF-I

en las células de Purkinje podrían indicar internalización de complejos péptido-receptor, sugiriendo que IGF-I podría actuar de una manera autocrina o paracrina sobre las mismas células que sintetizan el péptido. Todo lo anterior nos permite sugerir que, en la rata, las células de Purkinje probablemente sean el origen del IGF-I presente en el cerebelo, aunque no descartamos la posibilidad de que la oliva inferior sintetice parte del IGF-I cerebeloso, tal como han apuntado otros autores (Torres-Aleman y col., 1991; Nieto-Bona y col., 1993).

Además de estudiar la presencia de IGF-I en cerebelo de rata, también lo hicimos en humanos (Aguado y col., 1994). Tras seguir los mismos protocolos inmunocitoquímicos, observamos que el patrón general de inmunotinción en cerebelos humanos fue semejante al encontrado en la rata. Sin embargo, en los cerebelos humanos no se detectaron células de Golgi positivas para IGF-I y las células de Purkinje exhibían un precipitado de inmunoreacción más intenso que las de las ratas. Como discutimos anteriormente, estas diferencias podrían reflejar diferencias interespecies. En relación con el intenso inmunomarcaje detectado en las células de Purkinje de humanos, Sandberg y col. (1988) encontraron que el cerebelo era una de las áreas del cerebro humano con mayores cantidades de ARNm de IGF-I. Teniendo en cuenta este último dato, así como los resultados de hibridación *in situ* y de microscopía electrónica obtenidos en cerebelo de rata, es probable que el péptido inmunoreactivo localizado en las células de Purkinje de humanos represente IGF-I sintetizado por la propia célula e internalización de complejos péptido-receptor.

La localización del péptido inmunoreactivo en los axones y posibles colaterales recurrentes de las células de Purkinje podría corresponder a IGF-I sintetizado *de novo* y transportado anterogradamente para ejercer su acción a lo largo del axon y/o en el terminal nervioso. Otros autores han sugerido un posible transporte anterogrado de IGF-I en otros tipos neuronales (Hansson y col., 1987; Nieto-Bona y col., 1993). Posibles terminales inmunoreactivos y axones varicosos cercanos a las células de Purkinje podrían reflejar una participación de IGF-I en conexiones sinápticas establecidas por colaterales recurrentes de los axones de las propias células de Purkinje. A pesar de que no hay evidencia de un transporte retrogrado de complejos IGF-I-receptores en células de Purkinje, la posibilidad de que el producto de reacción en los axones de las células de Purkinje puedan representar complejos péptido-receptor viajando desde los terminales en estructuras dianas hacia el cuerpo celular no puede ser descartada. Debido a que la capa molecular del cerebelo, lugar donde se disponen las dendritas de las células de Purkinje, presenta la mayor densidad de sitios de unión para IGF-I en cerebelo (Lesniak y col., 1988), la presencia de inmunoreactividad para IGF-I en dendritas de células de Purkinje podría significar

internalización de complejos péptido-receptor, aunque también cabe la posibilidad de que se trate de IGF-I sintetizado *de novo*.

Mediante el uso de moléculas marcadoras de células específicas se han demostrado subpoblaciones de las células de Purkinje que reflejan una diversidad bioquímica de estas células (Sotelo y Wassef, 1991). Mientras que calbindina es un excelente marcador de todas las células de Purkinje (Scotti y Nitsch, 1992), LNGFR define subpoblaciones de estas células (Pioro y Cuello, 1990). Los presentes resultados muestran que algunas células, inmunoreactivas para calbindina, no expresaban inmunoreactividad para IGF-I, así como que IGF-I y LNGFR colocalizaban en ciertas subpoblaciones de células de Purkinje. Así pues, parece probable que IGF-I sea expresado en subpoblaciones de células de Purkinje. La colocalización entre IGF-I y el NGFR podría estar en relación con el hecho de que los IGFs pueden potenciar la acción del NGF por inducción del receptor (Recio-Pinto y col., 1984; Recio-Pinto y col., 1986) y cooperar con NGF en la formación de neuritas (Mill y col., 1985; Ang y col., 1993; Frödin y Gammeltoft, 1994). Estudios anteriores han mostrado que subpoblaciones de células de Purkinje, dramáticamente, incrementa la expresión inmunocitoquímica de LNGFR en respuesta a lesiones en el cerebelo adulto (Martínez-Murillo y col., 1993), sugiriendo una posible significación funcional de la compartimentalización del cortex cerebeloso en el adulto. La coexpresión de IGF-I e LNGFR quizás sea requerida para la plasticidad del cerebelo o para el mantenimiento del normal funcionamiento de las células de Purkinje. En rata, se ha demostrado que IGF-I actúa como factor de crecimiento en cultivos de células fetales de Purkinje (Torres-Alemán y col., 1992), mientras que en el adulto parece ejercer un papel neuromodulador en la transmisión glutamatérgica (Castro-Alamancos y Torres-Alemán, 1993). La abundante inmunoreactividad para IGF-I encontrada en cerebelos humanos junto con los posibles papeles funcionales del péptido en modelos experimentales sugieren una importante participación de este factor en la fisiología del cerebelo humano.

Localización de IGF-I en hipotálamo

Tras el procesamiento inmunocitoquímico de secciones histológicas de la rata adulta, se observaron neuronas inmunoreactivas para IGF-I en el SHN. Los núcleos paraventricular, supraóptico y accesorios hipotálamicos contenían neuronas y estructuras similares a terminales inmunoreactivas para IGF-I. Además, se localizaron fibras varicosas positivas para IGF-I dentro del hipotálamo basal lateral y medial, así como en el lóbulo posterior de la hipófisis (Aguado y col., 1992b). Los estudios de colocalización mostraron que la

inmunoreactividad para IGF-I principalmente se localizaba en neuronas oxitocinérgicas. A nivel ultraestructural encontramos que la inmunoreactividad para IGF-I estaba asociada principalmente con cisternas del aparato de Golgi y, en ciertos casos, con cisternas del retículo endoplásmico rugoso y granulos de secreción. Otras especies de roedores y primates también presentaron neuronas magnocelulares positivas para IGF-I, lo cual refleja la especificidad de los resultados obtenidos, así como la conservación de IGF-I en la filogenia.

Los resultados de este estudio, en parte, se correlacionan con el estudio de García-Segura y col. (1991) donde se describe inmunoreactividad para IGF-I en neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular en rata adultas tratadas con colchicina. Sin embargo, a diferencia del citado trabajo, nosotros, en ninguna ocasión, encontramos inmunoreactividad para IGF-I en las células endimarias, neuronas del núcleo arcuato, área dorsal hipotalámica o en el complejo mamilar. Por el contrario, hallamos inmunopositividad en los núcleos accesorios magnocelulares así como en fibras del tracto hipotalámico -neurohipofisial. Probablemente la razón de estas diferencias este relacionada con las técnicas empleadas.

Nuestros resultados estan en buen acuerdo con trabajos anteriores donde se muestra que IGF-I y su ARNm se hallan en concentraciones altas en el hipotálamo adulto (Binoux y col., 1981; Yamaguchi y col., 1990; Sara y col., 1982; Bach y col., 1991; Rotwein y col., 1988) y nos permiten sugerir una posible síntesis y transporte de IGF-I desde los somas magnocelulares hasta el lóbulo posterior de la hipófisis. Dicha hipótesis es apoyada por varios razonamientos. i) Tras la administración de colchicina, se originó un notable incremento en la inmunoreactividad para IGF-I en los somas neuronales, sin observarse cambios en su distribución. Esto sugiere que el incremento de inmunoreactividad para IGF-I en los somas es debido a un bloqueo del transporte anterógrado, ya que esta bien establecido que la colchicina bloquea eficazmente el transporte axonal en el SHN (Norström y Hansson, 1973; Norström y col., 1971; Dasheiff y Ramirez, 1985). ii) Binoux y col. (1981) mostraron que explantes de hipotálamos mantenidos *in vitro*, tras su incubación con inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida), reducían drásticamente su liberación de IGFs al medio de cultivo, mientras que la liberación de IGFs al medio de cultivo de explantes de lóbulos neurointermedios hipofisarios tratados con cicloheximida apenas fue afectada. Esto parece indicar una capacidad de síntesis de dichos péptidos principalmente en el hipotálamo. iii) La inmunoreactividad para IGF-I se localizó subcelularmente en los orgánulos que participan en la síntesis y liberación de proteínas secretables. La localización de la inmunoreactividad para IGF-I en cisternas del retículo rugoso apunta a una posible síntesis del péptido en estas neuronas, mientras que su localización en el aparato de Golgi y gránulos de secreción

indicarían su naturaleza secretora. A pesar de que ha sido propuesto que IGF-I no es almacenado intracélularmente y está sometido a una liberación constitutiva (Daughaday y Rotwein, 1989), nuestros resultados obtenidos en ratas tratadas con colchicina muestran, aunque en pocos casos, inmunoreactividad en gránulos de secreción, probablemente la administración de la colchicina participe en la visualización de los gránulos de secreción positivos para IGF-I. Otros autores, estudiando la localización de péptidos relacionados con la insulina en diferentes tipos neuronales, han mostrado resultados ultraestructurales similares a los nuestros (Schechter y col., 1994; Sonetti y col., 1992). Por otra parte, a pesar que el hipotálamo contiene cantidades detectables del ARNm de IGF-I (Bach y col., 1991; Rotwein y col., 1988), ni nosotros, ni otros autores (Werther y col., 1990; Bondy, 1991) hemos podido detectar su localización mediante técnicas de hibridación *in situ*. Como se discutió anteriormente, probablemente sea por motivos relacionados con las técnicas en sí. La localización celular y ultraestructural de la inmunoreactividad para IGF-I junto con la presencia del ARNm de IGF-I en áreas hipotalámicas apuntan hacia una probable síntesis de IGF-I en el SHN. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que IGF-I sea sintetizado en otras áreas hipotalámicas e internalizado por las neuronas magnocelulares. En relación con esto último, Bach y Bondy (1992) han demostrado mediante técnicas de hibridación *in situ* que la neurohipófisis, probablemente los pituicitos, contienen ARNm de IGF-I, de este modo cabe la posibilidad de que el IGF-I encontrado en las neuronas magnocelulares se origine en el lóbulo posterior de la hipófisis, sea captado por terminales nerviosos de las neuronas magnocelulares y transportado retrógradamente hasta los somas, aunque esta posibilidad quedaría por demostrar.

El IGF-I ha sido propuesto como neuromodulador de la liberación de otros péptidos hipotalámicos, como son SOM y LHRH (Berelowitz y col., 1981; Hiney y col., 1991; Tannenbaum y col., 1983; Kanematsu y col., 1991). El hecho de encontrar fibras nerviosas inmunoreactivas y posibles terminales en los núcleos periventricular, paraventricular, comisural anterior y arcuato así como en el hipotálamo lateral y mediobasal, áreas donde se ha demostrado sitios de unión para IGF-I (Matsuo y col., 1989; Lesniak y col., 1988; Goodyer y col., 1984) sugiere que el IGF-I hipotalámico pudiera modular la liberación de péptidos y neurotransmisores en estas regiones. Más concretamente, la detección de fibras y posibles terminales con IGF-I-IR en el núcleo periventricular, área donde se localizan las neuronas somatostatinérgicas, pudiera apoyar el control neuromodulador de la actividad de estas neuronas por el IGF-I propuesto con anterioridad (Berelowitz y col., 1981; Tannenbaum y col., 1983). La posibilidad de que estos putativos terminales inmunoreactivos

podieran representar secciones de fibras *en passage* y no terminales también ha de ser considerada. La hipótesis de que algunos factores tróficos pueden ser liberados por dendritas y somas neuronales (Korsching, 1993) junto con el hecho de que péptidos sintetizados en neuronas magnocelulares pueden ser liberados por sus dendritas (Morris y col., 1993), plantea una posible liberación de IGF-I desde las dendritas de las neuronas magnocelulares para ejercer una acción local sobre la actividad de neuronas cercanas. Además del conocido papel neuromodulador de IGF-I en el hipotálamo y teniendo en cuenta que IGF-I actúa como factor trófico en cultivos fetales de hipotálamos (Torres-Alemán y col., 1990a), no podemos descartar una posible acción trófica de este péptido en el hipotálamo adulto, el cual posee una importante capacidad plástica (Theodosis y Poulain, 1993).

Más conocidas son las acciones moduladoras que IGF-I ejerce sobre las hormonas adenohipofisarias (Berelowitz y col., 1981; Yamashita y Melmed, 1986; Ceda y col., 1987; Hiney y col., 1991; Silverman y col., 1989; Tannenbaum y col., 1983; Kanematsu y col., 1991; Lara y col., 1994). Es bien conocido que las neuronas parvocelulares hipotalámicas proyectan a los capilares portales en la zeEM, donde liberan sus neurohormonas a la sangre. Estas neurohormonas son transportadas por el sistema porta a la hipófisis anterior, donde regulan la liberación de hormonas adenohipofisarias (Page, 1988). En el presente estudio encontramos algunas fibras varicosas con inmunoreactividad para IGF-I cursando por la zeEM, aunque la mayoría fueron localizadas en la ziEM, correspondiendo a los axones de las neuronas magnocelulares. Estas fibras positivas para IGF-I en la zeEM sugieren una posible liberación de IGF-I al sistema porta hipofisario, que podría alcanzar la adenohipófisis y así regular la liberación de hormonas adenohipofisarias descrita por otros autores (Berelowitz y col., 1981; Yamashita y Melmed, 1986; Ceda y col., 1987; Silverman y col., 1989; Tannenbaum y col., 1983). En cuanto al origen de estas fibras nerviosas inmunomarcadas de la zeEM, cabe la posibilidad de que provengan de neuronas magnocelulares, ya que ha sido demostrado que ciertas neuronas hipotalámicas magnocelulares proyectan a la zeEM (Hoffman y col., 1986). Además, es conocido que las neuronas magnocelulares contribuyen a la regulación de la secreción de hormonas adenohipofisarias mediante la liberación de neurohormonas en la ziEM. En base a esto, es también posible que en respuesta a un estímulo, el IGF-I contenido en fibras localizadas en la ziEM pueda ser liberado, quizás preferencialmente desde los cuerpos de Herring, para alcanzar de una modo paracrino dianas concretas en la EM. Un proceso análogo ha sido descrito para otros péptidos hipotalámicos (Holmes y col., 1986; Buma y Nieuwenhuys, 1988). También es posible que el IGF-I liberado en la ziEM pudiera alcanzar la circulación

portal hipofisaria a través de la extensa red de capilares portales fenestrados (Bergland y Page, 1979). Finalmente, IGF-I podría alcanzar el lóbulo anterior a través de los vasos cortos portales (Porter y col., 1973; Oliver y col., 1977). En resumen, es posible que el IGF-I localizado en el SHN pudiera, al menos en parte, participar en la regulación de las hormonas adenohipofisarias. Sin embargo, no podemos olvidar que el IGF-I sintetizado localmente en la hipófisis (Bach y Bondy, 1992), así como el IGF-I circulante tienen un papel fundamental en la regulación de estas hormonas adenohipofisarias.

Hasta el momento actual, toda la atención respecto al posible control que IGF-I pueda ejercer sobre hormonas hipofisarias ha sido centrada en las hormonas adenohipofisarias, sin haber sido propuesto ninguna acción posible sobre las neurohormonas AVP y OT. La localización de la inmunoreactividad para IGF-I en el SHN, sugiere algún tipo de interacción de IGF-I con dicho sistema.

Localización de IGF-I en neocorteza

El análisis inmunocitoquímico en secciones de corteza cerebral de rata mostró que la inmunoreactividad para IGF-I se localizaba en los citoplasmas de neuronas neocorticales y algunas de sus prolongaciones, incrementándose esta inmunoreactividad tras la administración de colchicina. A nivel ultraestructural, el inmunomarcaje únicamente se detectó en el aparato de Golgi. En humanos, la inmunoreactividad se localizó principalmente en fibras nerviosas y muy ocasionalmente en neuronas. Las diferencias encontradas entre las dos especies podrían significar, como hemos comentado con anterioridad, características propias de cada especie.

