

00387



UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE TRATAMIENTOS CON ESTRADIOL EN LA
SECRECIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO, DESPUÉS
DE LA APLICACIÓN DE SOMATOSTATINA EN EL
PEZ DORADO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:
DOCTOR EN CIENCIAS
P R E S E N T A :
RODOLFO CARDENAS REYGADAS

DIRECTOR DE TESIS:
DR. CARLOS ARAMBURO DE LA HOZ

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE 2005.

m.347640



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNAM

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE CIENCIAS

INFLUENCIA DE TRATAMIENTOS CON ESTRADIOL EN
LA SECRECIÓN DE HORMONA DE CRECIMIENTO,
DESPUÉS DE LA APLICACIÓN DE SOMATOSTATINA EN
EL PEZ DORADO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS

Director de tesis: DR. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ

MÉXICO D. F.



SEPTIEMBRE, 2005



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: RODOLFO CÁRDENAS REYGADAS
FECHA: 7/Septiembre/2005
FIRMA: [Firma]

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTOR EN CIENCIAS del alumno **CÁRDENAS REYGADAS RODOLFO** con número de cuenta **72039667** y número de expediente **3971042**, con la tesis titulada: "Influencia de tratamientos con estradiol en la secreción de hormona de crecimiento, después de la aplicación de somatostatina en el pez dorado", bajo la dirección del Dr. Carlos Arámburo de la Hoz .

Presidente: Dr. Horacio Merchant Larios
Vocal: Dra. Ma. Elena Ayala Escobar
Vocal: Dr. Manuel Miranda Anaya
Vocal: Dra. Maricela Luna Muñoz
Secretario: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz
Suplente: Dr. Luis Felipe Jiménez García
Suplente: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 22 de agosto del 2005.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue parcialmente financiado con los siguientes donativos:
CONACyT 31817-N, 2002-C01-41218; PAPIIT : IN-227399, IN- 226002-3; NATURAL
SCIENCE and ENGINEERING RESEARCH COUNCIL OF CANADA (NSERC) :
A6371; NIH: HD 19899.

Este trabajo no hubiera sido posible sin el gran, gran apoyo del Dr. Richard E. Peter (Dick), Decano de la Facultad de Ciencias y jefe del laboratorio de Neuroendocrinología de peces en la Universidad de Alberta, Canadá, quien financió en gran medida gastos derivados de dicha investigación. Además de ser un científico destacado, su alta calidad humana y franca amistad, son cualidades que han quedado profundamente inmersas en mí. Espero ser merecedor de seguir contando con tus consejos y tu amistad.

El Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, Jefe del Laboratorio de Bioquímica de Hormonas en el Instituto de Neurobiología, director de dicho Instituto y de este trabajo, es también alguien digno de ejemplo. Es quien, a pesar de las dificultades, no dudó en apoyarme plenamente. Predicar con el ejemplo y no aminorarse ante las adversidades son, indudablemente, Carlos, cosas que ratificaste para conmigo. También, muchas gracias por haber creído en el proyecto que te presenté y por ayudar a financiarlo. Para tí, mi eterna gratitud.

Al Dr. Xeiwei Lin, en ese tiempo Investigador asociado de Dick, muchas gracias por haberme enseñado las técnicas de biología molecular que aplicamos en el presente trabajo, y por su siempre fresca y austera camaradería.

Al Dr. Fabián Canosa, posdoc también en el laboratorio de Dick, gracias por la ayuda en el procesamiento de las muestras en la última recta del trabajo. También sus comentarios fueron de enorme utilidad a la hora de elaborar el manuscrito.

Agradezco al Dr. John P. Chang, de la Facultad de Ciencias de La Universidad de Alberta, por su valiosa ayuda al realizar el marcaje de la GH, sus comentarios y su amistad a lo largo de los años.

Mi gratitud a la Dra. Maricela Luna M., Investigadora Asociada, por su apoyo en las estancias en el laboratorio de Carlos, su amistad y sus consejos.

Mi agradecimiento a los Doctores Horacio Merchant L. y Roberto Domínguez Casala, quienes fueron miembros de mi Comité Tutoral, por todas las valiosas sugerencias para enriquecer este trabajo.

Gracias también a los Doctores Gonzalo Martínez de la Escalera, Ma. Elena Ayala E. y Manuel Miranda A., por sus valiosos comentarios en la revisión del manuscrito.

A Moni, por su colaboración diaria en el laboratorio, prueba inequívoca de la amistad y cariño, Gracias.

Mis grandes amigos que a lo largo de los años, más que amigos los considero ya como mi familia, Nacho, Sergio, Gloria, Martha, Paty Dávila y Luis Felipe, con mi más entrañable cariño les agradezco, TODO.

A mis Hermanas, Esperanza, Arcelia y Flor, sobrinos y sus hijos, por todos estos años de confiar en mí y mostrarme su cariño siempre.

A mis padres, que no alcanzaron a ver esta parte de mi vida.

A mi esposa Paty y mis hijos, Andrea y Luis, con quienes comparto mi vida, amor, sueños y frustraciones.

A todos, MUCHAS GRACIAS.

ÍNDICE

Resumen	1
Abstract	3
Antecedentes	4
<i>Hormona de Crecimiento</i>	4
<i>Funciones tradicionales de la hormona de crecimiento</i>	6
<i>Eje hipotálamo hipófisis en peces teleósteos</i>	6
<i>Regulación de la secreción de la Hormona de crecimiento</i>	9
<i>Sustancias estimuladoras de la secreción de la hormona de crecimiento</i>	10
<i>Hormona liberadora de hormona de Crecimiento</i>	10
<i>Péptido activador de la adenilato Ciclasa de la hipófisis</i>	11
<i>Hormona liberadora de gonadotropinas</i>	12
<i>Dopamina</i>	14
<i>Sustancias inhibidoras de la secreción de La hormona de crecimiento</i>	15
<i>Variaciones de la concentración sérica de la GH en el ciclo gonadal de Carassius auratus</i>	23
Planteamiento del problema	26
Hipótesis	27
Objetivo	28
Metodología	29
Resultados	40
Discusión	52
Conclusiones	59
Perspectivas	60
Referencias	61
Anexo I	Artículo publicado en GCE (2003) Vol. 132: 119-124.

RESUMEN

En algunas especies de peces, la presencia de estradiol disminuye el efecto inhibitorio de la somatostatina, lo que a su vez colabora con un incremento de la concentración sérica de la hormona de crecimiento.

En el presente trabajo reportamos la correlación entre las altas concentraciones de estradiol y la disminución del efecto inhibitorio de la somatostatina sobre la liberación de hormona de crecimiento de las hipófisis de hembras de pez dorado. También reportamos las variaciones en la expresión del subtipo de receptor sst2 a somatostatina asociadas con altas concentraciones de estradiol.

En sistemas de perfusión de fragmentos de hipófisis, se observó que las glándulas de hembras en regresión tratadas con estradiol fueron menos sensibles a la acción inhibitoria de la somatostatina comparados con los fragmentos de hipófisis de hembras en regresión sin tratamiento.

La expresión del ARNm de sst₂ extraído de hipófisis de hembras en regresión tratadas con estradiol fue menor en relación con la cantidad del mismo ARN mensajero obtenido de hembras en regresión a las que no se dio tratamiento.

Los resultados obtenidos a partir de peces manejados durante su ciclo reproductivo mostraron, para las hembras sexualmente maduras, una menor sensibilidad de fragmentos de hipófisis a la acción inhibitoria de la somatostatina cuando se compararon con el porcentaje de inhibición producido por dicha hormona a las hipófisis de hembras en regresión, y se observó que el contenido hipofisiario de hormona de crecimiento fue mayor en las hembras maduras. Por su parte, los niveles de expresión del ARNm de sst₂ fueron menores en las hipófisis de las hembras sexualmente maduras en relación con los niveles de expresión de este mensajero en las hipófisis de hembras en regresión.

Tanto en hembras en regresión tratadas con estradiol como en hembras sexualmente maduras, la concentración de hormona de crecimiento en suero fue superior que la encontrada en hembras en regresión.

Con base en estos datos se propone que en las hembras de pez dorado *Carassius auratus*, cuando existe una alta concentración de estradiol circulante se presenta una disminución en el número de receptores a somatostatina del subtipo sst₂ en los somatotropos, dando como resultado una menor sensibilidad de estas células a la somatostatina, siendo éste uno de los mecanismos que contribuyen a elevar las concentraciones séricas de la GH.