La presencia de inmunoreactividad para IGF-I en corteza cerebral esta de acuerdo con estudios bioquímicos anteriores (Binoux y col., 1981; Yamaguchi y col., 1990; Sara y col., 1982). Referente a los trabajos morfológicos publicados, los primeros autores que describieron la distribución de la inmunoreactividad para IGF-I en SNC de rata no encontraron inmunomarcaje en la corteza cerebral (Noguchi y col., 1988; Hansson y col., 1988b). Más tarde, García-Segura y col. (1991) describen una amplia distribución del péptido en la corteza cerebral de ratas tratadas con colchicina, encontrando inmunoreacción para IGF-I en los núcleos celulares. Nuestros resultados muestran la presencia de muy pocas neuronas, débilmente inmunoteñidas para IGF-I, en la neocorteza de ratas tratadas con colchicina. El hecho de encontrar niveles tan bajos de inmunoreactividad podría explicar el porqué otros autores no la hayan detectado. Sin embargo, las diferencias entre los resultados obtenidos por García-Segura y col. (1991) y los nuestros tan solo pueden ser argumentados con

2. REGULACION DE IGF-I Y R-IGF-I EN EL SHN

2.1. Regulación de IGF-I en situaciones de disminución de la secreción de GH

2.1.1. Envejecimiento

Nuestros resultados demuestran que la intensidad y distribución del marcaje para IGF-I fue notablemente modificado en la EM de los animales envejecidos respecto a los adultos jóvenes. Las ratas envejecidas presentaban fibras intensamente inmunoreactivas con grandes dilataciones en la ziEM, incluso penetrando en el tercer ventrículo. Tal y como se discutió anteriormente, el IGF-I-IR localizado en la ziEM podría alcanzar la adenohipófisis para así ejercer su acción sobre las hormonas hipofisarias. El aumento de IGF-I-IR en la EM de los animales envejecidos podría reflejar un incremento de su síntesis, pudiendo contribuir a la disminución de GH durante el envejecimiento. Sin embargo, este incremento de inmunoreactividad también podría significar una disminución del transporte y liberación de IGF-I de las neuronas magnocelulares, de hecho, en roedores se ha descrito una reducción en la velocidad del transporte axonal del SHN durante el envejecimiento (Fotheringham y col., 1991). El análisis de las concentraciones del ARNm de IGF-I en el hipotálamo durante el envejecimiento clarificaría el nivel de su síntesis en dichas edades. La presencia de fibras inmunoreactivas en proximidad al tercer ventrículo sugiere una liberación de IGF-I al LCR, como ha sido propuesto para las hormonas neurohipofisarias y factores de liberación hipotalámicos (Dogterom y col., 1977; Kee y Wood, 1987). Sería interesante evaluar los niveles de IGF-I-IR en el LCR en individuos envejecidos, ya que normalmente las concentraciones del mismo son muy bajas, predominando las de IGF-II sobre las de IGF-I (Haselbacher y Humbel, 1985).

Por otra parte, es conocido que la actividad del SHN en el envejecimiento es alterada. En humanos, parece bien establecido que las neuronas vasopresinérgicas a partir de los 60 años de edad experimentan cambios plásticos encaminados a una mayor actividad neuroendocrina, sin observarse alteraciones en las neuronas oxitocinérgicas (Dorsa y Wilkinson, 1988; Fliers y Swaab, 1986). Sin embargo, en la rata la actividad del SHN durante el envejecimiento es discutida. Durante la vejez, existen estudios que apuntan hacia una hiperactividad de este sistema (Silverman y Sladek, 1991; Watt, 1970; Fliers y Swaab, 1983; Kirkland y col., 1984; Robertson y Rower, 1980), otros hacia una hipofuncionalidad (Watkins y Choy, 1980; Dorsa y Bottemiller, 1982, Sladek y col., 1981; Miller, 1985; Sladek y col., 1981; Zbuzek y Wu, 1982; Rodeck y col., 1960) y los menos no encuentran diferencias (Dorsa y Wilkinson, 1988). Lo que si parece bien establecido en la rata es una disminución de la respuesta renal a los efectos antidiuréticos de AVP con el envejecimiento

(Dorsa y Wilkinson, 1988). El hecho de que durante el envejecimiento el SHN experimente alteraciones en la actividad de las neuronas magnocelulares junto a las modificaciones encontradas en la inmunoreactividad para IGF-I en estas edades hace pensar en alguna posible relación de este péptido y las hormonas neurohipofisarias.

2.1.2. Diabetes inducida por estreptozotocina

Tras seis semanas de la administración de STZ los animales tratados con STZ contenían un mayor número de células positivas para IGF-I en el SHN y en la adenohipófisis. En el hipotálamo, nuestros resultados muestran un incremento de la inmunoreactividad para IGF-I durante la diabetes. Sin embargo, estudios anteriores en hipotálamos de ratas diabéticas mediante RIA encontraron una disminución en el contenido de IGF-I-IR (Olchovsky y col. 1990). Diferencias en la dosis de STZ administrada, el tiempo de supervivencia de los animales o las técnicas aplicadas podrían intervenir en las discrepancias encontradas. Experimentos en los que se analizaran en paralelo los niveles de IGF-I por RIA e inmunocitoquímica podrían ayudar a clarificar estas diferencias. Aunque durante la diabetes, la mayoría de los tejidos disminuyen la síntesis de IGF-I, estudios de nuestro laboratorio han mostrado una ausencia de cambios en la expresión del ARNm de IGF-I en el hipotálamo de ratas diabéticas respecto a animales controles (resultados no publicados). El incremento del IGF-I hipotalámico encontrado inmunocitoquímicamente podría deberse a un déficit del transporte axonal anterógrado como consecuencia de la neuropatía diabética (Tomlinson y Mayer, 1984). Esto último parece poco probable ya que registros electrofisiológicos de neuronas magnocelulares hipotalámicas de animales diabéticos indican un incremento en la tasa de descarga espontánea (Akaishi y Homma, 1992). Por otro lado, y al igual que nosotros, Olchovsky y col. (1991) también encontraron un incremento de IGF-I-IR en adenohipófisis de animales diabéticos, sin que observaran cambios en la expresión de su ARNm. Además resultados de nuestro laboratorio indican una disminución en la acumulación del ARNm del IGF-I hipofisario en la diabetes (datos no publicados). Los cambios detectados en la inmunoreactividad para IGF-I en hipotálamo y adenohipófisis de ratas diabéticas acompañados de la ausencia o descenso de la concentración de sus ARNm sugieren una regulación de IGF-I a nivel de la traducción, del procesamiento postranscripcional, de la degradación o secreción del péptido. Una intervención de las IGFFBPs, como secuestradoras de la inmunoreactividad para IGF-I, tampoco podría descartarse. Experimentos en los que se revertiera de la diabetes con la administración exógena de insulina ayudarían a confirmar el papel de la insulina la regulación de IGF-I-IR. El incremento de inmunoreactividad para

IGF-I en el hipotálamo y adenohipófisis de los animales diabéticos podría contribuir a la disminución de la secreción de GH observada en la diabetes, a través de una acción neuroendocrina (desde el hipotálamo) o local paracrina-autocrina (en la adenohipófisis).

En el patrón de inmunoreactividad para SOM hipotalámica no se alteró en los animales diabéticos, de acuerdo con trabajos previos en los que no hallaron diferencias ni en los niveles y distribución de SOM-IR (Patel y Bankier, 1978; Plotsky, 1991; Williams y col., 1988) ni en las concentraciones de su ARNm (Papachiristou y col., 1989). Estos resultados sugieren que SOM no jugaría un papel importante en la supresión de GH durante la diabetes. Sin embargo, en animales diabéticos se han descrito alteraciones en la liberación del péptido en el hipotálamo (Joanny y col., 1992), en el número de sus receptores adenohipofisarios (Olchovsky y col., 1990) y en la concentración del péptido-IR en el sistema portal hipofisario (Plotsky, 1991), además de un aumento de SOM-IR circulante (Patel y col., 1980; Tannenbaum, 1981) y de la expresión de su ARNm en el tracto gastrointestinal (Papachiristou y col., 1989). De este modo, parece que uno de los factores que pueden contribuir a la supresión de la GH en el modelo de diabetes originada por STZ sería el aumento de expresión de SOM periférica.

Respecto al GRF, ni los presentes resultados ni trabajos anteriores muestran cambios en los niveles del GRF-IR hipotalámico asociados a la diabetes (Plotsky, 1991; Olchovsky y col., 1990). Sin embargo, sí que se ha descrito una reducción en la concentración del ARNm del GRF hipotalámico de los animales diabéticos (Olchovsky y col., 1990), así como de GRF-IR en el sistema portal hipofisario (Plotsky, 1991). A pesar de no haber encontrado diferencias en el patrón de inmunoreactividad hipotalámica de GRF, los resultados de otros autores parecen indicar que GRF podría jugar contribuir a la disminución de la secreción de la GH hipofisaria.

La galanina, no mostró diferencias ni en intensidad ni en distribución del inmunomarcaje en la EM de las ratas diabéticas, comparado con las controles. Williams y col. (1988) encontraron diferencias cualitativas de distribución de galanina-IR en el núcleo supraóptico de animales diabéticos, sin observar cambios de galanina-IR por RIA. Dichas diferencias podrían de algún modo colaborar en la reducción de GH de ratas diabéticas.

Todos estos datos, parecen indicar que la disminución de los niveles de la GH en ratas diabéticas, más que estar influenciada por un solo factor regulador, probablemente lo esté por la acción coordinada de todos los péptidos anteriormente comentados, e incluso por otros reguladores de GH, como es el neuropéptido Y, cuya expresión hipotalámica se haya notablemente incrementada durante la diabetes inducida por STZ (McDonald y col., 1985;

Williams y col., 1988; Williams y col., 1989). También es importante destacar que para tener un conocimiento real de la situación fisiológica de los somatotropos durante la diabetes sería necesario, no solo analizar los niveles de los factores reguladores de GH (péptidos-IR y sus ARNm), sino también la respuesta de las células productoras de GH hacia estos péptidos, así como la interrelación entre dichos factores reguladores.

Además de las modificaciones descritas en la diabetes para GH y sus factores de liberación hipotalámicos, el SHN experimenta importantes alteraciones morfológicas y bioquímicas que indican un incremento de su actividad, principalmente de las neuronas vasopresinérgicas (Loesch y col., 1988; Lincoln y col., 1989; Fernstrom y col., 1990; VanItallie y Fernstrom., 1982; Brooks y col., 1989; Thompson y col., 1989). Los mecanismos por los cuales se incrementa AVP en la diabetes han sido relacionados con un incremento de la osmolaridad del plasma observado en estos animales (Brooks y col., 1989). Se piensa que el aumento de la concentración de glucosa en sangre sería el responsable de la hiperosmolaridad capaz de estimular la secreción de AVP (Thompson y col., 1989; Brooks y col., 1989). Además, existe una interrelación entre las neurohormonas AVP y OT y los niveles de glucosa en sangre (Altszuler y Hampshire, 1981; Hems y col., 1975; Chiodera y col., 1992). Las modificaciones observadas en la inmunoreactividad para IGF-I en ratas diabéticas junto a la activación del SHN en estos animales, una vez más sugiere una posible relación entre IGF-I y la actividad del SHN.

2.2. Regulación de IGF-I durante activación del SHN

2.2.1. Preñez a término y lactancia

En la gestación a término hay una estimulación de la síntesis y secreción de OT (Van Tol y col., 1988; Caldwell y col., 1987; Higuchi y col., 1986), la cual induce la contracción del útero durante el parto (Crowley y Armstrong, 1992). Posteriormente, durante la lactancia se produce de nuevo un incremento en la síntesis y liberación de OT (Van Tol y col., 1988; Caldwell y col., 1987; Higuchi y col., 1986) para actuar sobre las células mioepiteliales de las glándulas mamarias favoreciendo la salida de la leche (Crowley y Armstrong, 1992). Los mecanismos que regulan la expresión de OT y AVP en el SHN no son bien conocidos, aunque la estimulación durante lactancia ha sido más estudiada.

La estimulación mecánica de las fibras sensitivas de la mama durante la lactancia producen la activación de las neuronas oxitocinérgicas hipotalámicas (Wakerley y col., 1988), siendo probablemente este estímulo el principal responsable del aumento en la síntesis y liberación de OT descrito durante la lactancia (Van Tol y col., 1988; Spinolo y Crowley,

1993; Wakerley y col., 1988). En oposición a lo anterior, recientemente ha sido propuesto que durante los primeros días de lactancia se produce una disminución en la expresión de OT, probablemente relacionada con los niveles de esteroides, donde la estimulación mecánica de la lactancia no jugaría un papel predominante en la regulación de la expresión de las neurohormonas (Crowley y col., 1993).

Menos conocidos son los estímulos que desencadenan la hiperactividad de SHN en la gestación a término. En ciertos casos existe una correlación entre la expresión de OT con los niveles circulantes de estrógenos, proponiéndose que estos últimos podrían estar implicados en la estimulación de la transcripción del gen de OT (Crowley y col., 1993; Jirikowski y col., 1988).

En paralelo a la activación del sistema oxitocinérgico durante la gestación a término y la lactancia, también se produce un incremento de la expresión de AVP (Van Tol y col., 1988; Caldwell y col., 1987; Crowley y col., 1993; Zingg y Lefebvre, 1988), sin existir activación eléctrica de las neuronas vasopresinérgicas o aumento en su liberación (Wakerley y col., 1988; Poulain y Wakerley, 1982). El papel que AVP podría jugar en el parto y en la lactancia, únicamente es hipotetizable (Zingg y Lefebvre, 1988; Caldwell y col., 1987). Esta bien establecido que la hiperosmolaridad origina la activación de ambas poblaciones magnocelulares (Renaud y Bourque, 1991; Hantton, 1990), sin embargo durante la gestación y la lactancia la osmolaridad plasmática permanece constante o incluso disminuida en los animales gestantes, sin que este descenso de osmolaridad produzca inhibición del SHN (Koehler y col., 1993).

En nuestros experimentos, el marcaje inmunocitoquímico para IGF-I en el SHN de animales gestantes a término y sometidos a lactancia no mostraba diferencias respecto a los controles. En consonancia con los resultados inmunocitoquímicos, datos no publicados de nuestro laboratorio han mostrado una ausencia de variaciones en los niveles del ARNm de IGF-I y del IGF-I radioinmunoensayable hipotalámicos en dichas situaciones fisiológicas. Por otro lado, se observó una disminución del inmunomarcaje para AVP y OT en las neurohipófisis de los animales gestantes a término y lactantes comparados con los controles, como otros autores han descrito (Van Tol y col., 1988; Crowley y col., 1993). Estos resultados hacen pensar que los estímulos que activan la síntesis y liberación de OT durante la gestación y la lactancia no modifican la expresión de IGF-I-IR en el SHN. Por otra parte, como se expuso anteriormente, en ratas gestantes a término y sometidas a lactancia se incrementan los niveles de estrógenos (Crowley y col., 1993). En base a la regulación de la expresión de IGF-I por estrógenos en varios tejidos descrita por otros autores (Murphy y

Ghahary, 1990; Huff y col., 1988; Michels y col., 1993; Dueñas y col., 1993), se podría esperar un incremento de la inmunoreactividad para IGF-I en el SHN durante la gestación y la lactancia. En consonancia con nuestros resultados Michaels y col. (1993) describen importantes cambios en el sistema IGF-I (IGF-I, su receptores e IGF-BPs) en la adenohipófisis inducidos por estrógenos, sin encontrar cambios en la neurohipófisis.

2.2.2. Estrés provocado por inmovilización

Una serie de trabajos demuestran como durante la inmovilización, un tipo de estrés neurogénico, fundamentalmente se incrementa la liberación de OT a la circulación sanguínea (Gibbs, 1986; Miaskowski y col., 1988; Romero y col., 1993). Menos son los autores que describen cambios referentes a AVP durante inmovilización (De Goeij y col., 1991). Los anteriores estudios indican que la inmovilización produce una activación de las neuronas oxitocinérgicas, o al menos de su liberación.

Tras el procesamiento inmunocitoquímico para IGF-I no se observaron cambios aparentes ni en la distribución ni en la intensidad del marcaje comparando los animales estresados (15 min y 45 min) con los controles. Sin embargo, si se observó un incremento en la inmunoreactividad para la ACTH durante el estrés, en concordancia con estudios anteriores (Orr y col., 1990; Wu y Childs, 1991; Sasaki y col., 1990). La ausencia de cambios en el marcaje para IGF-I en el SHN durante la inmovilización sugiere que la expresión de IGF-I-IR en el SHN no es regulada por los mismos factores que inducen la activación de la liberación de OT durante el estrés causado por la inmovilización.