ABSTRACT

Pituitary growth hormone (GH) synthesis and secretion are regulated by multifactorial events. In most vertebrates, growth hormone-releasing hormone (GHRH) and somatostatin (SST) are the main stimulatory and inhibitory factors, respectively. In some teleosts, it has been described that estradiol enhances GH serum levels.

In this work we studied how high estradiol serum levels affect somatostatin action upon GH release from female goldfish pituitaries, both under natural conditions of the reproductive cycle (in sexually mature and sexually regressed females) and in an *in vitro* perfusion model. Also, we explored the effect of estradiol on the expression of pituitary somatostatin receptors (*sst*₂).

In the perfusion experiments we found that pituitaries from regressed estradiol-primed females were less responsive to somatostatin inhibition of GH release than pituitaries from regressed females without treatment. Also, estradiol-treated regressed females pituitaries expressed lower amounts of *sst*₂ mRNA than untreated regressed females pituitaries.

Under natural reproductive conditions, pituitaries from sexually mature females (which have high estradiol circulating levels) were less sensitive to somatostatin inhibition and had higher GH contents than those found in regressed females. Likewise, pituitary *sst*₂ mRNA expression was down-regulated in sexually mature females.

Mature and regressed estradiol-primed females, always showed higher GH serum levels than those in their counterparts.

In conclusion, we postulate that the increase in GH serum concentration that accompanies high estradiol circulating levels in the female goldfish is due to a decrease in pituitary sensitivity to somatostatin inhibition of GH release through estradiol-dependent down regulation of *sst*₂ receptors.

ANTECEDENTES

Hormona de crecimiento.

La hormona de crecimiento (GH), junto con la prolactina (PRL), pertenece a una familia de hormonas peptídicas secretadas por la adenohipófisis de todos los vertebrados. En peces, dicha glándula además secreta a la somatolactina (SL) que presenta estructuras con la GH y la PRL (Norris, 1997).

La GH es una hormona multifuncional, pues si bien su principal actividad es la de inducir el crecimiento corporal del organismo, también estimula la lipólisis, oxidación de carbohidratos, síntesis de proteínas y ácidos nucleicos y el balance de iones. En referencia a esta última propiedad, en los peces óseos se ha establecido que participa en la adaptación a medios con mayor contenido de sales (paso de agua dulce a agua salada), actuando en riñón y en branquias, entre otros órganos y sistemas (Norris, 1997). Más recientemente se ha asociado a la GH con fenómenos reproductivos al participar ayudando a estimular la esteroidogénesis, tanto en mamíferos (Childs, 2000; Hull y Harvey, 2000, 2002) como en peces (LeGac y col., 1993).

Tomando como modelo a la GH del cerdo, de acuerdo a determinaciones realizadas por medio de cristalografía de rayos X, la molécula tiene cuatro α hélices antiparalelas en diversos segmentos de su estructura, estableciéndose que alrededor del 50% de la estructura de la hormona es α -helicoidal, siendo el resto, dominios con β -tira plegada y dominios de conexión entre ambas estructuras secundarias (Abdel-Meguid y col., 1987).

Actualmente se reconoce que la hormona de crecimiento es en realidad una familia de proteínas formada por isohormonas y/o variantes moleculares presentes en la mayor parte

de los vertebrados. En este caso, el término isohormona describe a proteínas con diferencias en su secuencia de aminoácidos (lo que puede obtenerse a partir de la transcripción de diferentes genes, por proceso de corte y empalme alternativos o por la expresión de diferentes alelos), mientras que el término variante se utiliza para describir cambios efectuados a nivel postraduccional (como glicosilación, fosforilación, acetilación, desamidación, etc) (Arámburo y col.,1997).

Específicamente en el pez dorado se ha reportado la presencia de dos isohormonas de GH, denominadas gfGH-I y gfGH-II respectivamente. Esta clasificación se realizó con base en la secuencia nucleotídica obtenida a partir de los ácidos desoxirribonucleicos complementarios (DNAs). Ambas isoformas tienen 188 aminoácidos en sus formas maduras y son biológicamente activas. También cuentan como prohormonas con un péptido señal de 22 aminoácidos. La gfGH-I presenta 5 residuos de cisteína (Cys-49, Cys-123, Cys-161, Cys-178 y Cys 186) lo que establece una similitud con otras isoformas de GH aisladas de otras especies de peces ciprínidos. La gfGH-II tiene 4 residuos de cisteína entre sus aminoácidos (no se encuentra la Cys-123), lo que le confiere una mayor similitud con las GHs del resto de los vertebrados (Law y col.,1996).

Comparando las secuencias de ambas isohormonas, se reporta que se encuentran 43 sustituciones en las secuencias de nucleótidos, 28 de las cuales son consideradas como mutaciones silenciosas. Bajo este mismo orden de ideas, al comparar las secuencias codificantes de las gfGHs con las diferentes hormonas de crecimiento (GHs) de otras especies estrechamente emparentadas como la carpa común, el grado de similitud obtenido es de 95% para las GH-I de ambas especies y de 92% en las GH-II. Con base en este hecho se sugiere que, al ser ambas especies poliploides, la divergencia entre las dos se realizó en épocas posteriores a la duplicación de los genes de GH (Law y col.,1996).

Como se ha observado en otras especies de teleósteos, no es rara la presencia de más de una isoforma de GH, ejemplo de ello, son diversas especies de salmónidos como: *Oncorhynchus mykiss*, *Salmo salar* y *Oncorhynchus keta* (Argellon y col.,1988; Johansen y col.,1989; Sekine y col.,1989), y el bacalao del atlántico *Gadus morhua* (Rand-Weaver y col.,1989).

Análisis comparativos entre las GHs de cipriniformes y salmoniformes han permitido suponer que la duplicación de genes para esta hormona fueron eventos independientes para dichos grupos de peces a lo largo de la evolución (Law y col.,1996), y con ello, explicar el por qué las divergencias encontradas para ambos genes entre las dos familias.

Funciones tradicionales de la hormona de crecimiento.

Al igual que en el resto de los vertebrados, en el hígado se han detectado una importante cantidad de receptores para la hormona de crecimiento en los hepatocitos, quienes en respuesta realizan la síntesis y liberación de factores de crecimiento insulinoideos (IGFs) o somatomedinas (Company y col.,2001). También se han realizado experimentos empleando cartílago branquial de pez dorado demuestran que el tratamiento con GH e IGFs produce una mayor incorporación de sulfato en la matriz extracelular de estos cartilagos en relación con los no tratados (Marchant y Moroz, 1993).

Eje hipotálamo-hipófisis en peces teleósteos.

Como en los otros vertebrados, en peces, la hipófisis se ubica por debajo del diencéfalo, es lentiforme, de apariencia lisa y con un doble origen. La adenohipófisis que proviene de la bolsa de Rathke y la neurohipófisis de origen nervioso. La adenohipófisis presenta una parte distal rostral (PDR) que contiene fundamentalmente a las células lactotropas y

corticotropas, una parte proximal distal (PPD) que incluye a los somatotropos, gonadotropos y tirotropos y la parte intermedia (PI) que tiene células productoras de hormona estimulante de los melanocitos y somatolactina. La neurohipófisis en algunas especies se encuentra íntimamente asociada con la parte nerviosa de la neurohipófisis y forma un lóbulo neurointemedio (Norris 1997) (Figura 1). Los somatotropos son células restringidas a la PPD, de forma oval, núcleo de posición central que puede tener una o más depresiones, y con gránulos electrodensos en su citoplasma (Laiz-Carrión et al, 2003; Van Oordt y Peute, 1983; Villaplana y col., 2003). El tamaño de las células, el núcleo y los gránulos son variables de acuerdo con la especie, pero con tinción de Jafri (1979) adquieren un color anaranjado. El sistema hipotálamo-hipófisis en los peces teleósteos difiere del resto de los vertebrados en que la entrega de neurohormonas producidas en el hipotálamo a la adenohipófisis es de manera directa a través de axones que llegan a la proximidad de las células endócrinas de esta última glándula. La carencia de circulación portahipofisiaria ha convertido a este sistema en un excelente modelo para la comprensión de los fenómenos neuroendocrinos (Peter et al.1991).

También, como en el resto de los vertebrados, en teleósteos, el hipotálamo se ubica formando el piso del diencefalo y del tercer ventrículo. Entre las zonas hipotalámicas productoras de neurohormonas que influyen a los somatotropos se encuentran: el área preóptica, los núcleos: preóptico periventricular, preóptico, arqueado, periventricular, los cuales producen sustancias estimuladoras o inhibitoras de la secreción de la GH (Peter y Marchant, 1995).

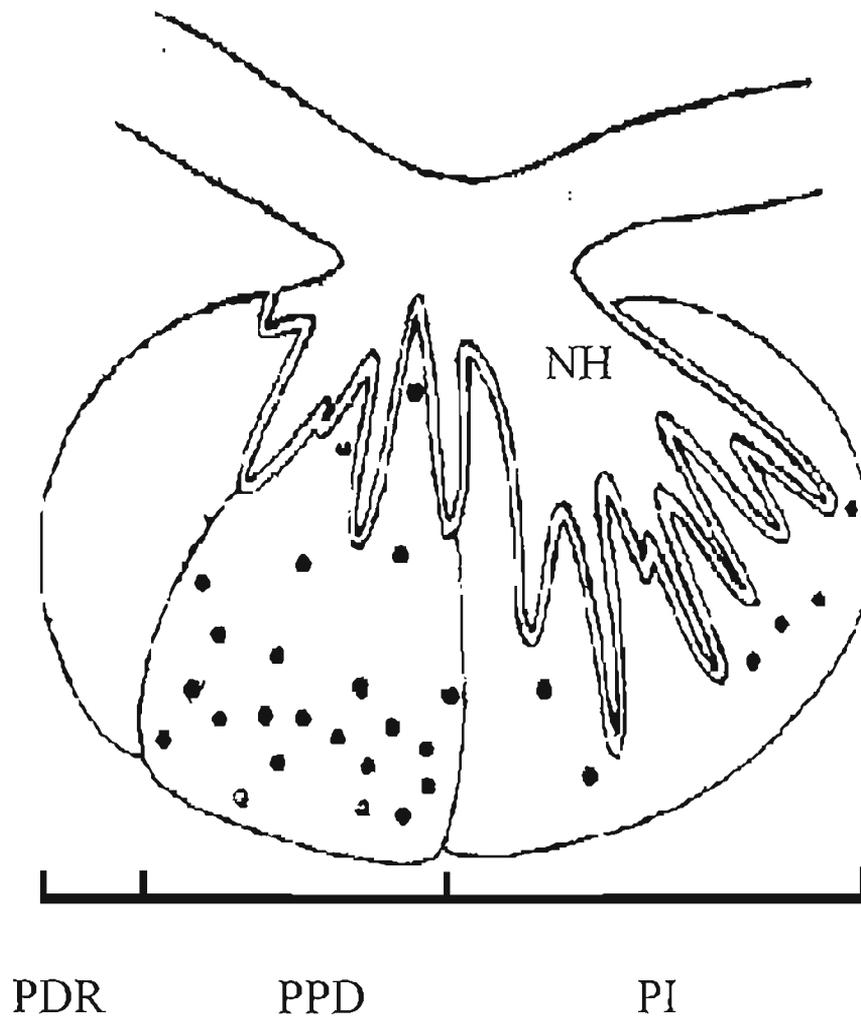


Figura 1.-Esquema de la hipófisis de ciprínido. *Pars distalis rostralis* (PDR), *pars proximalis distalis* (PPD), *pars intermedia* (PI) y neurohipófisis (NH). Las células somatotropas se localizan en la PPD. Modificado de Van Oordt y Peute (1983).

Regulación de la secreción de la hormona de crecimiento

La regulación de las concentraciones circulantes de la hormona de crecimiento en peces es multifactorial, existiendo varios mecanismos que modulan las diferentes concentraciones de esta hormona en el individuo. Por una parte, se encuentran los mecanismos mediados por diversas sustancias que inciden sobre la síntesis y expresión de esta proteína, ya sea estimulándola o inhibiéndola, mediante su acción a distintos niveles (transcripción y eventos postranscripcionales, traducción y eventos postraduccionales). Además, se encuentran los mecanismos que a través de diversas sustancias estimulan o inhiben la liberación de la hormona ya sintetizada, tanto a nivel de los gránulos en los que normalmente se almacena como a través de una vía constitutiva. Finalmente, existen diversos mecanismos que controlan la concentración circulante de la GH por medio de su interacción con proteínas "acarreadoras" en la sangre o bien, a través de los procesos que estimulan o inhiben su degradación.

El control de la secreción de GH constituye un ejemplo de la complejidad que presentan los fenómenos biológicos, en donde interactúan múltiples factores, obteniendo lo que en apariencia es una respuesta única, simple y con "sólo una entidad" que desencadena el fenómeno. En dicho sistema se pueden identificar varias moléculas que se clasifican como estimuladoras o inhibidoras de la secreción de GH. En la siguiente sección se mencionan algunas de ellas.

Sustancias estimuladoras de la secreción de hormona de crecimiento

Especialmente en el pez dorado, se han realizado numerosos experimentos con el fin de establecer el papel que juegan diferentes factores que participan en la regulación de la síntesis, la liberación o ambos de la GH. Los principales son los siguientes:

1) Hormona liberadora de la hormona de crecimiento (GHRH).

En los peces, la hormona liberadora de hormona de crecimiento (GHRH, GRH) originalmente fue aislada a partir de la carpa (cGRH). Cuenta con dos isoformas: una de 45 aminoácidos (cGRH₄₅) y otra con 29 (cGRH₂₉) y ambas poseen actividad secretagoga sobre los somatotropos (Vaughan y col.,1992). En estudios por medio de inmunodetección realizados en el encéfalo de pez dorado se ha determinado la presencia de GRH en el núcleo preóptico y en el área ventrobasal del hipotálamo, así como en axones de neuronas ubicadas en dichos núcleos. Estos axones inervan la adenohipófisis presentando sus terminaciones en las proximidades de las células somatotropas en la región próximo distal (PPD) de la glándula (Rao y col.,1996). La acción de la GRH está mediada por receptores de membrana que involucran una vía de transducción que conlleva al aumento de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) (Chang y col.,1993; Melamed y col.,1998). Hasta la fecha se desconoce si en los peces, la GRH induce un aumento en la cantidad de ARNm y del péptido de la hormona de crecimiento en las células somatotropas, tal y como ocurre en otros vertebrados.

Recientemente se ha identificado y caracterizado un receptor para la GRH en el pez dorado. Dicho receptor se describe como miembro de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con 7 dominios transmembranales y está constituido por 438 aminoácidos (Chan y col.,1998). El receptor utiliza al AMPc como segundo mensajero, y tiene una afinidad nanomolar por la GRH de carpa. Sus ARNm se encuentran en hipófisis y

cerebro, entre otros órganos como: branquias, gónadas, intestino, hígado y riñón (Chan y col.,1998).

En el pez dorado la efectividad de la GRH para estimular la liberación de GH parece depender de la etapa del ciclo sexual, pues en experimentos realizados con peces en las fases de recrudescencia tardía y madurez sexual no se registró capacidad inductora de la liberación de GH (Marchant y col.,1989); sin embargo, durante la regresión gonadal (etapa después de la reproducción, en la cual las gónadas no han reactivado de manera evidente la gametogénesis) la GRH es el principal estimulador de la secreción de GH (Vaughan y col.,1992; Peng y Peter, 1997).

2) *Péptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis*

El péptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis (PACAP) es una sustancia capaz de inducir la liberación de GH en el periodo de regresión del ciclo sexual (Peng y Peter, 1997; Melamed y col.,1998). Hasta la fecha, el PACAP se ha aislado de varias especies de peces como: salmón (Parker y col.,1993), bagre (McRory y col.,1995; Small y Nonneman, 2001), pez cebra (Fradinger y Sherwood, 2000), y mantiene una alta similitud entre ellas (Small y Nonneman 2001). En mamíferos GRH y PACAP son productos de diferentes genes, pero en el resto de los vertebrados ambos péptidos son codificados por el mismo gen, y el obtener uno u otro depende de cómo se realiza el procesamiento postranscripcional. Este procesamiento diferencial constituye un punto de interés para intentar comprender cómo la célula determina qué péptido será utilizado en algún momento particular (Wong y col.,2000).

El PACAP tiene dos isoformas, una de 38 aminoácidos y otra de 27. En teleósteos la forma predominante que se encuentra en el encéfalo es la de 38 aminoácidos.