2.2.3. Deshidratación.

La hiperosmolaridad originada tras 24 horas de ingestión de agua salada (2% NaCl) indujo un incremento en la la expresión del péptido IGF-I y la de su ARNm, presentando el mismo patrón de colocalización con AVP y OT que el descrito tras la administración de colchicina. El hecho de que la coexistencia de IGF-I-IR con las neurohormonas sea equivalente durante deshidratación y administración de colchicina, hace pensar en alguna posible conexión entre en ambas situaciones. La administración icv de distintas dosis de colchicina origina un almacenamiento de las hormonas neurohipofisarias en los somas y axones del SHN al inhibir su transporte y liberación (Norström y Hansson, 1973; Norström y col., 1971; Parish y col., 1981; Peña y col., 1988). Altas dosis de colchicina causan importantes traumatismos locomotores (cuadriparalisis), así como alteraciones en los comportamientos de ingesta de bebida y alimentos (Norström y Hansson, 1973; Norström

y col., 1971; Parish y col., 1981; Peña y col., 1988; Dasheiff y Ramirez, 1985). Todo ello puede indicar que el incremento en IGF-I-IR en neuronas magnocelulares de ratas tratadas con colchicina descrito anteriormente podría reflejar, además de una inhibición del transporte axonal, una respuesta a la posible hiperosmolaridad originada por la deficiente toma de agua observada en estos animales.

Los cambios observados en la expresión de IGF-I parecen ser específicos del SHN, ya que los niveles de inmunoreactividad para IGF-I en la corteza cerebral y en el plasma no experimentaron alteraciones. El incremento del IGF-I hipotalámico junto con la ausencia de modificaciones en los niveles circulantes de IGF-I-IR durante la estimulación osmótica sugieren que IGF-I, más que una acción endocrina sistémica, ejerza una acción local paracrina o autocrina en la plasticidad o actividad del SHN. Los mecanismos por los cuales se incrementan los niveles de IGF-I (ARNm y péptido-IR) específicamente en el hipotálamo no han sido determinados en el presente estudio. Un incremento de la transcripción del gen de IGF-I parece ser el mecanismo más probable, aunque otros factores como un incremento de la estabilidad del ARNm o un aumento del procesamiento del pre-ARNm podrían contribuir al aumento del ARNm de IGF-I. Aunque tampoco puede descartarse una regulación a nivel de traducción, procesamiento postraduccional, degradación o secreción del péptido IGF-I. Basándonos en los resultados inmunocitoquímicos, es probable que la deshidratación estimule la síntesis de IGF-I en el SHN. Sin embargo, al no haber podido detectar el ARNm de IGF-I mediante técnicas de hibridación *in situ*, cabe la posibilidad que IGF-I-IR detectado sea sintetizado en otras áreas del hipotálamo y que este sea transportado a las neuronas magnocelulares. Aunque menos probable, también es posible que el IGF-I-IR visualizado por técnicas inmunocitoquímicas pudiera corresponder al péptido unido a sus receptores o a sus IGF-BPs.

En cuanto al ARNm de R-IGF-I, los animales deshidratados durante 24 horas no mostraron cambios. Sin embargo, tras seis días de deshidratación se encontró un incremento en la expresión del ARNm de R-IGF-I en neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico sin observarse cambios en el núcleo paraventricular. El hecho de que no evidenciáramos cambios tras deshidratación aguda indica que para que se afecte la transcripción de los receptores es necesario un mantenimiento prolongado del estímulo. Esto sugiere la posibilidad de que factores secundarios inducidos por la deshidratación sean los desencadenantes de las alteraciones del ARNm de R-IGF-I. En este sentido, el aumento de IGF-I observado durante la deshidratación aguda podría participar en la inducción de la expresión de sus propios receptores, como se ha descrito para otros factores tróficos (Fusco y col., 1991; Holtzman

y col., 1992; Nishizuka y Arai, 1992).

El incremento de la señal de hibridación tan sólo fue observada en el núcleo supraóptico, sin apreciarse cambios en el paraventricular. Una serie de trabajos evidencian una respuesta heterogénea del SHN ante estimulación osmótica (Burbach y col., 1984; Negro-Vilar y Samson, 1979). La ingestión de soluciones hipertónicas induce una mayor respuesta en la actividad metabólica y expresión de neurohormonas en neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico que las del núcleo paraventricular (Sherman y col., 1986; Lepetit y col., 1992; Roberts y col., 1993). Por otro lado, la hiperosmolaridad incrementa la incorporación de ^3H -citosina (George, 1973) y de ^3H -tirosina selectivamente en el núcleo supraóptico (Murray, 1967). La respuesta diferencial en la expresión de genes del SHN ante la estimulación osmótica revela una heterogeneidad funcional de las neuronas magnocelulares. Subpoblaciones magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular podrían reflejar diferencias en sus aferencias, específicas para distintos tipo de estimulación, siendo la estimulación osmótica una señal mas eficaz en el núcleo supraóptico (Meeker, 1991; Roberts y col., 1993). De este modo, la aparente ausencia de modificaciones en la expresión del ARNm del R-IGF-I en el núcleo paraventricular durante la deshidratación podría ser debida a pequeñas alteraciones por debajo del límite de detección o a una ausencia de respuesta.

El incremento en la expresión del ARNm del R-IGF-I en el núcleo supraóptico fue acompañado por un aumento en la intensidad de la inmunoreactividad para c-Fos en las mismas células. La detección inmunocitoquímica de la proteína c-Fos como marcador de actividad celular es una técnica muy útil en el estudio de sistemas neuroendocrinos (Hoffman y col., 1993; Sagar y col., 1988; Lafarga col., 1992). En el presente estudio, utilizamos dobles marcajes con técnicas inmunocitoquímica para c-Fos e hibridación *in situ* para el ARNm del R-IGF-I para identificar neuronas activadas durante la deshidratación que expresaban el gen de R-IGF-I. La colocalización de ambas moléculas indica que el gen de R-IGF-I se induce en neuronas magnocelulares activadas por la hiperosmolaridad. En el mecanismo de induccion de c-Fos en neuronas magnocelulares podría estar implicado el propio IGF-I hipotalámico, ya que se ha demostrado que este péptido es capaz de inducir la expresión del factor de transcripcion c-Fos en neuronas postmitóticas (Heidenreich y col., 1993).

Es bien conocido que el SNC adulto de los mamíferos posee una plasticidad estructural ante diversos estímulos fisiológicos. El sistema oxitocinérgico hipotalámico, y en menor medida el vasopresinérgico, ofrecen un buen ejemplo de sistemas neuronales con

potencialidad plástica en el adulto en respuesta a estímulos fisiológicos (Theodosis y Poulain, 1993; Marzban y col., 1992; Theodosis y Poulain, 1987; Perlmutter y col., 1985; Chapman y col., 1986; Dyball y Garten, 1988; Sánchez-Toscano y col., 1989). Bajo condiciones fisiológicas específicas, como son la deshidratación aguda y prolongada, se inducen modificaciones reversibles en las relaciones estructurales entre neuronas y células de glía, así como en la arquitectura de la circuitería sináptica de las neuronas magnocelulares hipotalámicas. El hecho de que IGF-I juegue un papel en el crecimiento y diferenciación de neuronas y células de glía en hipotálamo fetal en cultivo (Torres-Alemán y col., 1990a) junto con el incremento de la expresión de IGF-I y su localización con OT durante deshidratación, sugiere una posible participación de dicho péptido en el fenómeno de plasticidad inducida por hiperosmolaridad en el adulto.

Por otra parte, la estimulación osmótica activa el SHN induciendo un incremento en la síntesis y liberación de las hormonas neurohipofisarias, así como la de los péptidos que coexisten con ellas (Cunningham y Sawchenko 1991; Sherman y col., 1988; McCabe y col., 1990; Meister y col., 1990). Es posible que durante la deshidratación, el IGF-I hipotalámico inducido por la osmolaridad se una a sus receptores localizados en los núcleos supraóptico y paraventricular y actúe sobre la actividad del SHN de un modo paracrino o autocrino. El aumento de expresión de IGF-I podría reflejar una posible función moduladora sobre la acción de otros péptidos o neurotransmisores del SHN durante la estimulación osmótica.

3. INTERACCIONES DE IGF-I CON AVP EN EL SHN

El contenido de AVP en el hipotálamo y cerebro anterior fue similar en los cuatro grupos experimentales del experimento de administración icv de Ab-IGF-I (animales controles con Ab-IGF-I/NRS y deshidratados con Ab-IGF-I/NRS). La concentración de AVP en el hipotálamo y cerebro anterior de los grupos deshidratados durante 24 horas comparada con los controles no varió significativamente. Negro-Vilar y Samson (1979) tampoco encuentran diferencias en el contenido de AVP en estructuras hipotalámicas a los tres días de deshidratación. Es probable que durante las primeras horas de deshidratación el incremento de la síntesis de AVP (McCabe y col., 1990), se acompañe de un aumento en el transporte axonal y liberación de la hormona, de tal forma que no se aprecien cambios en el contenido del péptido. Tampoco se encontraron diferencias entre animales tratados con Ab-IGF-I con respecto a los tratados con NRS, indicando que la administración del antisuero no presentaba ninguna acción sobre el contenido de AVP en estas áreas.

En las neurohipófisis, tras 24h de estimulación osmótica, se apreció una reducción

en los niveles de AVP de los animales tratados con NRS que no fue estadísticamente significativa. Aunque son muchos los estudios que muestran una deplección de AVP y OT en la neurohipófisis durante deshidratación (Renaud y Bourque, 1991; Hantton, 1990; Cunningham y Sawchenko, 1991), en la mayoría de ellos emplean modelos de deshidratación crónica, manteniendo los animales sin agua períodos de hasta 7 días o con agua salada hasta 14 días. Nosotros mantuvimos los animales con agua salada únicamente 24 horas, tiempo suficiente para aumentar la síntesis y liberación de AVP (McCabe y col., 1990; Jones y Pickering, 1969), a pesar de que se ha descrito que la ingestión de agua salada es un estímulo menos potente que la privación de agua (Lepetit y col., 1992; Jones y Pickering, 1969). Es posible que en las 24 primeras horas de la deshidratación un aumento de liberación de AVP desde la neurohipófisis a la sangre este compensada con un aumento de la síntesis y transporte de AVP desde los somas magnocelulares hasta sus terminales en la neurohipófisis, sin aparentar cambios en la inmunoreactividad de AVP en el lóbulo posterior de la hipófisis.

Únicamente se encontraron cambios en el contenido de AVP en las neurohipófisis de ratas deshidratadas tratadas con Ab-IGF-I respecto a aquellas otras ratas controles tratadas con Ab-IGF-I. Estos resultados junto con la presencia de transcritos del ARNm del R-IGF-I en neuronas vasopresinérgicas sugiere una posible acción reguladora de IGF-I en la liberación de AVP durante la deshidratación. La disminución de la concentración de AVP en la neurohipófisis de los animales tratados podría significar, bien una disminución de la llegada de AVP desde el soma hasta sus terminales (reducción de la síntesis y transporte de AVP), o bien un aumento en la liberación de AVP a la circulación sistémica. Esta última hipótesis no pudimos verificarla ya que el antisuero que usamos para medir los niveles de AVP en los distintos tejidos no era capaz de reconocer la AVP circulante en plasma, probablemente debido a cambios estructurales de AVP en la sangre. Nosotros optamos por la segunda hipótesis en base a dos razonamientos. Por un lado, la mayoría de veces que se encuentra una disminución en la inmunoreactividad de las neurohormonas hipofisarias refleja un incremento de su liberación (Renaud y Bourque, 1991; Hantton, 1990; Cunningham y Sawchenko, 1991). Por otro, experimentos realizados con neurohipófisis *in vitro* han mostrado que insulina $3.3\mu\text{M}$ es capaz de inhibir la liberación de AVP estimulada por K^+ (Guzek y col., 1988), concentraciones tan altas de insulina probablemente estén actuando a través de los receptores de IGF-I. Si consideramos que i) la disminución de AVP en los animales deshidratados tratados con Ab-IGF-I refleja un aumento de su liberación y ii) la administración icv de Ab-IGF-I neutraliza la actividad biológica del IGF-I endógeno hipotalámico, los resultados obtenidos sugerirían que el IGF-I endógeno es capaz de inhibir

la liberación de AVP durante la deshidratación lo que estaría de acuerdo con lo descrito por Guzek y col. (1988). Si bien ha sido demostrado que anticuerpos administrados *in vivo* son capaces de penetrar en el parénquima nervioso, pudiéndose localizar hasta 24 horas después de su administración (Van der Zee y col., 1992; Burlet y col., 1987), quedaría por esclarecer el tipo de acción biológica que ejercen los anticuerpos administrados sobre IGF-I. Estudios anteriores de inmunización pasiva con antisueros contra IGF-I han mostrado, mayoritariamente la neutralización de la acción biológica de IGF-I (Bicsak y col., 1990; Russell y col., 1984; Gilhar y col., 1994), sin embargo, otros han indicado lo contrario, una la potenciación de la acción biológica de IGF-I (Stewart y col., 1993). Sin tener evidencias de si nuestros anticuerpos están bloqueando o bien potenciando la acción biológica del IGF-I hipotalámico, no podemos asegurar si el IGF-I endógeno está inhibiendo o estimulando la liberación de AVP durante la deshidratación.

Lo que sí podemos sugerir, en base a i) la localización del IGF-I hipotalámico, ii) la coexistencia de sus receptores en neuronas vasopresinérgicas, iii) la regulación de IGF-I y su receptor bajo distintas situaciones fisiológicas que afectan al sistema vasopresinérgico y iv) la posible acción de IGF-I sobre AVP, es que el IGF-I hipotalámico puede jugar un posible papel regulador paracrino o autocrino sobre la liberación de AVP durante estimulación del SHN *in vivo*. No podemos descartar una posible implicación de IGF-I en el sistema oxitocinérgico, así como en los fenómenos de plasticidad que se desarrollan en el SHN adulto. Estos resultados apoyan la idea de que diferentes condiciones fisiológicas pueden inducir la expresión de IGF-I en diferentes tipos celulares para llevar a cabo diferentes funciones.

CONCLUSIONES

- 1.- En SNC de rata adulta se detectó inmunoreactividad para IGF-I en cerebelo, hipotálamo y áreas corticales. El ARNm de IGF-I fue localizado fundamentalmente en áreas olfativas y cerebelo. Los transcritos de R-IGF-I se encontraron principalmente en bulbo olfativo, áreas corticales, cerebelo, hipotálamo y órganos circunventriculares.
- 2.- Las células de Purkinje del cerebelo de rata presentaban IGF-I-IR y los ARNm de IGF-I y de su receptor. La localización subcelular de IGF-I-IR junto con la presencia de transcritos de IGF-I y de R-IGF-I en células de Purkinje sugiere que IGF-I pueda actuar autocrina o paracrinamente sobre las mismas neuronas que sintetizan el péptido. En cerebelo humano se detectó un intenso inmunomarcaje para IGF-I en subpoblaciones de células de Purkinje, coexistiendo en ocasiones con LNGFR.
- 3.- El SHN de rata presentó un intenso inmunomarcaje para IGF-I tras administración icv de colchicina. La inmunoreactividad para IGF-I se localizó en orgánulos implicados en la secreción proteica de neuronas magnocelulares, coexistiendo principalmente con OT. Los núcleos magnocelulares paraventricular y supraóptico también contenían ARNm de R-IGF-I, sugiriendo una posible acción local del IGF-I hipotalámico sobre estos núcleos.
- 4.- La administración icv de colchicina incrementó el inmunomarcaje para IGF-I en neuronas no piramidales neocorticales y provocó la expresión de IGF-I-IR en el complejo hipocampal, sin que se detectara IGF-I-IR en ninguna otra área del SNC. El ARNm de IGF-I se localizó en bulbo olfativo y corteza piriforme. A diferencia de la restringida localización del péptido IGF-I y su ARNm en el SNC, los transcritos de R-IGF-I se encontraron ampliamente distribuidos tanto en el SNC como en la hipófisis, pudiendo ser dianas tanto del IGF-I sistémico como del endógeno.

- 5.- En situaciones de disminución de la secreción de GH (envejecimiento y diabetes) se originaron modificaciones en el patrón de inmunoreactividad para IGF-I en el SHN y adenohipófisis. Durante el envejecimiento se observó un incremento de IGF-I-IR en fibras nerviosas de la ziEM. En ratas diabéticas se detectó un aumento de inmunoreactividad para IGF-I en neuronas magnocelulares hipotalámicas y células adenohipofisarias, sin que otros neuropéptidos hipotalámicos presentaran cambios. Las alteraciones observadas en el patrón de marcaje para IGF-I en el envejecimiento y la diabetes podrían contribuir a la disminución de la secreción de GH descrita en dichas situaciones.
- 6.- Animales sometidos a deshidratación aguda presentaron un incremento en los niveles de IGF-I-IR en el SHN acompañado de un aumento de la expresión del ARNm del IGF-I hipotalámico. Una estimulación osmótica prolongada incrementó la acumulación del ARNm de R-IGF-I en neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico. Otros estímulos del SHN, como son preñez, lactancia y estrés, no provocaron variaciones en los niveles de IGF-I.
- 7.- La localización del ARNm de R-IGF-I en neuronas vasopresinérgicas junto al hecho de que la administración icv de anticuerpos α -IGF-I causó una disminución en los niveles de AVP neurohipofisario durante deshidratación sugieren una posible acción local de IGF-I en la liberación de AVP durante la estimulación del SHN *in vivo*.

REFERENCIAS

- Abraham GE, Gover PK. 1991. Covalent linkage of hormonal haptens to protein carriers for use in radioimmunoassay. En: Principles of Competitive Protein-Binding Assays. Odell WD, Daughaday WH (eds). Lippincott, Philadelphia, 1991, p 134.
- Adamo M, Werener H, Farnsworth W, Roberts CT, Raizada M, LeRoith D. 1988. Dexamethasone reduce steady state insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels in rat neuronal and glial cells in primary culture. *Endocrinology* 123:2526-2570.
- Adamo ML, Ben-Hur H, Roberts CT, LeRoith D. 1991a. The rat IGF-I gene: structure, expression and regulation. En: Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors. Spencer EM (ed). Elsevier, pp 681-688.
- Adamo ML, Bach MA, Roberts CT, LeRoith D. 1991b. Regulation of insulin, IGF-I, and IGF-II gene expression. En: Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects. LeRoith, D. (ed), CRC Press Boca Raton, pp 271-303.
- Adamo ML, Lanau, Neuenschwander S, Werner H, LeRoith D, Roberts CT. 1993. Distinct promoters in the rat insulin-like growth factor I (IGF-I) gene are active in CHO cells. *Endocrinology* 132:935-937.
- Adem A, Jossan SS, d'Argy R, Gillberg PG, Nordberg A, Winblad B, Sara V. 1989. Insulin-like growth factor (IGF-I) receptors in the human brain: quantitative autoradiographic localization. *Brain Res* 503:299-303.
- Aguado F, Sánchez-Franco F, Cacicedo L, Fernández T, Rodrigo J, Martínez-Murillo R. 1992a. Subcellular localization of insulin-like growth factor I (IGF-I) in Purkinje cells of the adult rat: an immunocytochemical study. *Neurosci Lett* 135:171-174.
- Aguado F, Fernández T, Martínez-Murillo R, Rodrigo J, Cacicedo L, Sánchez-Franco F. 1992b. Immunocytochemical localization of insulin-like growth factor I in the hypothalamo-hypophyseal system of the rat. *Neuroendocrinology* 56:856-863.
- Aguado F, Rodrigo J, Cacicedo L, Mellström B. 1993. Distribution of insulin-like growth factor I receptor mRNA in rat brain. Regulation in the hypothalamo-neurohypophyseal system. *J Mol Endocrinol* 11:231-239.
- Aguado F, Sánchez-Franco F, Rodrigo J, Cacicedo L, Martínez-Murillo R. 1994. Insulin-like growth factor I immunoreactive peptide in adult human cerebellar Purkinje cells. Colocalization with low-affinity nerve growth factor receptor. *Neuroscience* 59:641-650.
- Aizenman Y, de Vellis J. 1987. Brain neurons develop in a serum and glial free environment: effects of transferrin, insulin, insulin-like growth factor I and thyroid hormone on neuronal survival, growth and differentiation. *Brain Res* 406:32-42.

- Akaishi T, Homma S. 1992. Hypothalamic osmoregulation for vasopressin release in streptozotocin-diabetic rats *in vivo* and *in vitro*. *Brain Res* 569:86-92.
- Altszuler N, Hampshire J. 1981. Oxytocin infusions increases plasma insulin and glucagon levels and glucose production and uptake in the normal dog. *Diabetes* 30:112-114.
- Andersson IK, Edwall D, Norstedt G, Rozell B, Skottner A, Hansson HA. 1988. Differing expression of insulin-like growth factor I in the developing and in the adult rat cerebellum. *Acta Physiol Scand* 132:167-173.
- Andersson GL, Ericson LE, Jennische E. 1990. Ultrastructural localization of IGF-I in the rat kidney; an immunocytochemical study. *Histochemistry* 94:263-267.
- Ang LC, Bhaumick B, Juurlink BHJ. 1993. Neurite promoting activity of insulin, insulin-like growth factor I and nerve growth factor on spinal motoneurons is astrocyte dependent. *Dev Brain Res* 74:83-88.
- Araujo DM, Lapchak PA, Collier B, Chabot JG, Quirion R. 1989. Insulin-like growth factor I (somatomedin C) receptors in the rat brain: Distribution and interaction with the hippocampal cholinergic system. *Brain Res* 484:130-138.
- Bach MA, Werner H, Bondy C, LeRoith D, Roberts CT. 1991a. Regulation of type I IGF-I receptor gene expression. En: *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors*. Spencer EM (ed). Elsevier, pp 671-679.
- Bach MA, Shen-Orr Z, Lowe WL, Roberts CT, LeRoith D. 1991b. Insulin-like growth factor I mRNA levels are developmentally regulated in specific regions of the rat brain. *Mol Brain Res* 10:43-48.
- Bach MA, Bondy CA. 1992. Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131:2588-2594.
- Bach LA, Tseng LYH, Swartz JE, Rechler MM. 1993. Rat PC12 pheochromocytoma cells synthesize insulin-like growth factor-binding protein 6. *Endocrinology* 133:990-995.
- Baker J, Liu JP, Robertson EJ, Efstratiadis. 1993. Role Of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. *Cell* 75:73-82.
- Bale LK, Conover CA. 1992. Regulation of insulin-like growth factor binding protein-3 messenger ribonucleic acid expression by insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 131:608-614.
- Ballotti R, Nielsen FC, Pringle N, Kowalski A, Richardson WD, van Obberghen E, Gammeltoft S. 1987. Insulin-like growth factor I in cultured rat astrocytes: expression of the gen, and receptor tyrosine kinase. *EMBO J* 6:3633-3639.

- Barnea A, Cho G. 1993a. Basic fibroblast growth factor selectively amplifies the functional state of neurons producing neuropeptide Y but not somatostatin in cultures of fetal brain cells: evidence for a cooperative interaction with insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 133:1895-1898.
- Barnea A, Cramer O, Cho G. 1993b. Truncated insulin-like growth factor I: a potent inducer of neuropeptide Y production by aggregate cultures of fetal brain cells. *Endocrine J* 1:11-17
- Baron-Van Evercooren A, Olichon-Berthe C, Kowalski A, Visciano G, Van Obberghen E. 1991. Expression of IGF-I and insulin receptor genes in the rat central nervous system: a developmental, regional and cellular analysis. *J Neurosci Res* 28:244-253.
- Bartlett WP, Li XS, Williams M, Benkovic. 1991a. Localization of insulin-like growth factor I mRNA in murine central nervous system during postnatal development. *Dev Biol* 147:239-250.
- Bartlett WP, Li XS, Williams M. 1991b. Expression IGF-I mRNA in murine subventricular zone during postnatal development. *Mol Brain Res* 12:285-291.
- Baskin DG, Wilcox B, Figlewicz DP, Dorsa DM. 1988. Insulin and insulin-like growth factors in the CNS. *TINS* 11:107-111.
- Baskin DC, Schwartz MW, Sipols AJ, D'Alessio DA, Goldstein BJ, White MF. 1994. Insulin receptor substrate-1 (IRS-1) expression in rat brain. *Endocrinology* 134:1952-1955.
- Bassas L, Girbau M, Lesniak MA, Roth J, de Pablo F. 1989. Development of receptors for insulin and insulin-like growth factor I in head and brain of chick embryos: autoradiographic localization. *Endocrinology* 125:2320-2327.
- Baxter RC. 1991. Physiological roles of IGF binding proteins. En: *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors*. Spencer EM (ed). Elsevier, pp 371-380.
- Beck KD, Knüsel B, Hefti F. 1993. The nature of the trophic action of brain-derived neurotrophic factor, des(1-3)-insulin-like growth factor I, and basic fibroblast growth factor on mesencephalic dopaminergic neurons developing in culture. *Neuroscience* 52:855-866.
- Beilharz EJ, Klempt ND, Klempt M, Sirimanne E, Dragunow M, Gluckman PD. 1993. Differential expression of insulin-like growth factor binding proteins (IGFBP) 4 and 5 mRNA in the rat brain after transient hypoxic-ischemic injury. *Mol Brain Res* 18:209-215.
- Bennet-Clarke C, Romagnano MA, Joseph SA. 1980. Distribution of somatostatin in the rat

- brain: telencephalon and diencephalon. *Brain Res* 188:473-486.
- Berelowitz M, Szabo M, Frohman LA, Firestone S, Chu L, Hintz RL. 1981. Somatomedin-C mediates growth hormone negative feed-back by effects on both the hypothalamus and the pituitary. *Science* 212:1279-1281.
- Bergland RM, Page RB. 1979. Pituitary-brain vascular relations: A new paradigm. *Science* 204:18-24.
- Binoux M, Hossenlopp P, Lassarre C, Hardouin N. 1981. Production of insulin-like growth factors and their carrier by rat pituitary gland and brain explants in culture. *FEBS LETT* 124:178-184.
- Binoux M, Faivre-Bauman A, Lassarre C, Barret A, Tixier-Vidal A. 1985. Triiodothyronine stimulates the production of insulin-like growth factor (IGF) by fetal hypothalamus cells cultured in serum-free medium. *Dev Brain Res* 21:319-321.
- Bohannon NJ, Figlewicz DP, Corp ES, Wilcox J, Porte D, Baskin DG. 1986. Identification of binding sites for an insulin-like growth factor (IGF-I) in the median eminence of the rat brain by quantitative autoradiography. *Endocrinology* 119:943-945.
- Bohannon NJ, Corp ES, Wilcox BJ, Figlewicz DP, Dorsa DM, Baskin DG. 1988. Characterization of insulin-like growth factor I receptors in the median eminence of the brain and their modulation by food restriction. *Endocrinology* 122:1940-1947.
- Bolander FF. 1989a. Molecular Evolution of the Endocrine system, en *Molecular Endocrinology*, pp 261-289, Academic Press, Inc.
- Bolander FF. 1989b. Membrane receptors. En: *Molecular Endocrinology*. Academic Press, Inc, pp 90-117.
- Bondy CA. 1991. Transient IGF-I gene expression during the maturation of functionally related central projection neurons. *J Neurosci* 11:3442-3455.
- Bondy C, Werner H, Roberts CT, LeRoith D. 1992. Cellular pattern of type-I insulin-like growth factor receptor gene expression during maturation of the rat brain: comparison with insulin-like growth factors I and II. *Neuroscience* 46:909-923.
- Bondy CA, Lee WH. 1993. Patterns of IGF system gene expression in the CNS: Functional implications. En: *The Role of Insulin-like Growth Factors in the Nervous System*. Raizada MK y LeRoith D (Eds), *Ann NY Acad Sci* 692:33-43.
- Bondy CA. 1994. Clinical uses of insulin-like growth factor I. *Annals Inter Med* 120:593-610.

- Brar AK, Chernauek SD. 1993. Localization of insulin-like growth factor binding protein 4 expression in the developing and adult rat brain: analysis by *in situ* hybridization. *J Neurosci Res* 35:103-114.
- Brass BJ, Nonner D, Barret JN. 1992. Differential effects of insulin on choline acetyltransferase and glutamic acid decarboxylase activities in neuron-rich striatum cultures. *J Neurochem* 59:415-424.
- Brazeau P, Ling N, Böhlen P, Esch F, Ying SY, Guillemin R. 1982. Growth hormone releasing factor, somatocrinin releases pituitary growth hormone in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:7909-7913.
- Broadwell RD, Bleier R. 1977. Cytoarchitectonic atlas of the mouse hypothalamus. *J Comp Neurol* 167:315-340.
- Brooks DP, Nutting DF, Crofton JT, Share L. 1989. Vasopressin in rats with genetic and streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 38:54-57.
- Buma P, Nieuwenhuys. 1988. Ultrastructural characterization of exocytotic release sites in different layers of the median eminence of the rat. *Cell Tissue Res* 252:107-114.
- Burbach JPH, De Hoop MJ, Schmale H, Richter D, DeKloet ER, Ten Haaf JA, De Wied D. 1984. Differential responses to osmotic stress of vasopressin-neurophysin mRNA in hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology* 39:582-584.
- Burgess SK, Jacobs S, Cuatrecasas P, Sahyoun N. 1987. Characterization of a neuronal subtype of insulin-like growth factor I receptor. *J Biol Chem* 262:1618-1622.
- Burlet AJ, Leon-Henri BP, Robert FR, Arahmani A, Fernet BML, Burlet CR. 1987. Monoclonal anti-vasopressin (VP) antibodies penetrate into VP neurons, *in vivo*. *Exp Brain Res* 65:629-638.
- Caldwell JD, Greer ER, Johnson MF, Prange AJ, Pederson CA. 1987. Oxytocin and vasopressin immunoreactivity in hypothalamic and extrahypothalamic sites in late pregnancy and postpartum rats. *Neuroendocrinology* 46:39-47.
- Canalis E, Pash J, Gabbitas B, Rydzziel S, Varghese S. 1993. Growth factors regulate the synthesis of insulin-like growth factor I in bone cell cultures. *Endocrinology* 133:33-38.
- Carlsson-Skiwirut C, Jörnvall H, Holmgren A, Andesson C, Bergman T, Lundquist G, Sjögren B, Sara VR. 1986. Isolation and characterization of variant IGF-I as well as IGF-II from adult human brain. *FEBS* 201:46-50.
- Caroni P, Grandes P. 1990. Nerve sprouting in innervated adult skeletal muscle induced by

- exposure to elevated levels of insulin-like growth factors. *J Cell Biol* 110:1307-1313.
- Caroni P, Becker M. 1992. The downregulation of growth-associated proteins in motoneurons at the onset of synapse elimination is controlled by muscle activity and IGF-I. *J Neurosci* 12:3849-3861.
- Carson MJ, Behringer RR, Brinster RL, McMorris FA. 1993. Insulin-like growth factor I increases brain growth and central nervous system myelination in transgenic mice. *Neuron* 10:729-740.
- Castro-Alamancos MA, Torres-Alemán I. 1993. Long-term depression of glutamate-induced GABA release in cerebellum by insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:7386-7390.
- Catanese VM, Sciavolino PJ, Lango MN. 1993. Discordant, organ-specific regulation of insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid in insulin-deficient diabetes in rats. *Endocrinology* 132:496-503
- Ceda GP, Davis RG, Rosenfeld RG, Hoffman AR. 1987. The growth hormone (GH)-releasing hormone (GHRH)-GH-somatomedin axis: Evidence for rapid inhibition of GHRH-elicited GH release by insulin-like growth factors I and II. *Endocrinology* 120:1658-1662.
- Chapman DB, Theodosis DT, Montagnese C. 1986. Osmotic stimulation causes structural plasticity of neurone-glia relationships of the oxytocin but not vasopressin secreting neurones in the hypothalamic supraoptic nucleus. *Neuroscience* 17:679-686.
- Chin E, Zhou J, Bondy CA. 1992. Anatomical relationships in the pattern of IGF-I, IGFBP-1 and IGF-I receptor gene expression in the rat kidney. *Endocrinology* 130:3237-3245.
- Chiodera P, Volpi R, Capretti L, Speroni G, Marcato A, Rossi G, Coiro V. 1992. Hypoglycemia-induced arginine vasopressine and oxytocin release is mediated by glucoreceptors located inside the blood-brain barrier. *Neuroendocrinology* 55:655-659.
- Cohen P, Ocran I, Fielder PJ, Neely EK, Gargosky SE, Deal CI, Ceda GP, Youngman O, Pham H, Lamson G, Giudice LC, Rosenfeld RG. 1992. Insulin-like growth factors (IGFs): implications for aging. *Psychoneuroendocrinology* 14:335-342.
- Chuang LM, Myers MG, Seidner GA, Birnbaum MJ, White MF, Kahn CR. 1993. Insulin receptor substrate 1 mediates insulin and insulin-like growth factor I-stimulated maturation of *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5172-5175.
- Clemmons DR. 1991. Insulin-like growth factor binding protein. En: *Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*, LeRoith, D. (ed), CRC Press Boca Raton,

pp. 151-179.