Por el momento, en peces óseos, sólo se cuenta con un reporte, en la anguila, en que se ha localizado el PACAP en el núcleo preóptico posterior del hipotálamo y axones derivados de dichas neuronas que inervan la hipófisis (Montero et al. 1998). En pez dorado se localizaron axones con inmunorreactividad positiva a PACAP en la proximidad de las células somatotropas y, en estas últimas, receptores tipo I a PACAP (Wong y col.,1998). Experimentos en pez dorado demostraron que la liberación tanto *in vivo* como *in vitro* de GH es estimulada por la presencia de PACAP en el medio (Wong y col.,1998). No existe información en este grupo de vertebrados sobre si el PACAP estimula sólo la liberación de GH o también estimula la síntesis del ARNm de GH, pero esto último es posible, debido a que el PACAP utiliza al AMPc como segundo mensajero y, al menos en los salmónidos, el gen de GH cuenta con un elemento transcripcional de respuesta al AMPc que pudiera inducir la síntesis del mensajero de la hormona (Johansen y col.,1989; Yang y col.,1997; Argenton y col.,2002).

3) *Hormona liberadora de gonadotropinas*

Otra molécula con capacidad para inducir la secreción de GH en peces es la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). En el pez dorado la variante de salmón (sGnRH) es más efectiva que la GRH para inducir la liberación de la hormona de crecimiento durante la etapa de madurez sexual (Marchant y col.,1989; Peter y Chang 1999). La sGnRH induce también la síntesis del ARN mensajero de la hormona de crecimiento en esta especie tanto *in vitro* (Mahmoud y col.,1996; Klausen y col.,2001) como *in vivo* (Klausen y col.,2001). Sin embargo, en otras especies como la tilapia (*Oreochromis nilotica*) induce sólo la liberación de GH, y no la síntesis de ARNm de la hormona (Melamed y col., 1996, 1998), y en especies de salmónidos como la trucha arco iris (*Oncorhynchus mykiss*), la GnRH no induce síntesis del ARNm ni liberación de GH (Blaise y col.,1995). En el bagre, la GnRH

tampoco tiene actividad estimuladora de la liberación de GH (Bosma y col.,1997). De las isoformas de GnRH probadas sobre la inducción de GH, la que más atención ha recibido es la de salmón, pero en especies como el pez dorado, la tilapia y la carpa, también se ha comprobado *in vitro* e *in vivo* la efectividad de la variante de GnRH II proveniente de pollo (cGnRH-II) y la hormona liberadora de gonadotropina de mamífero (mGnRH). Es posible que isoformas de la hormona producidas por otras especies de teleósteos y otros vertebrados estimulen la secreción de GH, al menos en algunas especies de peces. El mecanismo que parecen seguir las GnRH para estimular la liberación de GH, es la vía mediada por la proteínacinas C, de una forma muy similar a la propuesta para las células gonadotropas (Chang y col.,1993). En trabajos de inmunolocalización de la GnRH en el encéfalo de especies como *Carassius auratus*, se reportan núcleos hipotalámicos que presentan neuronas productoras de esta hormona cuyos axones terminan en las proximidades de las células somatotropas en la hipófisis (Kim y col.,1995; Yu y col.,1988), siendo ello, una evidencia de la participación directa de esta hormona sobre los somatotropos.

Otros datos que apoyan el hecho de una interacción directa, es que en somatotropos de pez dorado se ha identificado un receptor para la GnRH. Dichos receptores parecen ser distintos de los que poseen las membranas de las células gonadotropas, pues se ha demostrado *in vivo* que los agonistas [His⁸]-, [Leu⁸]-, [Met⁸]- y [Tyr⁸]-mGnRH, son equipotentes a la sGnRH para estimular la secreción de GH, pero tienen un potencia significativamente menor para inducir la secreción de hormona gonadotrópica II (GtH-II)(Habibi y col.,1992). Otros resultados complementarios que permiten sugerir que se trata de diferentes receptores son: el antagonista de GnRH [Ac- Δ^3 -Pro¹,4FD-Phe²,D-Trp^{3,6}]-

sGnRH bloquea la liberación de GtH-II, pero estimula la liberación de GH; mientras que los antagonistas [Ac- Δ^3 -Pro¹,4FD-Phe²,D-Trp³,D-Arg⁶]-mGnRH y [Ac-D(2)-Nal¹,4Cl-D-Phe²,D(3)-Pal^{3,6},Arg⁵,D-Ala¹⁰]-mGnRH suprimen la liberación de GH pero incrementan la liberación de GtH-II (Murthy y col.,1993, 1994a, 1994b).

Estos hallazgos en su conjunto permiten sugerir que la GnRH es uno de los mayores estimuladores de la secreción de GH en pez dorado durante la etapa de madurez sexual.

4) Dopamina

Se ha reportado que la dopamina (DA) estimula la liberación de GH mostrando una alta capacidad para ello durante la fase de regresión, intermedia en la recrudescencia y baja durante la madurez (Peter y Chang 1999). La vía utilizada por la DA es por el subtipo de receptor D₁, hecho que ha sido corroborado por la utilización de agonistas específicos como el SKF 38393, mientras que antagonistas para dicho subtipo de receptor como el SKF 83566 o el SCH 23390, inhiben la liberación de GH (Wong y col.,1992, 1993).

Estudios autorradiográficos permitieron establecer que existe unión específica de la dopamina y sus agonistas específicos a receptores D₁ en la *pars proximalis distalis* de la hipófisis de pez dorado, que es la región que contiene a las células somatotropas. Los receptores D₁ son el mismo subtipo de receptor utilizado por los somatotropos en la carpa (Lin y col.,1993) y la tilapia (Melamed y col.,1996). El mecanismo seguido por la DA para la estimulación de la secreción de GH involucra la enzima adenilato ciclasa (AC) y la formación de AMPc como un segundo mensajero, debido a que en experimentos que se han utilizado sustancias que aumentan la concentración de AMPc como la forskolina o el IBMX o que imitan sus efectos como el 8-bromo-AMPc o dibutilil-AMPc, dan por resultado un aumento en la liberación de GH (Wong y col.,1993, 1994).

Sustancias inhibidoras de la secreción de hormona de crecimiento

Al igual que en todos los vertebrados, el principal inhibidor de la liberación de GH es la somatostatina 14 (SRIF-14 o SS-14)(Figura 2), siendo ésta capaz de inhibir la liberación inducida por todos los factores liberadores arriba mencionados. La distribución del péptido es amplia en el encéfalo de los peces, pero su presencia en el núcleo periventricular y fibras que parten de éste hacia la adenohipófisis, parecen corroborar que es el principal sitio productor de somatostatina 14 involucrado en el control de la liberación de GH (Oliverau y col.,1984, Pickavance y col.,1992).

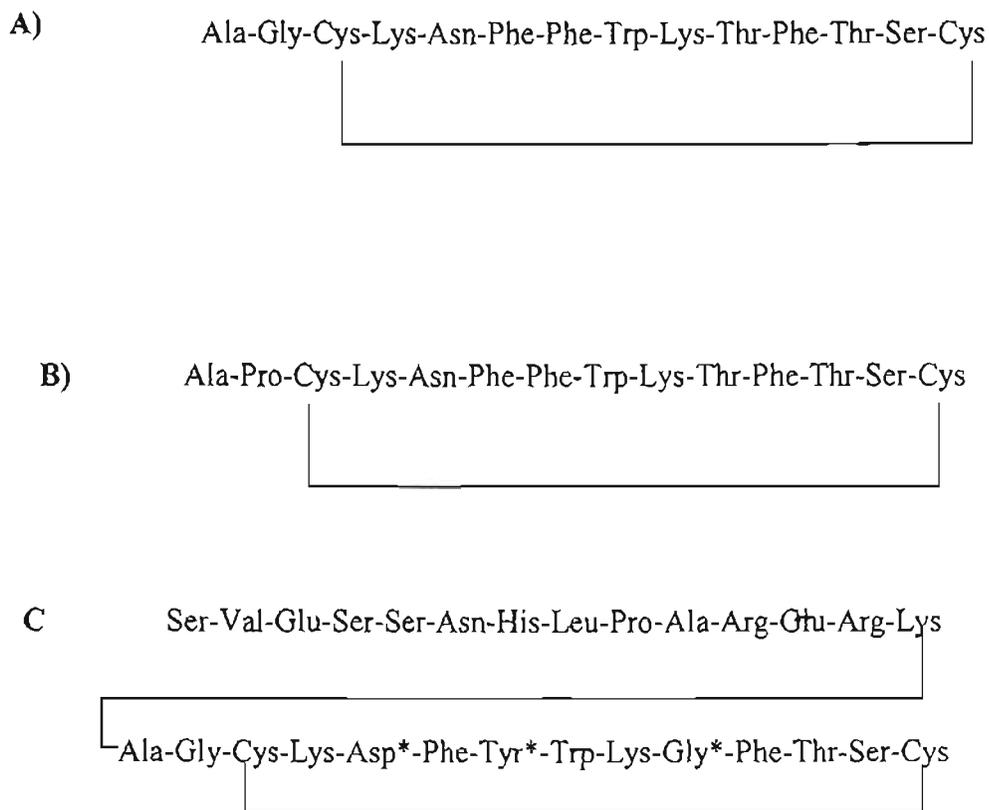


Figura 2.- Estructura primaria de las isoformas de somatostatina presentes en el pez dorado. A) somatostatina 14; B) somatostatina [PRO]²- 14; C) somatostatina 28. * indican aminoácidos diferentes en comparación con la somatostatina 14 y somatostatina [PRO]²- 14. (Tomado de Lin y col.1999a).

Resultados de estudios realizados *in vitro* demostraron que cuando la SRIF-14 es adicionada a fragmentos de hipófisis de pez dorado, se inhibe la secreción de hormona de crecimiento (Marchant y col.,1987). Los mismos resultados se observaron cuando se mantienen en cultivo fragmentos de hipófisis de carpa (Lin et al.,1993), tilapia (Melamed y col.,1996), trucha arco iris (Luo y col.,1990, Luo y McKeown 1991) y salmón (Le Bail y col.,1991), lo que hace suponer que la acción inhibitoria de la somatostatina sobre la liberación de la GH es generalizada en los teleósteos. Experimentos *in vivo* en los cuales se inyectó somatostatina-14 a ejemplares de *C. auratus*, también corroboran su papel como inhibidor de la liberación de GH al menos en pez dorado (Cook y Peter 1984).

Estudios en *Carassius auratus* mostraron que en diferentes áreas del encéfalo la concentración de somatostatina-14 varía a lo largo del año. En especial, en el hipotálamo se registró que durante la etapa de regresión gonádica la cantidad de somatostatina es mayor que durante la época de madurez sexual (Marchant et al.,1989). Una condición similar se presenta con el contenido de somatostatina en la hipófisis. En la misma especie, Lin y col.,(1999a) describieron que en el cerebro anterior (telencéfalo y diencefalo) de las hembras, pero no en los machos, se observan variaciones en la cantidad de ARNm de SRIF-14 en relación con la etapa sexual.

Estos autores reportaron que existe una menor cantidad de ARNm de SRIF-14 en esta región del cerebro durante la etapa de regresión en el mes de julio, mientras que en la época de madurez sexual (en abril) es cuando se incrementa la cantidad de ARNm de SRIF-14, con niveles intermedios de expresión durante la recrudescencia (diciembre).

Una variante de SRIF-14 encontrada en el encéfalo de pez dorado y reportada en este mismo trabajo es la [Pro²]-SRIF-14, que tiene una prolina en la segunda posición en lugar

de la glicina que se presenta normalmente en la SRIF-14. En dicha investigación se determinó que tanto para machos como para hembras se presentan variaciones estacionales en la cantidad de ARNm de esta isoforma en el telencéfalo y en el diencéfalo. Las hembras tuvieron la mayor expresión de esta variante en la etapa de regresión (julio) y menor en recrudescencia (diciembre) y madurez sexual (abril). En los machos, la mayor expresión fue en julio, intermedia en la recrudescencia y menor en abril.

En el mismo reporte, se presentan los resultados de la capacidad inhibitoria de la isoforma respecto a la liberación de GH en sistemas de perfusión de fragmentos de hipófisis de pez dorado. La [Pro²]-SRIF-14 fue equipotente a la SRIF-14 en inhibir la liberación de GH (Lin y col.,1999a). Recientemente esta isoforma también se aisló a partir de pollo (Trabucchi y col.,2001).

En el pez dorado, otras variantes de somatostatina como la SS-22 o SS-25 tienen una menor capacidad de inhibición en la liberación de GH (Marchant y col.,1987, Marchant y Peter 1989).

Datos recientes respecto a la posible influencia del estradiol sobre los niveles de expresión de los diferentes tipos de somatostatina en el cerebro de pez dorado, han permitido sugerir que sólo la SRIF-14 y la [Pro²]-SRIF-14 se ven afectadas por dicho esteroide, pues para la primera de ellas se registró un aumento de ARNm, mientras que en la segunda se detectó una disminución en los niveles de expresión de su ARN mensajero (Canosa y col.,2002).

Un esquema que resume el modelo del control de la liberación de la somatostatina se presenta en la figura 3.

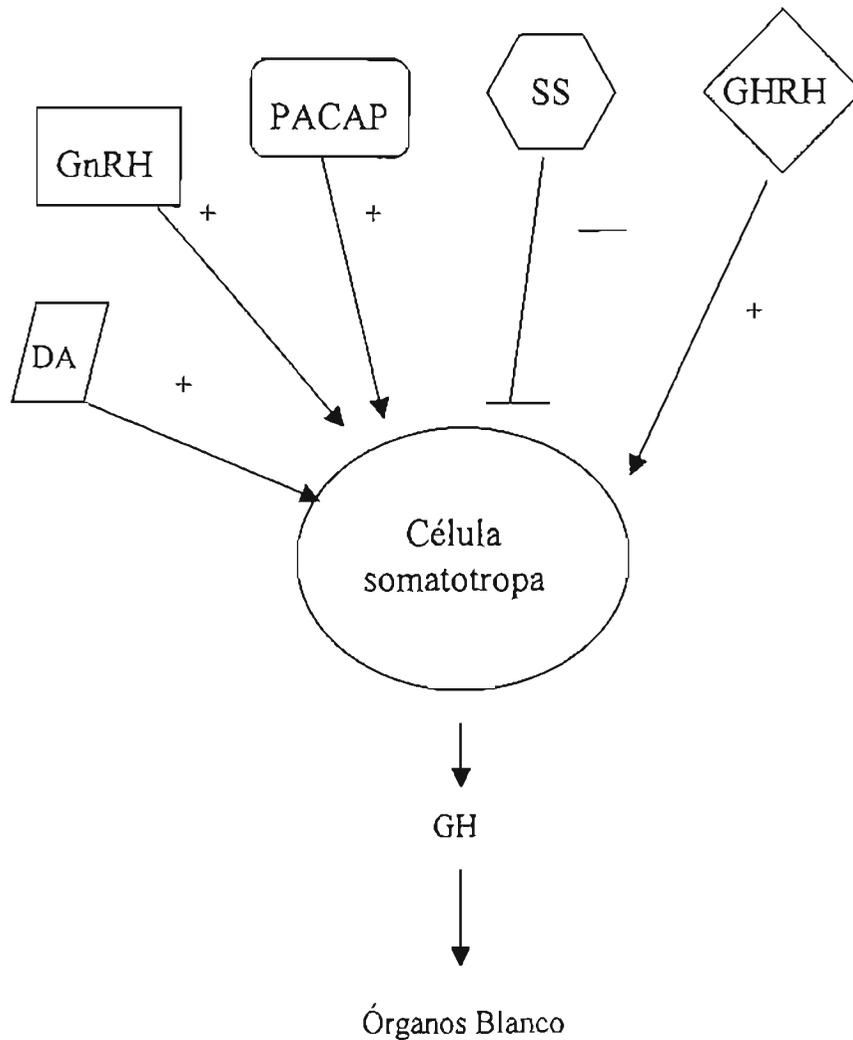


Figura 3.- Modelo de regulación de la secreción de la hormona de crecimiento (GH). Hormona liberadora de GH, GHRH; Hormona liberadora de gonadotropinas, GnRH; Dopamina, DA; Polipéptido activador de la adenilato ciclasa de la hipófisis, PACAP; Somatostatina, SS; efecto estimulador (+); efecto inhibitorio (-).