- Clemmons DR, Camacho-Hubner C, Jones JJ, McCusker RH, Busby WH. 1992. Insulin-like growth factor binding proteins: Mechanism of action at the cellular level. En: *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors*. Spencer EM (ed). Elsevier. pp 475-486.
- Conover Ca, Baker BK, Hintz RL. 1989. Cultured human fibroblasts secrete insulin-like growth factor IA prohormone. *J Clin Endocrinol Metab* 69:25.
- Coons A. 1958. Fluorescent antibody methods. En: *General Cytochemical Methods*. Danielli JF (ed). New York, Academic Press, pp 399-422.
- Crowley WR, Armstrong WE. 1992. Neurochemical regulation of oxytocin secretion in lactation. *Endocr Rev* 13:33-65.
- Crowley RS, Insel TR, O'keefe JA, Amico JA. 1993. Cytoplasmatic oxytocin and vasopressin gene transcripts decline postpartum in the hypothalamus of the lactating rat. *Endocrinology* 133:2704-2710.
- Cunningham ET, Sawchenko PE. 1991. Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *TINS* 14:406-411.
- Curran T, Morgan JJ. 1985. Superinduction of c-fos by nerve growth factor in the presence of peripherally action of benzodiazepines. *Science* 229:1265-1268.
- Dasheiff RM, Ramirez LF. 1985. The effects of colchicine in mammalian brain from rodents to rhesus monkeys. *Brain Res Rev* 10:47-67.
- Daughaday WH, Hall K, Raben MS, Salmon WDJ, Van den Brande JL, Van Wyk JJ. 1972. Somatomedin: a proposed designation for the "sulfation factor". *Nature* 235, 107.
- Daughaday WH, Rotwein P. 1989. Insulin-like growth factor I and II. Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum, and tissues concentration. *Endocrine Rev* 10:68-91.
- DeGennaro CV, Zoli M, Cocchi D, Maggi A, Marrama P, Agnati LF, Müller EE. 1989. Reduced growth hormone releasing factor (GHRF)-like immunoreactivity and GHRF gene expression in the hypothalamus of aged rats. *Peptides* 10:705-708.
- de Pablo F, Scott LA, Roth J. 1990. Insulin and insulin-like growth factor I in early development: peptides, receptors and biological events. *Endocri Rev* 11:558-577.
- D'Ercole AJ, Stiles AD, Underwood LE. 1984. Tissue concentrations of somatomedin C: further evidence for multiple sites of synthesis and paracrine or autocrine mechanisms of action. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 81:935-939.

- D'Ercole AJ. 1991. The insulin-like growth factors and fetal growth. EN: Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors. Spencer EM (ed). Elsevier. pp:9-23.
- Descartes, R. 1669. L'Homme. Le Gras, J. (ed), Paris.
- Deslauriers N, Gaudreau P, Abribat T, Renier G, Petitcherc D, Brazeau P. 1991. Dynamics of growth hormone responsiveness to growth hormone releasing factor in aging rats: peripheral and central influences. *Neuroendocrinology* 53:439-446.
- Devaskar SU, Giddings SJ, Rajakumar PA, Carnaghi LR, Menon RK, Zahm DS. 1994. Insulin gene expression and insulin synthesis in mammalian neuronal cells. *J Biol Chem* 269:8445-8454.
- DiCicco-Bloom E, Black IB. 1988. Insulin growth factors regulate the mitotic cycle in cultured rat sympathetic neuroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:4066-4070.
- Dogterom J, van Wimersam TB, Swaab DF. 1977. Evidence for the release of vasopressin and oxytocin into cerebrospinal fluid: measurements in plasma and CSF of intact and hypophysectomized rats. *Neuroendocrinology* 24:108-118.
- Dorsa DM, Bottemiller L. 1982. Age-related changes of vasopressin content of microdissected areas of the rat brain. *Brain Res* 242:151-156.
- Dorsa DM, Wilkinson CW. 1988. Regulation of neuropeptides in aging, En: *Peptide Hormones: Effects and Mechanisms of Action*. Vol I. Negro-Vilar A, Conn PM (eds). CRC Press., pp 69-140.
- Dringen R, Hamprecht B. 1992. Glucose, Insulin, and insulin-like growth factor I regulate the glycogen content of astroglia-rich primary cultures. *J Neurochem* 58:511-517.
- Drop SLS, Brinkaman A, Kortleve DJ, Groffen CAH, Schuller A, Zwarthoff EC. 1991. The evolution of the insulin-like growth factor binding proteins family. En: *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors*. Spencer EM (ed). Elsevier. pp 311-328.
- Dueñas M, Luquin S, García-Estrada J, Torres-Alemán I, García-Segura LM. 1993. Gonadal hormone regulation of insulin-like growth factor-I immunoreactive astroglia in the hypothalamus. 16th Annual Meeting of the European Neuroscience Association. Madrid. pp 11.
- Duffy KR, Pardridge WM, Rosenfeld RG. 1988. Human blood-brain barrier insulin-like growth factor receptor. *Metabolism* 37:136-140.
- Dyball REJ, Garten LL. 1988. Stimulus-related changes in the dendrites of magnocellular neurones. *Brain Res Bull* 20:675-680.

- Edwall D, Schalling M, Jennische E, Norstedt G. 1989. Induction of insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid during regeneration of rat skeletal muscle. *Endocrinology* 124:820-825.
- Ekström PAR, Edlath M, Edström A. 1993. Time-dependent effects of insulin on Schwann cell proliferation in the *in vitro* regenerating adult frog sciatic nerve. *J Neurosci Res* 34:614-621.
- Fagin JA, Brown A, Melmed S. 1988. Regulation of pituitary insulin-like growth factor-I messenger ribonucleic acid levels in rats harboring somatomammotropic tumors: implications for growth hormone autoregulation. *Endocrinology* 122:2204-2210.
- Fagin JA, Roberts CT, LeRoith JrD, Brown AT. 1989. Coordinate decrease of tissue insulin-like growth factor I posttranscriptional alternative mRNA transcripts in Diabetes Mellitus. *Diabetes* 38:428-434.
- Fan J, Molina PE, Gelato MC, Lang CH. 1994. Differential tissue regulation of insulin-like growth factor I content and binding proteins after endotoxin. *Endocrinology* 134:1685-1692.
- Fernstrom JD, Fernstrom MH, Kwok RPS. 1990. *In vivo* somatostatin, vasopressin, and oxytocin synthesis in diabetic rat hypothalamus. *Am J Physiol (Endocrinol Metab)* 21, 258:E661-E666.
- Fernyhough P, Mill J, Roberts J, Ishii D. 1989. Stabilization of tubulin mRNA by insulin and insulin-like growth factor I during neurite formation. *Mol Brain Res* 6:109-120.
- Fernyhough P, Willars GB, Lindsay RM, Tomlinson DR. 1993. Insulin and insulin-like growth factor enhance regeneration in cultured adult rat sensory neurones. *Brain Res* 607:117-124.
- Fliers E, Swaab DF. 1983. Activation of vasopressinergic and oxytocinergic neurons during aging in the Wistar rat. *Peptides* 4:165-170.
- Fliers E, Swaab DF. 1986. Neuropeptide changes in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Brain Research* 70:141-152.
- Fotheringham AP, Davidson YS, Davies I, Morris JA. 1991. Age-associated changes in neuroaxonal transport in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the mouse. *Mech Ageing Dev* 60:113-121.
- Foyt HL, Roberts CT. 1991. The IGF-I gene: structure, expression and gene products. En: *Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*, LeRoith, D. (ed), CRC Press Boca Raton, pp. 1-16.

- Frank HJL, Padridge WM, Morris WL, Rosenfeld RG, Choi TB. 1986. Binding and internalization of insulin and insulin-like growth factors by isolated brain microvessels. *Diabetes* 35:654-661.
- Frödin M, Gammeltoft S. 1994. Insulin-like growth factors acts synergistically with basic fibroblast growth factor and nerve growth factor to promote chromaffin cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:1771-1775.
- Froesch E, Burgi H, Ramseier E, Bally P, Labhart A. 1963. Antibody-suppressible and non-suppressible insulin-like activities in human serum and their physiologic significance. *J. Clin. Invest.* 42:1816-1834.
- Froesch ER, Schmid C, Schwander J, Zapf J. 1985. Actions of insulin-like growth factors. *Ann. Rev. Physiol.* 47:443-467.
- Froesch ER. 1993. IGFs: function and clinical importance. *J Internal Med* 234:533-534.
- Fryklund L, Skottner A, Sievertsson H, Hall K. 1976. Somatomedins A and B: isolation, chemistry and in vivo effects. *En Growth Hormone and Related Peptides, Excerpta Medica, Amsterdam*, pp 156-168.
- Fusco M, Polato P, Vantini G, Cavicchioli L, Bentivoglio M, Leon A. 1991. Nerve growth factor differentially modulates the expression of its receptor within the CNS. *J Comp Neurol* 312:477-491.
- Gammeltoft S, Haselbacher GK, Humbel RE, Fehlmann M, van Obberghen E. 1985. Two types of receptor for insulin-like growth factors in mammalian brain. *EMBO* 4:3407-3412.
- García-Estrada J, García-Segura LM, Torres-Alemán. 1992. Expression of insulin-like growth factor I by astrocytes in response to injury. *Brain Res* 592:343-347.
- García-Segura LM, Pérez J, Pons S, Rejas MT, Torres-Alemán I. 1991. Localization of insulin-like growth factor I (IGF-I)-like immunoreactivity in the developing and adult rat brain. *Brain Res* 560:167-174.
- Geary ES, Rosenfeld RG, Hoffman AR. 1988. Insulin-like growth factor I is internalized after binding to the type I insulin-like growth factor receptor. *Horm Metabol Res* 21:1-3.
- George JM. 1973. Localization in hypothalamus of increased incorporation of ³H-cytidine into RNA in response to oral hypertonic saline. *Endocrinology* 92:1550-1555.
- Gibbs DM. 1986. Vasopressin and oxytocin: hypothalamic modulators of the stress response: a review. *Psychoneuroendocrinology* 11:131-140

- Gilhar A, Ish-Shalom S, Pillar T, Etzioni A, Silbermann M. 1994. Effect of antiinsulin-like growth factor 1 on epidermal proliferation of human skin transplanted onto nude mice treated with growth hormone. *Endocrinology* 134:229-232.
- Gilmour RS. 1994. The implications of insulin-like growth factor mRNA heterogeneity. *J Endocrinol* 140:1-3.
- Glazner GW, Lupien S, Miller JA, Ishii DN. 1993. Insulin-like growth factor II increases the rate of sciatic nerve regeneration in rats. *Neuroscience* 54:791-797.
- Gluckman P, Klempt N, Guan J, Mallard C, Sirimanne E, Dragunow M, Klempt M, Singh K, Williams C, Nikolics K. 1992. A role for IGF-I in the rescue of CNS neurons following hypoxic-ischemic injury. *Biochem Biophys Res Commun* 182:593-599.
- Goldschmidt RB, Steward O. 1982. Neurotoxic effects of colchicine: differential susceptibility of CNS neuronal populations. *Neuroscience* 7:695-714.
- Gonzalez C, Jolin T. 1985. Effect of streptozotocin diabetes and insulin replacement on growth hormone in rats. *J Endocrinol Invest* 8:7-11.
- Goodyer CG, De Stéphano L, Lai WH, Guyda HJ, Posner BI. 1982. Characterization of insulin-like growth factor receptors in rat anterior pituitary, hypothalamus, and brain. *Endocrinology* 114:1187-1195.
- Goodyer CG, Marcovitz S, Hardy J, Lefebvre Y, Guyda HJ, Posner BI. 1986. Effect of insulin-like growth factor on human foetal, adult normal and tumour pituitary function in tissue culture. *Acta Endocrinol* 112, 49-57.
- Green BN, Jones SB, Streck RD, Wood TL, rotwein P, Pintar JE. 1994. Distinct expression patterns of insulin-like growth factor binding proteins 2 and 5 during fetal and postnatal development. *Endocrinology* 134:954-962.
- Greenwood FC, Hunter WM, Glover JS. 1963. The preparation of ¹²⁵I-labelled growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem J* 89:114-123.
- Guzek JW, Lewandowska A, Stempniak B. 1988. Insulin and release of neurohypophyseal hormones: *in vivo* and *in vitro* studies. *Exp Clin Endocrinol* 92:43-50.
- Hall K. 1972. Human somatomedin: determination, occurrence, biological activity and purification. *Acta Endocrinol* 163 (suppl.), 1-45.
- Hansson HA, Rozell B, Skottner A. 1987. Rapid axoplasmic transport of insulin-like growth factor I in the sciatic nerve of adult rats. *Cell Tissue Res* 247:241-247
- Hansson HA, Dahlin LB, Löwenadler B, Lundborg G, Paleus S, Skottner A. 1988a.

- Transient increase in insulin-like growth factor I immunoreactivity in rat peripheral nerves exposed to vibrations. *Acta Physiol Scand* 132:35-41.
- Hansson HA, Nilsson A, Isgaard J, Billig H, Isaksson O, Skottner A, Andersson IK, Rozell B. 1988b. Immunohistochemical localization of insulin-like growth factor I in the adult rat. *Histochemistry* 89:403-410.
- Hantton GI. 1990. Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Progr Neurobiol* 34:437-504.
- Haselbacher GK, Humbel RE. 1982. Evidence for two species of insulin-like growth factor II (IGF-II and "big" IGF-II) in human spinal fluid. *Endocrinology* 110:1822-1824.
- Haselbacher G, Groscurth P, Otten U, Vedder H, Lutz U, Sonderegger P, Bulatko A, Greeff N, Humbel R. 1989. Long-term cultivation of cryopreserved human fetal brain cells in a chemically defined medium. *J Neurosci Meth* 30:121-131.
- Heidenreich KA, Freidenberg GR, Figlewicz DP, Gilmore PR. 1986. Evidence for a subtype of insulin-like growth factor I receptor in brain. *Regul Pep* 15:301-310.
- Heidenreich KA. 1991. Insulin in the brain. What is its role?. *TEM* January/February:9-12.
- Heidenreich KM, Zeppelin T, Robinson LJ. 1993. Insulin and insulin-like growth factor I induce c-fos expression in postmitotic neurons by a protein kinase C-dependent pathway. *J Biol Chem* 268:14663-14670.
- Hems DA, Whitton PD, Ma GY. 1975. Metabolic actions of vasopressin, glucagon and adrenalin in the intact rat. *Biochem Biophys Acta* 411:155-164.
- Hepler JE, Lund PK. 1990. Molecular biology of the insulin-like growth factors. Relevance to nervous system function. *Mol Neurobiol* 93-127.
- Higuchi T, Tadokoro Y, Honda K, Negoro H. 1986. Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol* 110:251-256.
- Hiney JK, Ojeda SR, Les Dees W. 1991. Insulin-like growth factor I: A possible metabolic signal involved in the regulation of female puberty. *Neuroendocrinology* 54:420-423.
- Hirschberg R. 1993. IGF-I and the kidney. *J Lab Clin Med* 122:636-638.
- Hoffman GE, Sladek JR. 1980. Age-related changes in dopamine, LHRH and somatostatin in the rat hypothalamus. *Neurobiol Aging* 1:27-37.
- Hoffman GE, Phelps CJ, Khachaturian H, Sladek JR. 1986. Neuroendocrine projections to the median eminence. En: *Current Topics in Neuroendocrinol* vol 7. Ganten D, Pfaff

- D (eds), pp 161-196.
- Hoffman GE, Smith MS, Verbalis JG. 1993. c-Fos and related immediate early gene products as markers of activity in neuroendocrine systems. *Frontiers in Neuroendocrinology* 14:173-213.
- Hökfelt T. 1991. Neuropeptides in perspective: The last ten years. *Neuron* 7, 867-879.
- Holmes MC, Antoni FA, Aguilera G, Catt KJ. 1986. Magnocellular axons in passage through the median eminence release vasopressin. *Nature* 319:326-329.
- Holtzman DM, Li Y, Parada LF, Kinsman S, Chen CK, Valletta JS, Zhou J, Long JB, Mobley WC. 1992. p140trk mRNA marks NGF-responsive forebrain neurons: evidence that trk gene expression is induced by NGF. *Neuron* 9:465-478.
- Hovis JG, Teasdale RM, Albrecht BN, Yorek MA, Lowe WL. 1993. Intracellular calcium regulates insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 132:1931-1938.
- Hsu D, Knudson PE, Zapf A, Rolband GC, Olefsky JM. 1994. NPXY motif in the insulin-like growth factor I receptor is required for efficient ligand-mediated receptor internalization and biological signaling. *Endocrinology* 134:744-750.
- Huff KK, Knabbe C, Lindsey R, Kaufman D, Bronzert D, Lippman ME, Dickson RB. 1988. Multihormonal regulation of insulin-like growth factor-I-related protein in MCF-7 human breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2:200-208.
- Hughes RA, Sendtner M, Thoenen H. 1993. Members of several gene families influence survival of rat motoneurons in vitro and in vivo. *J Neurosci Res* 36:663-671.
- Hynes MA, van Wyk JJ, Brooks PJ, D'Ercole AJ, Jansen M, Lund PK. 1987. Growth hormone dependence of somatomedin-C/insulin-like growth factor-I and insulin-like growth factor II messenger ribonucleic acids. *Mol Endocrinol* 1:233-242.
- Ishii DN. 1989. Relationship of insulin-like growth factor II gene expression in muscle to synaptogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:2898-2902.
- Ishii DN, Marsh DJ. 1993. On the potential for insulin-like growth factor use in motor neuron disease. *Exp Neurol* 124:96-99.
- Jacobs S, Kull FC, Earp HS, Svoboda ME, Van Wyk JJ, Cuatrecasas P. 1983. Somatomedin-C stimulates the phosphorylation of the β -subunit of its own receptor. *J Biol Chem*. 258:9581-9584.
- Jacobs S, Moxham CP. 1991. Hybrid IGF-I receptors. En: *Modern Concepts of Insulin-like*

- Growth Factors. Spencer EM (ed). Elsevier. pp 431-437.
- Jirikowski GF, Caldwell JD, Pedersen CA, Stumpf WE. 1988. Estradiol influences oxytocin-immunoreactive brain system. *Neuroscience* 25:237-248.
- Joanny P, Peyre G, Steinberg J, Guillaume V, Pesce G, Becquet D, Oliver C. 1992. Effect of diabetes on in vivo and in vitro hypothalamic somatostatin release. *Neuroendocrinology* 55:485-491.
- Jones CW, Pickering BT. 1969. Comparison of the effect of water deprivation and sodium chloride imbibition on the hormone content of the neurohypophysis of the rat. *J Physiol* 203:449-458
- Kajimoto Y, Rotwein P. 1990. Evolution of insulin-like growth factor I (IGF-I): structure and expression of an IGF-I precursor from *Xenopus laevis*. *Mol Endocrinol* 4:217-226.
- Kalimo H. 1971. Ultrastructural studies on the hypothalamic neurosecretory neurones of the rat. I. The paraventricular neurones of the non-treated rat. *Z Zellforsch* 122, 283-300.
- Kanematsu T, Hirahara M, Miyake T, Shitsukawa K, Aono T. 1991. Effect of insulin-like growth factor I on gonadotropin release from the hypothalamus-pituitary axis *in vitro*. *Acta Endocrinol (Copenh)* 125:227-233.
- Kar S, Baccichet A, Quirion R, Poirier J. 1993a. Entorhinal cortex lesion induces differential responses in [¹²⁵I]Insulin-like growth factor I, [¹²⁵I]Insulin-like growth factor II and [¹²⁵I]Insulin receptor binding sites in the rat hippocampal formation. *Neuroscience* 55:69-80.
- Kar S, Chabot JG, Quirion R. 1993b. Quantitative autoradiographic localization of [¹²⁵I]Insulin-like growth factor I, [¹²⁵I]Insulin-like growth factor II and [¹²⁵I]Insulin receptor binding sites in developing and adult rat brain. *J Com Neurol* 333:375-397.
- Kee DB, Wood JH. 1987. Cerebrospinal fluid. En: *Encyclopedia of Neuroscience*. Vol I. Adelman G (ed), Birkhäuser, pp 215-217.
- Keller SR, Lamphere L, Lavan BE, Kuhné MR, Lienhard GE. 1993. Insulin and IGF-I signaling through the insulin receptor substrate 1. *Mol Reproduction Dev* 35:346-352.
- Kiess W, Lee L, Graham DE, Greenstein I, Tseng LY, Rechler MM, Nissley SP. 1984. Rat C6 glial cells synthesize insulin-like growth factor I (IGF-I) and express IGF-I receptors and IGF-II/mannose 6-phosphate receptors. *Endocrinology* 124:1727:1736.
- Kim YT, Steinberg C. 1984. Immunological studies on the induction of diabetes in experimental animals. Cellular basis for the induction of diabetes by streptozotocin.

- Diabetes 33:771-777.
- Kirkland J, Ley M, Goddard C, Vargas E, Davies J. 1984. Clin Endocrinol 20:451-456.
- Klapper, D.G., Svoboda, M.E., Van Wyk, J. (1983) Sequence analysis of somatomedin C: confirmation of identity with insulin-like growth factor I. Endocrinology 112, 2215-2217.
- Klempt ND, Klempt M, Gunn AJ, Singh K, Gluckman PD. 1992. Expression of insulin-like growth factor-binding protein 2 (IGFBP2) following transient hypoxia-ischemia in the infant rat brain. Mol Brain Res 15:55-61.
- Kleppisch T, Klinz FJ, Hescheler J. 1992. Insulin-like growth factor I modulates voltage-dependent Ca²⁺ channels in neuronal cells. Brain Res 591:283-288.
- Koehler EM, McLemore GL, Tang W, Summy-Long JY. 1993. Osmoregulation of the magnocellular system during pregnancy and lactation. Am J Physiol 264 (Regulatory Integrative Comp Physiol. 33): R555-R560.
- Komoly S, Hudson LD, Webster HF, Bondy CA. 1992. Insulin-like growth factor I (IGF-I) gene expression is induced in astrocytes during experimental demyelination. Proc Natl Acad Sci USA 89:1894-1898
- Korsching S. 1993. The neurotrophic factor concept: a reexamination. J Neurosci 13:2739-2748.
- Krieger, D.T. 1983. Brain peptides: What, Where, and Why?. Science 222:975-985.
- Lafarga M, Berciano MT, Martínez-Guijarro FJ, Andrés MA, Mellström B, López-García C, Naranjo JR. 1992. Fos-like expression and nuclear size in osmotically stimulated supraoptic nucleus neurons. Neuroscience 50:867-875.
- Lara JJ, Lorenzo MJ, Cacicedo L, Tolón RM, Balsa JA, López-Fernández J, Sánchez-Franco F. 1994 Induction of vasoactive intestinal peptide (VIP) gene expression and prolactin (PRL) secretion by insulin-like growth factor I (IGF-I) in rat pituitary cells: evidence for a paracrine or autocrine regulatory system. (Sometido).
- Lauder JM. 1994. Neurotransmitters as growth regulatory signals: role of receptors and second messengers. TINS 16:233-239.
- Lee WH, Clemens JA, Bondy CA. 1992a. Insulin-like growth factors in the response to cerebral ischemia. Mol Cell Neurosci 3:36-43.
- Lee WH, Javedan S, Bondy CA. 1992b. Coordinate expression of insulin-like growth factor system components by neurons and neuroglia during retinal and cerebellar

- development. *J Neurosci* 12:4737-4744.
- Lenoir D, Honegger P. 1983. Insulin-like growth factor I (IGF-I) stimulates DNA synthesis in fetal rat brain cell cultures. *Dev Brain Res* 7:205-213.
- Lepetit P, Grange E, Gay N, Bobillier P. 1992. Comparison of the effects of chronic water deprivation and hypertonic saline ingestion on cerebral protein synthesis in rats. *Brain Res* 586:181-187.
- LeRoith D, Adamo M, Werner H, Roberts CT. 1991. Insulin-like growth factors and their receptors as growth regulators in normal physiology and pathologic states. *TEM* 2:134-139.
- Lesniak MA, Hill JM, Kiess W, Rojeski M, Pert CB, Roth J. 1988. Receptors for insulin-like growth factor I and II: Autoradiographic localization in rat brain and comparison to receptors for insulin. *Endocrinology* 123:2089-2099.
- Levet AI, Bolam JP, Rye DB, Hallanger AN, Demuth RM, Mesulam MM, Wainer BH. 1986. A light and electron microscopic procedure for sequential double antigen localization using diaminobenzidine and benzidine dihydrochloride. *J Histochem Cytochem* 34:1449-1457.
- Lewis ME, Neff NT, Contreras PC, Stong DB, Oppenheim RW, Grebow PE, Vaught JL. 1993. Insulin-like growth factor-I: Potential for treatment of motor neuronal disorders. *Exp Neurol* 124:73-88.
- Lincoln J, Loesch A, Burnstock G. 1989. The hypothalamo-neurohypophysial system in streptozotocin-diabetic rats. Ultrastructural evidence for neuronal alterations in the supraoptic and paraventricular nuclei and in the neurohypophysis. *J Hirnforsch* 30:425-435.
- Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis. 1993. Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (igf-1) and type 1 IGF receptor (igf1r). *Cell* 75:59-72.
- Liu K, Campisi J. 1992. Ras proteins are essential and selective for the action of insulin-like growth factor I late in the G₁ phase of the cell cycle in BALB/c murine fibroblast. *Proc Natl Acad Sci USA* 89:3889-3893.
- Loesch A, Lincoln J, Burnstock G. 1988. The hypothalamo-neurohypophysial system in streptozotocin-diabetic rats: ultrastructural and immunocytochemical evidence for alterations of oxytocin- and vasopressin-containing neuronal profiles. *Acta Neuropathol* 75:391-401.
- López J. 1994. Efectores del eje somatotropo en el envejecimiento y su regulación por GH

- y testosterona. Tesis doctoral. Facultad de Medicina, Universidad de Alcala de Henares.
- Lowe WL, Roberts CT, Lasky SR, LeRoith D. 1987. Differential expression of alternative 5' untranslated regions in mRNAs encoding rat insulin-like growth factor I. Proc Natl Acad Sci USA 84:8946-8950.
- Lowe Wl, Lasky SR, LeRoith D, Roberts CT. 1988. Distribution and regulation of rat insulin-like growth factor I messenger ribonucleic acids encoding alternative carboxyterminal E-peptides: evidence for differential processing and regulation in liver. Mol Endocrinol 2:528-535.
- Lowe WL. 1991. Biological Actions of the insulin-like growth factors. En: Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects. LeRoith, D. (ed), CRC Press Boca Raton, pp 49-85.
- Lowry OH, Rosebrough M, Farr A, Randall R. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193:265-271.
- Lund PK, Moats-Staats BM, Hynes MA, Simmons JG, Jansen M, D'Ercole AJ, van Wyk JJ. 1986. Somatomedin C / insulin-like growth factor I and insulin-like growth factor II mRNAs in rat fetal and adult tissues. J Biol Chem 261:14539-14544.
- Lund PK, Hepler JE, Hoyt EC, Simmons JG. 1991. Physiological relevance of IGF-I mRNA heterogeneity. En: Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors. Spencer EM (ed). Elsevier. pp 111-120.
- Maiter DM, Hooi SC, Koenig JI, Martin JB. 1990. Galanin is a physiological regulator of spontaneous pulsatile secretion of growth hormone in the male rat. Endocrinology 126:1216-1222.
- Marks JL, Porte D, Stahl WL, Baskin DG. 1990. Localization of insulin receptor mRNA in rat brain by *in situ* hybridization. Endocrinology 127:3234-3236
- Marks JL, Porte D, Baskin DG. 1991. Localization of type I insulin-like growth factor receptor messenger RNA in the adult rat brain by *in situ* hybridization. Mol Endocrinol 5:1158-1168.
- Marquardt H, Todaro G, Henderson L, Oroszlan S. (1981) Purification and primary structure of a polypeptide with multiplication-stimulation activity from rat liver cell cultures. J. Biol. Chem. 256, 6859-6865.
- Martínez-Murillo R, Caro L, Nieto-Sampedro M. 1993. Lesion-induced expression of low-affinity nerve growth factor receptor-immunoreactive protein in Purkinje cells of the adult rat. Neuroscience 52:587-593.

- Marzban F, Tweedle CD, Hatton GI. 1992. Reevaluation of the plasticity in the rat supraoptic nucleus after chronic dehydration using immunogold for oxytocin and vasopressin at the ultrastructural level. *Brain Res Bull* 28:757-766.
- Masters BA, Werner H, Roberts CT, LeRoith D, Raizada MK. 1991. Insulin-like growth factor I (IGF-I) receptors and IGF-I action in oligodendrocytes from rat brains. *Regul Peptides* 33:117-131.
- Masters BA, Raizada MK. 1993. IGF-I-receptors and IGF-I actions in neuronal cultures from the brain. En: raizada MK, LeRoith D (eds). *Ann NY Acad Sci* 692:89-101.
- Mathews LS, Norstedt G, Palmiter RD. 1986. Regulation of insulin-like growth factor I gene expression by growth hormone. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:9343-9347.
- Matsuo K, Niwa M, Kurihara M, Shigematsu K, Yamashita S, Ozaki M, Nagataki S. 1989. Receptor autoradiographic analysis of insulin-like growth factor I (IGF-I) binding sites in rat forebrain and pituitary gland. *Cell Mol Neurobiol* 9:357-367.
- Mattson MP, Cheng B, Smith-swintosky VL. 1993. Mechanism of neurotrophic factor protection against calcium- and free radical-mediated excitotoxic injury: implications for treating neurodegenerative disorders. *Exp Neurol* 124:89-95.
- McCabe JT, Kawata M, Sano Y, Pfaff DW, Desharnais RA. 1990. Quantitative *in situ* hybridization to measure single-cell changes in vasopressin and oxytocin mRNA levels after osmotic stimulation. *Cell Mol Neurobiol* 10:59-71.
- McDonald JK, Lumpkin MD, Samson WK, McCann SM. 1985. Neuropeptide Y affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:561-564.
- McElduff A, Poronnik P, Baxter RC, Williams P. 1988. A comparison of the insulin and insulin-like growth factor I receptors from rat brain and liver. *Endocrinology* 122:1933-1939.
- McKinley MJ, McAllen RM, Mendelsohn FAO, Allen AM, Chai SY, Oldfield BJ. 1990. Circumventricular organs: Neuroendocrine interfaces between the brain and the hemal milieu. *Frontiers in Neuroendocrinology* 11:91-127.
- McMorris FA, Dubois-Dalcq M. 1988. Insulin-like growth factor I promotes cell proliferation and oligodendroglial commitment of rat glial progenitor cells developing *in vitro*. *J Neurosci Res* 21:199-209.
- Meeker RB, Greenwood RS, Hayward JN. 1991. Vasopressin mRNA expression in individual magnocellular neuroendocrine cells of the supraoptic and paraventricular nucleus in response to water deprivation. *Neuroendocrinology* 54:236-247.

- Meister B, Villar MJ, Ceccatelli S, Hökfelt. 1990. Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study using experimental manipulations. *Neuroscience* 37:603-633.
- Melmed S. 1989. Feedback regulation of growth hormone secretion. En: *The brain as an endocrine organ*. Cohen MP, Foa PP (eds). Springer-Verlag, NY, pp 193-209.
- Merchenthaler I, Vigh S, Schally AV, Petrusz P. 1984. Immunocytochemical localization of growth hormone-releasing factor in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 114:1082-1085.
- Miaskowski C, Ong GL, Lukic D, Haldar J. 1988. Immobilization stress affects oxytocin and vasopressin levels in hypothalamic and extrahypothalamic sites. *Brain Res* 458:137-141.
- Michels KM, Lee W, Seltzer A, Saavedra JM, Bondy CA. 1993. Up-regulation of pituitary [¹²⁵I]insulin-like growth factor-I (IGF-I) binding protein-2 and IGF-I gene expression by estrogen. *Endocrinology* 132:23-29.
- Miell JP, Taylor AM, Zini M, Maheshwari HG, Ross JM, Valcavi R. 1993. Effects of hypothyroidism and hyperthyroidism on insulin-like growth factors (IGFs) and growth hormone- and IGF-binding proteins. *J Clin Endocrinol Metab* 76:950-955.
- Mill JF, Chao MV, Ishii DN. 1985. Insulin, insulin-like growth factor II and nerve growth factor effects on tubulin mRNA levels and neurite formation. *Proc Natl Aca Sci USA* 82:7126-7130
- Miller M. 1985. Influence of aging on vasopressin secretion and water regulation, En: *Vasopressin*, Schrier R (ed), Raven Press, New York, pp 249-.
- Mohr E, Bahnsen U, Kiessling C, Richter D. 1988. Expression of vasopressin and oxytocin genes in rat occurs in mutually exclusive sets of hypothalamic neurons. *FEBS Letters* 242:144-148.
- Morimoto N, Kawakami F, Makino S, Chihara K, Hasegawa M, Iyata Y. 1988. Age-related changes in growth hormone releasing factor and somatostatin in the rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 47:459-464.
- Morita S, Yamashita S, Melmed S. 1987. Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: effects of intracellular messengers on growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 121:2000-2006.
- Morgan DO, Jarnagin K, Roth RA. 1986. Purification of the receptor for insulin-like growth factor I. *Biochemistry* 25:5560-5564.