La inhibición de la liberación de GH causada por la somatostatina es mediada a través de receptores de membrana. En mamíferos se han descrito 5 subtipos de receptores a somatostatina (sst_1 , sst_2 , sst_3 , sst_4 , sst_5), pero en algunas especies como la rata el subtipo 2 tiene procesos de corte y empalme alternativos (Bruns y col.,1995; Viollet y col.,1995). Todos los subtipos se han identificado como pertenecientes a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, con siete dominios transmembranales, el extremo amino terminal en el exterior y el extremo carboxilo en el interior celular (Viollet y col.,1995; Patel y Srikant 1997). Sus composiciones varían de los 360 a 430 aminoácidos. Los cinco subtipos están agrupados en dos subfamilias con base en el grado de similitud entre ellos; una subfamilia incluye a los subtipos 1 y 4 mientras que la otra contiene a los subtipos 2, 3 y 5 (Hoyer y col.,1995; Bruns y col.,1995; Viollet y col.,1995). En especial, para el caso de las células somatotropas en mamíferos, la acción inhibitoria de la somatostatina se ha vinculado con el subtipo 2 (Raynor y col.,1993).

En el encéfalo y la hipófisis del pez dorado se han descrito los subtipos 1, 2, 3 y 5 de receptores a somatostatina ($gsst_1$, $gsst_2$, $gsst_3$ y $gsst_5$). Varios de estos subtipos se han encontrado con más de una isoforma (Lin y col.,1999b, Lin y col.,2000, Lin y col.,2002, Lin y Peter 2003). El $gsst_1$ es el primer ejemplo, habiéndose descrito dos isoformas: la sst_{1A} con 1491 pares de bases (bp) y la sst_{1B} de 1557 bp. Ambas secuencias tienen un sólo marco de lectura de 1104 bp que codifican para proteínas receptoras de membranas de 367 aminoácidos que incluyen al igual que en mamíferos, el extremo amino terminal extracelular, y en este, tres sitios potenciales de glicosilación (asparagina [Asn] 4, Asn¹⁸ y Asn²²). Se tienen 7 dominios transmembranales, incluida en el último de ellos, la secuencia YANSCANP. En su extremo carboxilo terminal se presentan dos sitios potenciales de

fosforilación (treonina [Thr] 148 y Serina [Ser] 241). Ambos ADNc para este subtipo de receptor en pez dorado comparten un 92% de similitud en su secuencia y 98% de parecido cuando son comparadas las secuencias de aminoácidos de las dos formas de sst_1 (varían en 5 de sus aa). Los receptores del subtipo 1 a somatostatina en el pez dorado tienen también una alta similitud al ser comparadas con el mismo subtipo de receptor en mamíferos, 76% para $gsst_{1A}$ y para $gsst_{1B}$ 75%.

Se determinó la presencia de ambos subtipos de sst_1 en diferentes áreas del encéfalo y la hipófisis en pez dorado a través de Northern blot. Los niveles de ARNm tanto para $gsst_{1A}$ y $gsst_{1B}$ fueron más altos en el bulbo olfatorio, telencéfalo, e hipotálamo que en el tálamo-techo óptico y el cerebro posterior. En la hipófisis sólo se detectó la presencia de $gsst_{1A}$ (Lin y col., 1999b).

Hasta la fecha se ha detectado una sola forma de $gsst_2$ (Figura 4). Los resultados reportados indican una secuencia de 1845 bp con un marco de lectura único de 1143 bp y 380 aa. El receptor tiene en su extremo amino terminal extracelular cuatro sitios posibles de glicosilación (Asn^{12} , Asn^{21} , Asn^{28} y Asn^{40}). Al igual que las formas de receptor anteriormente referidas, en el dominio transmembranal 7 se encuentra la secuencia YANSCANP característica de esta familia de receptores. En su extremo carboxilo terminal se distinguen 8 posibles sitios de fosforilación (Ser^{159} , Ser^{245} , Ser^{246} , Ser^{252} , Ser^{258} , Thr^{263} y Ser^{351}). La secuencia de aminoácidos deducida para $gsst_2$ tiene una similitud de 62% comparada con la secuencia de sst_2 de rata y del 41-47% comparada con otros subtipos de receptor de mamíferos. Al realizar el mismo análisis con $gsst_1$ fue de 42-43% (Lin y col. 2000).

Los ARNm de sst_2 se detectaron con una expresión alta en hipófisis, intermedia en telencéfalo e hipotálamo, moderada en el tálamo, techo óptico y cerebro posterior, y ausente en el bulbo olfativo (Lin y col.,2000).

El receptor $gsst_3$ tiene dos formas: $gsst_{3A}$ y $gsst_{3B}$. La primera de ellas tiene 1711 bp y el ADNc cuenta con un marco de lectura de 1434 bp. La segunda forma presenta 1497 pares de bases y su marco de lectura es de 1359 bp. Se traducen en proteína de 477 y otra de 452 aminoácidos, respectivamente. Las dos formas incluyen la secuencia YANSCANP en el dominio transmembranal 7, y tienen también varios sitios potenciales de glicosilación en su extremo amino terminal, así como residuos de serina y treonina susceptibles de fosforilación en su extremo carboxilo. La similitud de las formas de $gsst_3$ con el sst_3 de mamíferos es de entre el 54-60% (Lin y col.,2003).

En referencia a la expresión de $gsst_{3A}$, en el cerebro se presentó una expresión baja en el bulbo olfatorio, moderada en tálamo, techo óptico y cerebro posterior, y relativamente alta en telencéfalo, hipotálamo e hipófisis, mientras que $gsst_{3B}$ solamente se expresa de forma moderada en el cerebro anterior (Lin et al. 2003).

El subtipo $gsst_5$ tiene tres formas. El $gsst_{5A}$ tiene una secuencia de 2342 bp, un solo marco de lectura de 1173 bp que sirve para sintetizar un proteína de 390 aa. Igual que los otros subtipos de receptor a somatostatina descritos para la especie, contiene sitios potenciales de glicosilación en su extremo amino terminal, la secuencia YA/VNSCANP en el dominio transmembranal 7 y sitios que pueden ser blanco de la fosforilación en su asa 3 y el extremo carboxilo. Su similitud es de 49-53% respecto a sst_{5A} de mamíferos. Su expresión está restringida a la hipófisis (Lin et al. 2002).

El subtipo $gsst_{5B}$ cuenta con 1837 bp con un marco de lectura de 1173 bp que sirve para originar un receptor de 390 aminoácidos; $gsst_{5B}$ tiene un 87.7% de similitud con $gsst_{5A}$ y 68.7% en relación con $gsst_{5C}$. Este último es de 1389 bp, su marco de lectura es 1134 bp y la proteína de 377 aminoácidos. Tiene 65-70% de similitud con los sst_5 de mamíferos y 68.75% con $gsst_{5A}$. La distribución de $gsst_{5B}$ es en la hipófisis, no detectándose expresión en el encéfalo, mientras que $gsst_{5C}$ si tiene baja expresión en el bulbo olfatorio, hipotálamo, cerebelo e hipófisis, y moderada en el telencéfalo y techo óptico y tálamo (Lin y col.,2003).

Variaciones de la concentración sérica de GH durante el ciclo gonádico de Carassius auratus.

En hembras de pez dorado se han registrado variaciones en la concentraciones séricas de GH durante las diferentes etapas del ciclo gonádico, siendo estas concentraciones significativamente más altas durante la madurez (de 40 a 60 ng/ml), intermedias en la recrudescencia (20 ng/ml) y menores en la regresión (13 ng/ml) (Marchant y col.,1989).

Experimentos en los que hembras de esta especie son implantadas intraperitonealmente con estradiol en las diferentes etapas del ciclo sexual, mostraron que la concentración de hormona de crecimiento en suero fue siempre más alta que la encontrada en hembras no implantadas con estradiol (Tabla I) (Trudeau y col.,1992), lo que permite sugerir una posible asociación entre altas concentraciones séricas de estradiol y el aumento de la secreción de GH, y por ende, en sus concentraciones circulantes.

En otros experimentos en los que se implantó estradiol a hembras de pez dorado, se evaluó la cantidad de hormona de crecimiento y la expresión de ARNm en la hipófisis, encontrándose una mayor cantidad de hormona, pero no una mayor cantidad de su ARNm (Zhou y col.,1997), por lo que se sugiere que el aumento de hormona no se debe a cambios

en la expresión del gen, sino que puede deberse a eventos postranscripcionales, traduccionales o postraduccionales, y hasta la fecha, no se dispone de reporte alguno que indique si en esta especie el gen de la GH cuenta o no con un elemento de respuesta a estradiol. Otra posibilidad es que, como se observa en pez dorado, el estradiol eleve las cantidades de algunas hormonas que a su vez estimulan la producción y liberación de GH como la GnRH (Mahmoud y col.,1996; Klausen y col.,2001). Sin embargo, en especies como tilapia, la GnRH no estimula la síntesis de GH (Melamed y col.,1996, 1998), pero sí su secreción, mientras que en trucha, no induce ninguno de estos eventos, pero las concentraciones de GH se elevan durante la madurez sexual (Blaise y col.,1995), lo que implica que deben existir varios mecanismos asociados a esta etapa sexual que conlleven al aumento de la hormona de crecimiento en la circulación en los diferentes grupos de teleósteos.