- Morris JF, Pow DV, Sokol HW, Ward A. 1993. Dendritic release of peptides from magnocellular neurons in normal rats, Brattleboro rats and mice with hereditary nephrogenic diabetes insipidus. En Vasopressin, Gross P, Richter D, Robertson GL (eds). John Libbey Eurotext, pp171-182.
- Moses, A.C., Tsuzaki, S. 1991. Is insulin a growth factor?. En Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects, LeRoith, D. (ed), CRC Press Boca Raton, pp. 245-270.
- Mufson EJ, Higgins GA, Kordower JH. 1991. Nerve growth factor receptor immunoreactivity in the New World monkey (*Cebus apella*) and human cerebellum. *J Comp Neurol* 308:555-575.
- Murphy LJ, Ghahary A. 1990. Uterine insulin-like growth factor-I: regulation of expression and its role in estrogen-induced uterine proliferation. *Endocr Rev* 11:443-453.
- Murphy LJ. 1991. Estrogen induction of insulin-like growth factors and myc proto-oncogene expression in the uterus. *J Steroid Biochem* 40:223-230.
- Murray, M. 1967. Effects of dehydration on incorporation of ³H-tyrosine by some hypothalamic neurons in the rat. *Exp Neurol* 19:212-231.
- Murray MA, Dickson BA, Smith EP, Hoath SB, Chernausk SD. 1993. Epidermal growth factor stimulates insulin-like growth factor-binding protein-1 expression in the neonatal rat. *Endocrinology* 133:159-165.
- Myers MG, Sun XJ, Cheatham B, Jachna BR, Glasheen EM, Backer JM, White MF. 1993. IRS-1 is a common element in insulin and insulin-like growth factor-I signaling to the phosphatidylinositol 3'-kinase. *Endocrinology* 132:1421-1430.
- Ndon JA, Giustina A, Wehrenberg WB. 1992. Hypothalamic regulation of impaired growth hormone secretion in diabetic rats. 1. Studies in streptozotocin-induced diabetic rats. *Neuroendocrinology* 55:500-505.
- Negro-Vilar, A. & Samson, W.K. 1979. Dehydration-induced changes in immunoreactive vasopressin levels in specific hypothalamic structures. *Brain Res* 169:585-589.
- Nicoll CS, Russell SM. 1991. Regulation of embryonic and fetal development: IGF-FGF interactions. En ::::pp:25-35.
- Nielsen FC, Wang E, Gammeltoft S. 1990. Receptor binding, endocytosis, and mitogenesis of insulin-like growth factor I and II in fetal rat brain neurons. *J neurochem* 56:12-21.

- Nieto-Bona MP, García-Segura LM, Torres-Alemán I. 1993. Orthograde transport and release of insulin-like growth factor from the inferior olive to the cerebellum. *J Neurosci Res* 36:520-527.
- Nilsson L, Sara VR, Nordberg A. 1988. Insulin-like growth factor I stimulates the release of acetylcholine from rat cortical slices. *Neurosci Lett* 88:221-226.
- Nilsson-Hakansson L, Civalero I, Zhang X, Carlsson-Skwirut C, Sara VR, Nordberg A. 1993. Effects of IGF-I, truncated IGF-I and the tripeptide Gly-Pro-Glu on acetylcholine release from parietal cortex of the rat brain. *Neuroreport* 4:1111-1114.
- Nishizuka M, Arai Y. 1992. Induction by nerve growth factor (NGF) of NGF receptor-like immunoreactivity in the preoptic area and hypothalamus of neonatal rats. *Neurosci Lett* 138:241-244.
- Noguchi T, Kurata LM, Sugisaki T. 1987. Presence of a Somatomedin-C-Immunoreactive substance in the central nervous system: Immunohistochemical mapping studies. *Neuroendocrinol* 46:277-282.
- Norström A, Hansson HA, Sjöstrand J. 1971. Effects of colchicine on axonal transport and ultrastructure of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Z. Zellforsch* 113:271-293.
- Norström A, Hansson HA. 1973. Effects of colchicine on release of neurosecretory material from the posterior pituitary gland of the rat. *Z. Zellforsch* 142:443-464.
- Olchovsky D, Bruno JF, Wood TL, Gelato MC, Leidy JW, Gilbert JM, Berelowitz M. 1990. Altered pituitary growth hormone (GH) regulation in streptozotocin-diabetic rats: a combined defect of hypothalamic somatostatin and GH-releasing factor. *Endocrinology* 126:53-61.
- Olchovsky D, Bruno JF, Gelato MC, Song J, Berelowitz M. 1991. Pituitary insulin-like growth factor I content and gene expression in the streptozotocin-diabetic rat: evidence for tissue-specific regulation. *Endocrinology* 128:923-928.
- Oliver C, Mical RS, Porter JC. 1977. Hypothalamic-pituitary vasculature: evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. *Endocrinology* 101:598-604.
- Orr TE, Meyerhoff JL, Mougey EH, Bunnell BN. 1990. Hyperresponsiveness of the rat neuroendocrine system due to repeated exposure to stress. *Psychoneuroendocrinology* 15:317-328.
- Padridge WM. 1986. Receptor-mediated peptide transport through the blood-brain barrier. *Endoc Rev* 7:314-330.

- Page RB. 1988. The anatomy of the hypothalamo-hypophyseal complex. En: Knobil E, Neill J y col. (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd, New York, pp 1161-1232.
- Palkovits M, Rökäeus A, Antoni FA, Kiss A. 1987. Galanin in the hypothalamo-hypophyseal system. *Neuroendocrinology* 46:417-423.
- Palman S, Meyerson G, Lindgren E, Schalling M, Johansson I. 1991. Insulin-like growth factor I shifts from promoting cell division to potentiating maturation during neuronal differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9994-9998.
- Papachiristou DN, Pham K, Zingg HH, Patel YC. 1989. Tissue-specific alterations in somatostatin mRNA accumulation in streptozotocin-induced diabetes. *Diabetes* 38:752-757.
- Parish DC, Rodríguez EM, Birkett SD, Pickering BT. 1981. Effects of small doses of colchicine on the components of the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Cell Tissue Res* 220:809-827.
- Parnavelas JG, McDonald JK. 1983. The cerebral cortex. En: *Chemical Neuroanatomy*, Emson PC (ed). Raven Press, New York. pp 505-549.
- Patel YC, Bankier DA. 1978. Changes in somatostatin concentration in pancreas and other tissues of streptozotocin diabetic rats. *Endocrinology* 103:523-530.
- Patel YC, Wheatley T, Zingg HH. 1980. Increased blood somatostatin concentration in streptozotocin diabetic rats. *Life Sci* 27:1563-1570.
- Paxinos G, Watson C. 1982. *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Sydney, Australia, Academic.
- Pell JM, Saunders JC, Gilmour RS. 1994. Differential regulation of transcription initiation from insulin-like growth factor-I (IGF-I) leader exons and of tissue IGF-I expression in response to changed growth hormone and nutritional status in sheep. *Endocrinology* 132:1797-1807.
- Peña P, Rodríguez EM, Dellmann HD, Schoebitz K. 1988. Effects of colchicine on the hypothalamo-neurohypophyseal system of chronically salt-loaded rats. *Neuroendocrinology* 47:217-224.
- Perlmutter LS, Tweedle CD, Hatton GI. 1985. Neuronal/glial plasticity in the supraoptic dendritic zone in response to acute and chronic dehydration. *Brain Res* 361:225-232.
- Pessin JE, Frattali AL. 1993. Molecular dynamics of insulin/IGF-I receptor transmembrane signaling. *Mol Reproduction Dev* 35:339-345.

- Peters A, Palay SL, Webster H de F. 1991. The fine structure of the nervous system. Neurons and their supporting cells. Oxford University Press.
- Peterson RP. 1966. Magnocellular neurosecretory centers in the rat hypothalamus. *J Comp Neurol* 128:181-190.
- Pfeifle B, Boeder H, Ditschuneit H. 1987. Interaction of receptors for insulin-like growth factor I, platelet-derived growth factor, and fibroblast growth factor in aortic cells. *Endocrinology* 120:2251-2258.
- Pierson, R., Temin, H. 1972. The partial purification from calf serum of a fraction with multiplication-stimulating activity for chicken fibroblasts in cell culture and with non-suppressible insulin-like activity. *J. Cell. Physiol.* 79, 319-330.
- Piolo EP, Cuello. 1990. Distribution of nerve growth factor receptor-like immunoreactivity in the adult rat nervous system. Effect of colchicine and correlation with the cholinergic system.- Brainstem, cerebellum, and spinal cord. *Neuroscience* 34:89-110.
- Plata-Salamán C. 1991. Epidermal growth factor and the nervous system. *Peptides* 12:653-663.
- Plotsky. PM. 1991. Hypothalamic secretion of somatostatin and growth hormone-releasing factor into the hypophyseal-portal circulation is reduced in streptozotocin diabetic male rats. *Neuroendocrinology* 53:433-438.
- Pons S, Torres-Alemán I. 1992. Basic fibroblast growth factor modulates insulin-like growth factor I, its receptor, and its binding proteins in hypothalamic cell cultures. *Endocrinology* 131:2271-2278.
- Porter JC, Mical RS, Ben-Jonathan N, Ondo JG. 1973. Neurovascular regulation of the anterior hypophysis. *Recent Prog Horm Res* 29:161-198.
- Poulain DA, Wakerley JB. 1982. Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurons secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7:773-808.
- Prager D, Li HL, Asa S, Melmed S. 1994. Dominant negative inhibition of tumorigenesis *in vivo* by human insulin-like growth factor I receptor mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:2181-2185.
- Prager D, Melmed S. 1993. Editorial: insulin and insulin-like growth factor I receptors: are there functional distinctions?. *Endocrinology* 132:1419-1420.
- Price WA, Stiles AD, Moats-Staats BM, D'Ercole AJ. 1992. Gene expression of insulin-like growth factors (IGFs), the type I IGF receptor, and IGF-binding proteins in dexamethasone-induced fetal growth retardation. *Endocrinology* 130:1424-1432.

- Raisz LG, Fall PM, Gabbitas BY, McCarthy TL, Kream BE, Canalis E. 1993. Effects of prostaglandin E2 on bone formation in cultured fetal rat calvarie: role of insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 133:1504-1510.
- Rakienten N, Rakienten MC, Nadkarni MW. 1963. Studies on the diabetogenic action of streptozotocin. *Cancer Chemother Res* 29:91-98.
- Recio-Pinto E, Lang FF, Ishii DN. 1984. Insulin and insulin-like growth factor II permit nerve growth factor binding and the neurite formation response in cultured human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 81:2562-2566.
- Recio-Pinto E, Rechler MM, Ishii DN. 1986. Effects of insulin, insulin-like growth factor II and nerve growth factot on neurite formation and survival in cultured sympathetic and sensory neurons. *J Neurosci* 6:1211-1219.
- Recio-Pinto E, Ishii DN. 1988. Insulin and insulin like growth factor receptors regulating neurite formation in cultured human neuroblastoma cells. *J Neurosci Res* 19:312-320.
- Redburn DA, Schousboe A (eds). 1987. *Neurotrophic Activity of GABA During Development*. Alan R Liss, Inc NY.
- Reinecke M, Drakenberg K, Falkmer S, Sara VR. 1991. Presence of IGF-I-like peptides in the neuroendocrine system of the Atlantic Hagfish, *Myxine glutinosa* (Cyclostoma): evidence derived by chromatography, radioimmunoassay and immunohistochemistry. *Histochemistry* 96:191-196.
- Reinecke M, Betzler D, Drakenberg K, Falkmer S, Sara VR. 1993. Ocurrance of members of the insulin superfamily in central nervous system and digestive tract of protochordates. *Histochemistry* 99:277-285.
- Renaud LP, Bourque CW. 1991. Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Progr Neurobiol* 36:131-169.
- Rinderknecht, E., Humbel, R. 1978a. The amino acid sequence of human insulin-like growthn factor I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.* 253:2769-2776.
- Rinderknecht, E., Humbel, R. 1978b. Primary structure of human insulin-like growth factor II. *FEBS Lett.* 89:283-286.
- Roberts CT, Lasky SR, Lowe WL, Seaman WT, LeRoith D. 1987. Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol* 1:243-248.

- Roberts MM, Robinson AG, Fitzsimmons MD, Grant F, Lee WS, Hoffman GE. 1993. c-fos expression in vasopressin and oxytocin neurons reveals functional heterogeneity within magnocellular neurons. *Neuroendocrinology* 57:388-400.
- Robertson GL, Rower J. 1980. The effect of aging on neurohypophyseal function. *Peptides* 1: Suppl 1:159-162.
- Rodeck H, Lederis K, Heller H. 1960. The hypothalamo-neurohypophyseal system in old rats. *J Endocrinol* 21:225-228.
- Rodriguez-Arnan J, Miell JP, Ross JM. 1993. Influence of thyroid hormones on the GH-IGF-I axis. *TEM* 4:169-173.
- Romero LM, Plotsky PM, Sapolsky RM. 1993. Patterns of adrenocorticotropin secretagog release with hypoglycemia, novelty, and restraint after colchicine blockade of axonal transport. *Endocrinology* 132:199-204.
- Rosenfeld RG, Pham H, Keller BT, Borchard RT, Pardridge WM. 1987. Demonstration and structural comparison of receptors for insulin-like growth factor I and II (IGF-I and IGF-II) in brain and blood-brain barrier. *Biochem Biophys Res Commun* 149:159-166.
- Rosenfeld RG, Lamson G, Pham H, Oh Y, Conover C, De leon DD, Donovan SM, Ocran I, Giudice L. 1990. Insulin-like growth factor binding proteins. *Recent Prog Horm Res* 46:99-163.
- Roth RA, Yonezawa K, Pierce S, Steele-Perkins G. 1991. Substrates of the insulin and insulin-like growth factor I receptor tyrosine kinase. En: *Modern Concepts of Insulin-like Growth Factors*. Spencer EM (Ed). Elsevier. pp 505-515.
- Rotwein P, Burgess SK, Milbrandt JD, Krause JE. 1988. Differential expression of insulin-like growth factor genes in rat central nervous system. *Proc Natl Acad sci USA* 85:265-269.
- Rotwein P. 1991. Structure, evolution, expression and regulation of insulin-like growth factors I and II. *Growth factors* 5:3-18.
- Rotwein P, Bichell DP, Kikuchi K. 1993. Multifactorial regulation of IGF-I gene expression. *Mol Reproduction Dev* 35:358-364.
- Rubinstein M, Liu B, Goodman RH, Low MJ. 1992. Targeted expression of somatostatin in vasopressinergic magnocellular hypothalamic neurons of transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 3:158-161.
- Rusell WE, Van Wyk JJ, Pledger WJ. 1984. Inhibition of the mitogenic effects of plasma

- by a monoclonal antibody to somatomedin-C. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:2389-.
- Sagar SM, Sharp FR, Curran T. 1988. Expression of c-fos protein in brain: metabolic mapping at the cellular level. *Science* 240:1328-1331.
- Sánchez-Franco F, Cacicedo L, Vasallo JL, Blázquez JL, Muñoz Barragan L. 1986. Arginine-vasopressin immunoreactive material in the1 gastrointestinal tract. *Histochemistry* 85:419-422.
- Sánchez-Toscano F, Caminero AA, Machín C, Abella G. 1989. Neuronal plasticity in the hedgehog supraoptic nucleus during hibernation. *Neuroscience* 31:543-550.
- Sandberg AC, Engberg C, Lake M, von Holst H, Sara VR. 1988. The expression of insulin-like growth factor I and II genes in the human fetal and adult brain and in glioma. *Neurosci Lett* 93:114-119.
- Sandberg-Nordqvist AC, Stahlbom PA, Reinecke M, Collins VP, von Holst H, Sara VR. 1993. Characterization of insulin-like growth factor I in human primary brain tumors. *Cancer Res* 53:2475-2478.
- Saneto RP, Low KG, Melner MH, de Vellis J. 1988. Insulin/insulin-like growth factor I and other epigenetic modulators of myelin basic protein expression in isolated oligodendrocyte progenitor cells. *J Neurosci Res* 21:210-219.
- Spencer GSC, Berry C, Hodgkinson SC, Bass JJ. 1993. On the neuroendocrine role of insulin-like growth factor 1 and 2 in the regulation of growth hormone secretion. *Mol Cel Neurosci* 4:538-542.
- Sara VR, Uvnäs-Moberg K, Uvnäs B, Hall K, Wetterberg L, Posloncec B, Goiny M. 1982. The distribution of somatomedins in the nervous system of the cat and their release following neural stimulation. *Acta Physiol Scand* 115:467-470.
- Sara VR, Carlsson-Skwirut C, Andersson C, Hall E, Sjögren B, Holmgren A, Jörnvall H. 1986. Characterization of somatomedins from human fetal brain: identification of a variant form of insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:4904-4907.
- Sara VR, Carlsson-Skwirut C. 1988. The role of the insulin-like growth factors in the regulation of brain development. *Prog Brain Res* 73:87-99.
- Sara VR, Carlsson-Skwirut C, Bergman T, Jörnvall H, Roberts PJ, Crawford M, Nilsson L, Civalero I, Nordberg A. 1989. Identification of gly-pro-glu (GPE), the aminoterminal tripeptide of insulin-like growth factor I which is truncated in brain, as a novel neuroactive peptide. *Biochem Biophys Commun* 165:766-771.
- Sara VR, Carlsson-Skiwirut C. 1990. Insulin-like growth factors in the central nervous