TABLA I

MES	GH en suero (ng/ml) sin tratamiento	GH en suero (ng/ml) Tratadas con estradiol
April	96.5 ± 19	281.6 ± 73.8
Mayo	165.7 ± 24.7	784.7 ± 154.4
Julio	48.4 ± 10.4	182.4 ± 63.5
Octubre	84.4 ± 33.3	389.5 ± 106.5
Febrero	127.9 ± 21.8	420.5 ± 84.2
Marzo	95.2 ± 15.7	230.2 ± 35.3
Mayo	140.0 ± 41.5	545.6 ± 100.6
Octubre	48.8 ± 10.6	241.6 ± 61.3

Tomada de Trudeau et al. (1992)

Otra alternativa es que el estradiol disminuya la síntesis o la liberación de somatostatina en los núcleos hipotalámicos que inervan a las células somatotropas, con la consecuente disminución de la inhibición de la secreción de GH, aunque esto sólo podría explicar el

aumento de la hormona de crecimiento en suero de manera parcial, pues continuaría sin contestarse la pregunta de cuál es el mecanismo para aumentar la cantidad de GH en las células somatotropas.

Una disminución de los receptores a somatostatina en las células productoras de GH podría ser otro mecanismo para aumentar la concentración de hormona de crecimiento en el suero. Esta posibilidad se vislumbró a partir de experimentos realizados con truchas arco iris juveniles, en las que un grupo de peces fueron implantados con estradiol, y posteriormente sus hipófisis retadas con somatostatina. La respuesta obtenida fue que las hipófisis extraídas de organismos que recibieron los implantes de estradiol resultaron significativamente menos sensibles al inhibidor (Holloway y col.,1997).

Por su parte, en hembras de *C. auratus*, la testosterona también estimula la liberación de la GH, aunque en cantidades bastante menores que el estradiol (Trudeau y col. 1992). Hasta la fecha, no se conoce si dicho efecto de la testosterona es directo o vía aromatización de la molécula para ser convertida en estradiol.

Planteamiento del problema.

Con base en lo anterior, nos planteamos la pregunta de si cuando se presentan altas concentraciones de estradiol en hembras de pez dorado, como por ejemplo, durante la madurez sexual, los niveles del subtipo 2 de receptor a somatostatina disminuyen en la hipófisis, y que ello contribuyera a una menor sensibilidad a la acción de la somatostatina, como uno de los posibles mecanismos que subyacen al incremento de la concentración de GH en suero durante esta etapa.

HIPÓTESIS

Cuando en hembras de pez dorado se presentan altas concentraciones de estradiol en suero, disminuye la sensibilidad de las células somatotropas a la somatostatina, ocasionada a su vez por una disminución de los receptores sst2, lo que propicia un aumento en la concentración de GH en sangre.

OBJETIVO

Objetivo general:

Determinar si disminuye el efecto inhibitorio de la somatostatina sobre la secreción de GH, en hipófisis de hembras de pez dorado, cuando se presentan altas concentraciones de estradiol ya sea debido a la madurez sexual o por implantes de estradiol.

Objetivo particulares:

Determinar si bajo condiciones de concentraciones altas de estradiol circulante, se presentan variaciones en la expresión del ARN mensajero de sst2 en la hipófisis de hembras de pez dorado.

Determinar si bajo condiciones naturales existen diferencias en el contenido de GH en las hipófisis de hembras maduras y hembras en regresión sexual.

METODOLOGÍA

Animales

Para los experimentos y muestras tomadas en México, las hembras de pez dorado (*Carassius auratus*) fueron compradas en piscifactorias locales, mantenidas con un fotoperíodo correspondiente al de la Ciudad de México (12.5-11.5 horas luz-oscuridad, para hembras maduras, 11.5-12.5 horas luz-oscuridad, para hembras en regresión) y una temperatura de 22°C para hembras maduras y 20°C para hembras en regresión. Los animales fueron alimentados con un producto comercial balanceado (Wardley para peces tropicales, presentación en hojuelas). Los organismos fueron mantenidos en estas condiciones al menos durante las dos semanas previas a su utilización experimental.

En el caso de los experimentos realizados en Canadá, las hembras de pez dorado se compraron a My Parnell Fisheries (Mecerburg, PA), y fueron mantenidas con un fotoperíodo artificial (18 horas de luz- 6 horas de oscuridad) correspondiente a los meses de Junio, Julio y Agosto de Edmonton, Canadá. Se le administró alimento comercial balanceado (United Feeds, Calgary, Canadá) y se mantuvieron así, al menos durante las dos semanas previas a cualquier manipulación. Debido a los meses del año (Julio y Agosto) en los cuales se realizaron estos experimentos, las hembras se encontraban en etapa de regresión gonádica (índice gonadosomático [IGS] de 2% o menor).

La diferencia entre fotoperíodos utilizados se debió a la situación geográfica del origen de las poblaciones de peces en los dos países.

Los criterios para determinar la etapa sexual en que se encontraban las hembra fue el índice gonadosomático; 2% o menor, hembras en condiciones de regresión y 7.5% o mayores como hembras maduras. Con porcentajes intermedios (2.1% a 7.4%) los peces se consideraron como recrudescentes .

Procedimientos experimentales.

Debido a que tanto el estradiol como la testosterona aumentan la concentración de GH en suero, se planteó el propósito de llevar a cabo implantes de ambos esteroide para registrar si ambos disminuían la sensibilidad de hipófisis a la SRIF-14 y los niveles de expresión del ARNm de sst₂. Para los implantes se utilizaron filamentos sólidos de silicón que contenían 17-β estradiol (100 µg/g de peso corporal), alcanzándose concentraciones de hasta 6 ng/ml, o testosterona (100 µg/g de peso corporal), llegando a concentraciones de hasta 5 ng/ml. El grupo testigo fue implantado sólo con polímero. Los filamentos fueron manufacturados de acuerdo a la metodología descrita por Pankhust et al. (1986).

Las hembras fueron implantadas intraperitonealmente siguiendo el protocolo descrito por Trudeau et al. (1991). Brevemente, la metodología implica retirar una o dos escamas de la región abdominal del organismo por medio de una pinza fina, practicar una pequeña incisión en la piel descamada y por ella introducir un fragmento del polímero en la proporción correspondiente, de un tamaño proporcional al peso del individuo. Después de cinco días, los organismos fueron anestesiados con metonsulfanato de tricaína (MS-222) a una concentración de 5 ppm. Los peces se pesaron y se les extrajeron muestras de sangre (0.8-1 ml) de la aorta dorsal por medio de una jeringa insulínica. Cada muestra de sangre se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, se centrifugó a 2000 rpm a 4°C, dejándosele reposar toda la noche a la misma temperatura. Al día siguiente, el suero fue separado de los elementos formes, se le agregó 1 µl de una solución acuosa de timerosal al 1%, y se congeló a -25°C hasta la cuantificación de GH por radioinmunoanálisis. Se obtuvieron 5 muestras de sangre por tratamiento, en cinco replicas experimentales (n= 25 peces por tratamiento).

Experimentos de perfusión.

Las hembras se sacrificaron y sus hipófisis fueron colectadas en solución de Hank adicionada con 0.3% de albúmina sérica de bovino (HHBSA) y mantenidas a 4°C durante el tiempo de colecta. Posteriormente fueron lavadas tres veces en la misma solución, se fragmentaron con un cortador de tejidos y se colocaron en cámaras de perfusión. Se colectaron 10 hipófisis por cada uno de los tres grupos (17- β estradiol, testosterona y testigo) y se colocó la tercera parte (3.3 hipófisis) en cada cámara. Las hipófisis fueron mantenidas durante toda la noche con medio M-199 adicionado con 15 mM HEPES y nistatina (56 U/ml), a un flujo de 5 ml/hora y una temperatura constante de 18°C. Al día siguiente, el medio fue cambiado a HHBSA al 0.1%, 15 mM HEPES y el flujo incrementado a 15 ml/hora.