- system: biosynthesis and biological role; En Sara VR, Kerstin H, Hans L (eds): Growth Factors: From Genes to Clinical Application. Raven Press, New York, 1990, pp 179-191.
- Sasaki N, Rees-Jones RW, Zick Y, Nissley SP, Rechler MM. 1985. Characterization of insulin-like growth factor I-stimulated tyrosine kinase activity associated with the β -subunit of type I insulin-like growth factor receptors of rat liver cells. *J Biol Chem* 260:9793-9804.
- Sasaki F, Wu P, Rougeau D, Unabia G, Childs GV. 1990. Cytochemical studies of responses of corticotropes and thyrotropes to cold and novel environment stress. *Endocrinology* 127:285-297.
- Sato M, Frohman LA. 1993. Differential effects of central and peripheral administration of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor on hypothalamic GH-releasing hormone and somatostatin gene expression in GH-deficient dwarf rats. *Endocrinology* 133:793-799.
- Scarrer B. 1987. Evolution of intracellular Communication channels. En: Functional Morphology of Neuroendocrine System. Scharrer B, Korf HW, Hartwig HG (eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, pp. 1-8.
- Schechter R, Whitmire J, Wheet GS, Beju D, Jackson KW, Harlow R, Gavin JR. 1994. Immunohistochemical and *in situ* hybridization study of an insulin-like substance in fetal neuron cell cultures. *Brain Res* 636:9-27
- Schuldiner AR, Barbetti F, Raben N, Scavo L, Serrano, J. 1991. Insulin. En: Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects, LeRoith, D. (ed), CRC Press Boca Raton, pp. 181-220.
- Schumacher M, Jung-Testas I, Robel P, Baulieu EE. 1993. Insulin-like growth factor I: a mitogen for rat Schwann cells in the presence of elevated levels of cyclic AMP. *Glia* 8:232-240.
- Scotti AI, Nitsch C. 1992. Differential Ca^{2+} binding properties in the human cerebellar cortex: distribution of parvalbumin and calbindin D-28K immunoreactivity. *Anat Embryol* 185:163-167.
- Shemer J, Raizada MK, Masters BA, Ota A, LeRoith D. 1987. Insulin-like growth factor I receptors in neuronal and glial cells. Characterization and biological effects in primary cultures. *J Biol Chem* 262:7693-7699.
- Shemer J, Adamo ML, Roberts CT, LeRoith D. 1992. Tissue-specific transcription start site usage in the leader exons of the rat insulin-like growth factor I gene: evidence for differential regulation in the developing kidney. *Endocrinology* 131:3010:3018.

- Sherman, T.G., McKelvy, J.F. & Watson, S.J. 1986. Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: northern and *in situ* hybridization analysis. *J Neurosci* 6:1685-1694.
- Sherman TG, Day R, Civelli O, Douglass J, Herbert E, Akil H, Watson SJ. 1988. Regulation of hypothalamic magnocellular neuropeptides and their mRNAs in the Brattleboro rat: Coordinate responses to further osmotic challenge. *J Neurosci* 8:3785-3796.
- Shimatsu A, Rotwein P. 1987. Mosaic evolution of the insulin-like growth factors. Organization, sequence, and expression of the rat insulin-like growth factor I gene. *J Biol Chem* 262:7894-7900.
- Silverman BL, Bettendorf M, Kaplan SL, Grumbach MM, Miller WL. 1989. Regulation of growth hormone (GH) secretion by GH-releasing factor, somatostatin and insulin-like growth factor I in ovine fetal and neonatal pituitary cells *in vitro*. *Endocrinology* 124:84-89.
- Silverman WF, Sladek JR. 1991. Ultrastructural changes in magnocellular neurons from the supraoptic nucleus of aged rats. *Dev Brain Res* 58:25-34.
- Sjoberg J, Kanje M. 1989. Insulin-like growth factor I (IGF-I) as a stimulator of regeneration in the freeze-injured rat sciatic nerve. *Brain Res* 485:102-108.
- Sladek Cd, McNeil TH, Gregg Cm, Blair ML, Baggs CD. 1981. Vasopressin and renin response to dehydration in aged rat. *Neurobiol Aging* 2:293-302.
- Sofroniew MV. 1985. Vasopressin, oxytocin and their related neurophysins. En: *Handbook of Chemical Neuroanatomy, Vol 4, Part 1*. Björklund A, Hökfelt T (eds). Elsevier Science Publishers B.V. pp 93-165.
- Sonetti D, van Heumen WRA, Roubus EW. 1992. Light- and electron-microscopic immunocytochemistry of a molluscan insulin-related peptide in the central nervous system of *Planorbarius corneus*. *Cell Tissue Res* 267:473-481.
- Sonntag WE, Boyd RL, Booze RM. 1990. Somatostatin gene expression in hypothalamus and cortex of aging male rats. *Neurobiol Aging* 11:409-416.
- Sonntag W, Gottschall PE, Meites J. 1986. Increased secretion of somatostatin-28 from hypothalamic neurons of aged rats *in vitro*. *Brain Res* 380:229-234.
- Sotelo C, WassefM. 1991. Cerebellar development: afferent organization and Purkinje cell heterogeneity. *Phil Trans R Lond B* 331:307-313.
- Spencer, E., Ross, M., Smith, B. 1983. The identity of human insulin-like growth factors

- I and II with somatomedins C and A and homology with rat IGF-I and -II, en *Insulin-like Growth Factors/Somatomedins: Basic Chemistry, Biology; Clinical Importance*, Walter de Gruyter, Berlin, New York, pp. 81-96.
- Spinolo LH, Crowley WR. 1993. Neurochemical regulation of hypothalamic oxytocin messenger ribonucleic acid levels during early lactation in rats. *Endocrinology* 132:2631-2638.
- Steenbergh PH, Jansen E, Van Schaik FMA, Sussenbach JS. 1993. Functional analysis of the human IGF-I gene promoters. *Mol Reproduc Develop* 35:365-367.
- Stenvers KI, Zimmermann EM, Gallagher M, Lund PK. 1994. Expression of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 mRNAs in adult rat forebrain. *J Comp Neurol* 339:91-105.
- Sterberger LA. 1979. *Immunocytochemistry*, Wiley, New York.
- Strand FL, Rose KJ, Zuccarelli LA, Kume J, Alves SE, Antonawich FJ, Garrett LY. 1991. Neuropeptide hormones as neurotrophic factors. *Physiological Rev* 71:1017-1046.
- Sumantran VN, Feldman EL. 1993. Insulin-like growth factor I regulates *c-myc* and GAP-43 messenger ribonucleic acid expression in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *Endocrinology* 132:2017-2023.
- Szabo J, Cowan WM. 1984. A stereotaxic atlas of the brain of the ynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J Com Neurol* 222:265-300.
- Tannenbaum GS. 1981. Growth hormone secretory dynamics in streptozotocin diabetes: evidence of a role for endogenous circulating somatostatin. *Endocrinology* 108:76-82.
- Tannenbaum G, Guyda H, Posner B 1983 Insulin-like growth factors: A role in growth hormone negative feedback and body weight regulation via brain. *Science* 220:77-79.
- Theodosis DT, Poulain DA. 1987. Oxytocin-secreting neurones: A physiological model for structural plasticity in the adult mammalian brain. *TINS* 10:426-430.
- Theodosis DT, Poulain DA. 1993. Activity-dependent neuronal-glia and synaptic plasticity in the adult mammalian hypothalamus. *Neuroscience* 57:501-535.
- Thissen JP, Ketelslegers JM, Underwood LE. 1994. Nutritional regulation of the insulin-like growth factors. *Endocrin Rev* 15:80-101.
- Thompson CJ, Davis SN, Baylis PH. 1989. Effect of blood glucose concentration on osmoregulation in diabetes mellitus. *Am J Physiol* 256 (Regulatory Integrative Comp Physiol 25):R597-R604.

- Tomlinson Dr, Mayer JH. 1984. Defects of axonal transport in diabetes mellitus: a possible contribution to the aetiology of diabetic neuropathy. *J Auton Pharmacol* 4:59-72.
- Torres-Alemán I, Naftolin F, Robbins R. 1990a. Trophic effects of insulin-like growth factor I on fetal rat hypothalamic cells in culture. *Neuroscience* 35:601-608.
- Torres-Alemán I, Naftolin F, Robbins R. 1990b. Trophic effects of basic fibroblast growth factor on fetal rat hypothalamic cells: interactions with insulin-like growth factor. *Dev Brain Res* 52:253-257.
- Torres-Alemán I, Pons S, García-Segura LM. 1991. Climbing fiber deafferentation reduces insulin-like growth factor I (IGF-I) content in cerebellum. *Brain Res* 564:384-351.
- Torres-Alemán I, Pons S, Santos-Benito FF. 1992. Survival of Purkinje cells in cerebellar cultures is increased by insulin-like growth factor I. *Eur J Neurosci* 4:864-869.
- Unterman TG, Jentel JJ, Oehler DT, Lacson RG, Hofert JF. 1993. Effects of glucocorticoids on circulating levels and hepatic expression of insulin-like growth factor (IGF)-binding proteins and IGF-I in the adrenalectomized streptozotocin-diabetic rats. *Endocrinology* 133:2531-2539.
- Ullrich A, Gray A, Tam AW, Yang-Feng T, Tsubokawa M, Collins C, Henzel W, LeBon T, Kathuria S, Chen E, Jacobs S, Francke U, Ramachandran J, Fujita-Yamaguchi Y. 1986. Insulin-like growth factor I receptor primary structure: comparison with insulin receptor suggest structural determinants that define functional specificity. *EMBO J* 5:2503-2512.
- Vale W, Brazeau P, Rivier J, Grant G, Burgus R, Guillemin R. 1973. Inhibitory hypophysiotropic activities of hypothalamic somatostatin. *Fed Proc* 32:211.
- Van der Pal RHM, Koper JW, van Golde LMG, Lopes-Cardoso M. 1988. Effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on oligodendrocyte-enriched glial cultures. *J Neurosci Res* 19:483-490.
- Van der Zee CEEM, Fawcett J, Diamond J. 1992. Antibody to NGF inhibits collateral sprouting of septohipocampal fibers following entorhinal cortex lesion in adult rats. *J Com Neurol* 326:91-100.
- Vandesande F, Dierickx K. 1975. Identification of the vasopressin producing and oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tiss Res* 164:153-162
- VanItallie CM Fernstrom JD. 1982. Osmolar effects on vasopressin secretion in the streptozotocin-diabetic rat. *AM J Physiol (Endocrinol Metab 5)* 242:E411-E417.

- Van Tol HHm, Bolwerk ELM, Liu B, Burbach JPH. 1988. Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrus cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology* 122:945-951.
- Van Wyk, J., Underwood, L., Hintz, R., Clemmons, D., Voina, S., Weaver, R. 1974. The somatomedins: a family of insulin-like hormones under growth hormone control. *Rec. Progr. Horm. Res.* 30, 259-318.
- Wakerley JB, Clarke G, Summerlee AJS. 1988. Milk ejection and its control. En: Knobil E, Neill J (eds). *The Physiology of Reproduction*. Raven Press Ltd. New York, pp 2283-2321.
- Wang ZP, Man SY, Tang F. 1993. Aged-related changes in the contents of neuropeptides in the rat brain and pituitary. *Neurobiol Aging* 14:529-534.
- Watkins WB, y Choy VJ. 1980. The impact of aging on neuronal morphology in the rat hypothalamo-neurohypophyseal system - an immunohistochemical study. *Peptides* 1:239-245.
- Watt RM. 1970. Metabolic activity in single supraoptic neurones and its relation to osmotic stimulation. *Brain Res* 22:443-447.
- Way BA, Mooney RA. 1993. Activation of phosphatidylinositol-3-kinase by platelet-derived growth factor and insulin-like growth factor-I is inhibited by a transmembrane phosphotyrosine phosphatase. *J Biol Chem* 268:26409-26415.
- Werner H, Raizada MK, Mudd LM, Foyt HL, Simpson IA, Roberts CT, LeRoith. 1988. Regulation of rat brain/HepG2 glucose transporter gene expression by insulin and insulin-like growth factor in primary cultures of neuronal and glial cells. *Endocrinology* 125:314-320.
- Werner H, Woloschak M, Stannard B, Shen-Orr Z, Roberts CT, LeRoith D. 1991. The insulin-like growth factor receptor: molecular biology, heterogeneity, and regulation. En: *Insulin-like Growth Factors: Molecular and Cellular Aspects*. LeRoith D (Ed). CRC. pp 17-48.
- Werther GA, Abate M, Hogg A, Chessman H, Oldfield B, Hards D, Hudson P, Power B, Freed K, Herington AC. 1990. Localization of insulin-like growth factor I mRNA in rat brain by *in situ* hybridization - Relationship to IGF-I receptors. *Mol Endocrinol* 4:773-778.
- Werther GA, Cheesman H, Russo V. 1993. Olfactory bulb organ cultures is supported by combined insulin-like growth factor I and basic fibroblast growth factor. *Brain Res* 617:339-342.

- Wiggins RC. 1982. Myelin development and nutritional insufficiency. *Brain Res* 4:151-175.
- Williams G, Steel JH, Cardoso H, Ghatel MA, Lee YC, Gill JS, Burrin JM, Polak, JM, Bloom SR. 1988. Increased hypothalamic neuropeptide Y concentrations in diabetic rat. *Diabetes* 37:763-772.
- Williams G, Gill JS, Lee YC, Cardoso HM, Okpere BE, Bloom SR. 1989. Increased neuropeptide Y concentrations in specific hypothalamic regions of streptozotocin-induced diabetic rats. *Diabetes* 38:321-327.
- Wood TL, Berelowitz m, Gelato MC, Roberts CT, LeRoith D, Millard WJ, McKelvy. 1991. Hormonal regulation of rat hypothalamic neuropeptide mRNAs: Effect of hypophysectomy and hormone replacement on growth-hormone-releasing factor, somatostatin and insulin-like growth factors. *Neuroendocrinology* 53:298-305.
- Wu P, Childs GV. 1991. Changes in rat pituitary POMC mRNA exposure to cold or a novel environment, detected by *in situ* hybridization. *J Histochem Cytochem* 39:843-852.
- Yamaguchi F, Itano T, Mizobuchi M, Miyamoto O, Janjua NA, Matsui H, Tokuda M, Ohmoto T, Hosokawa K, Hatase O. 1990. Insulin-like growth factor I (IGF-I) distribution in the tissue and extracellular compartment in different regions of the rat brain. *Brain Res* 533:344-347.
- Yamaguchi F, Itano T, Miyamoto O, Janjua NA, Ohmoto T, Hosokawa K, Hatase O. 1991. Increase of extracellular insulin-like growth factor (IGF-I) concentration following electrolytical lesion in rat hippocampus. *Neurosci Lett* 128:273-276.
- Yamashita S, Melmed S. 1986. Insulin-like growth factor I action on rat anterior pituitary cells: Suppression of growth hormone secretion and messenger ribonucleic acid levels. *Endocrinology* 118:176-182.
- Yamashita S, Melmed S. 1987. Insulin-like growth factor regulation of growth hormone gene transcription. *J Clin Invest* 79:449-452.
- Xue Z, LeDouarin N, Smith J. 1988. Insulin and insulin-like growth factor I can trigger the differentiation of catecholaminergic precursors in cultures of dorsal root ganglia. *Cell Differ Dev* 25:1-10.
- Zapf J, Froesch ER, Humbel RE. 1981. The insulin-like growth factors (IGF) of human serum: chemical and biological characterization and aspects of their possible physiological role. *Curr Top Cell Regul* 19:257-309.
- Zbuzek VK Wu W. 1982. Age-related vasopressin changes in rat plasma and the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Exp Gerontol* 17:133-138.

Zingg HH, Lefebvre DL. 1988. Oxytocin and vasopressin gene expression during gestation and lactation. *Mol Brain Res* 4:1-6.