Después de dos horas de mantener las condiciones descritas anteriormente, se inició la colecta de medio, una fracción cada 5 minutos (1.25 ml/fracción). Pasada una hora, se aplicó un pulso de somatostatina 1 nM durante dos minutos y se continuó con la colecta de medio durante los 50 minutos posteriores al pulso.

Los experimentos de perfusión se realizaron por triplicado. Esta metodología ha sido previamente validada (Chang y col.,1990).

El medio colectado fue almacenado a -25°C hasta la determinación de hormona de crecimiento por radioinmunoanálisis.

Un diagrama que ilustra ésta metodología se muestra en la figura 5.

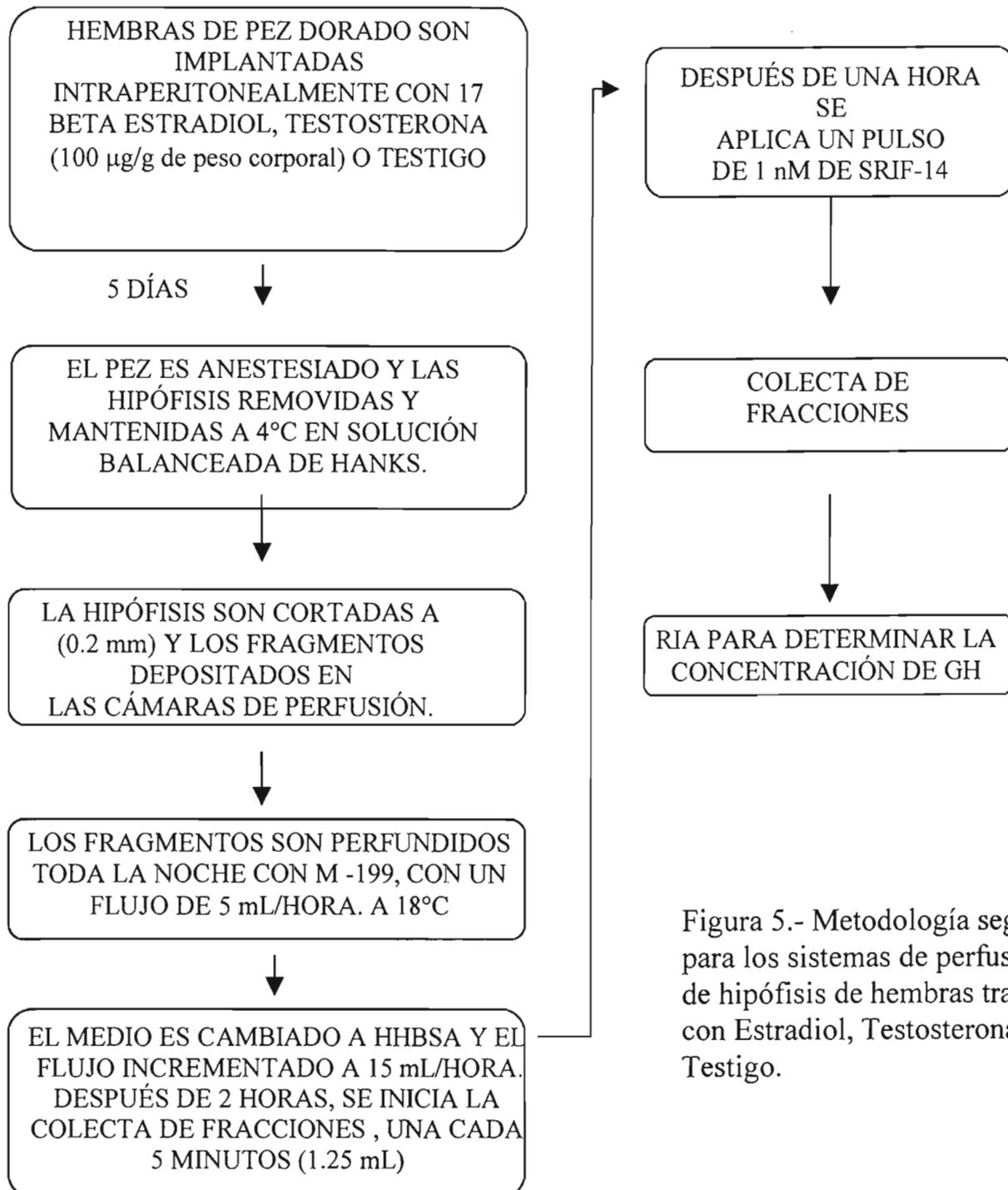


Figura 5.- Metodología seguida para los sistemas de perfusión de hipófisis de hembras tratadas con Estradiol, Testosterona y Testigo.

Cultivos estáticos.

Para el desarrollo de estos experimentos se emplearon hembras de *C. auratus* en condiciones de regresión gonádica (IGS 2% o menor), mismas que se anestesiaron con MS 222 a una concentración de 5 ppm. De dichas hembras se obtuvieron muestras de sangre con la metodología ya descrita. Las muestras fueron congeladas a -25°C hasta la determinación de la GH por radioinmunoanálisis. Una vez extraída la sangre, los peces se sacrificaron y sus hipófisis se colectaron en solución de Hank adicionada con 0.3% de BSA y se mantuvieron a 4°C durante el tiempo de colecta.

Posteriormente, las glándulas se lavaron en tres ocasiones y se fragmentaron manualmente, se depositaron tres hipófisis en cada pocillo de cultivo (cajas Falcon de 24 pocillos, modelo 3047) y fueron cultivadas toda la noche con medio M-199 a pH 7.2, adicionado con nistatina (56 U/ml), en una incubadora a 28°C , con aire y 5% de CO_2 , y humedad saturada. El número total de pocillos que contenían hipófisis fue de nueve. Los experimentos tuvieron tres réplicas.

En la mañana siguiente, el medio se cambió por 2 ml de solución Hank adicionada con 0.1% de BSA y nistatina (56 U/ml) a cada pocillo. El medio se reemplazó a los 60 minutos y fue renovado 2 veces más con una diferencia de 30 minutos antes de ser colectado. Después de un cuarto cambio, el medio condicionado y los fragmentos de hipófisis correspondientes a tres pocillos con 0.5 de solución de Hank fueron recuperados y congelados con hielo seco. Las hipófisis remanentes fueron tratadas con una solución de HHBSA adicionada con 1nM de SRIF-14. Treinta minutos más tarde se retiró el medio con somatostatina y se colectó un nuevo grupo de hipófisis con 0.5 ml de medio sin

somatostatina. Todos estos materiales fueron congelados. Las glándulas restantes fueron cultivadas otra media hora con HHBS y al final de este tiempo, el medio y las hipófisis fueron colectadas por separado. Tanto el medio como las hipófisis fueron mantenidas a -40°C hasta su análisis. Cada experimento fue realizado tres veces.

Experimentos idénticos se llevaron a cabo con hipófisis obtenidas de hembras de pez dorado en condiciones de madurez sexual (IGS 6.5% o superior).

Posteriormente, las hipófisis colectadas fueron descongeladas, lavadas y homogenizadas una vez con inhibidores de proteasas (Complete®) en agua bidestilada y desionizada a pH 9.0, para después volver a ser congeladas con hielo seco y mantenidas a -40°C, hasta que se analizaron alícuotas de las muestras por RIA para determinar el contenido de GH, y por la técnica de Bradford (1973) para cuantificar el contenido de proteínas totales presentes en la muestra. Un diagrama que ilustra la metodología seguida se muestra en la Figura 6.

Procedimientos de Radioinmunoanálisis

A) Hormona de crecimiento

El radioinmunoanálisis efectuado fue de tipo competitivo utilizando hormona de crecimiento de carpa marcada con ^{125}I por el método de peroxidasa. El pico de actividad se encontró en la fracción número 6 y contó con una eficiencia de marcado superior al 80% en todos los casos. Alícuotas de dicha fracción fueron tomadas y diluídas en amortiguador de barbital a pH 8.6 con BSA al 3 %, posteriormente se tomaron 10 μl de cada una de las fracciones del medio de cultivo y se les agregó 100 μl de amortiguador de barbital pH 8.6 adicionado con BSA al 3% y anticuerpo anti-GH de carpa en una dilución 1:50,000. Para cada una de las fracciones se contó con un duplicado. Las muestras de medio con

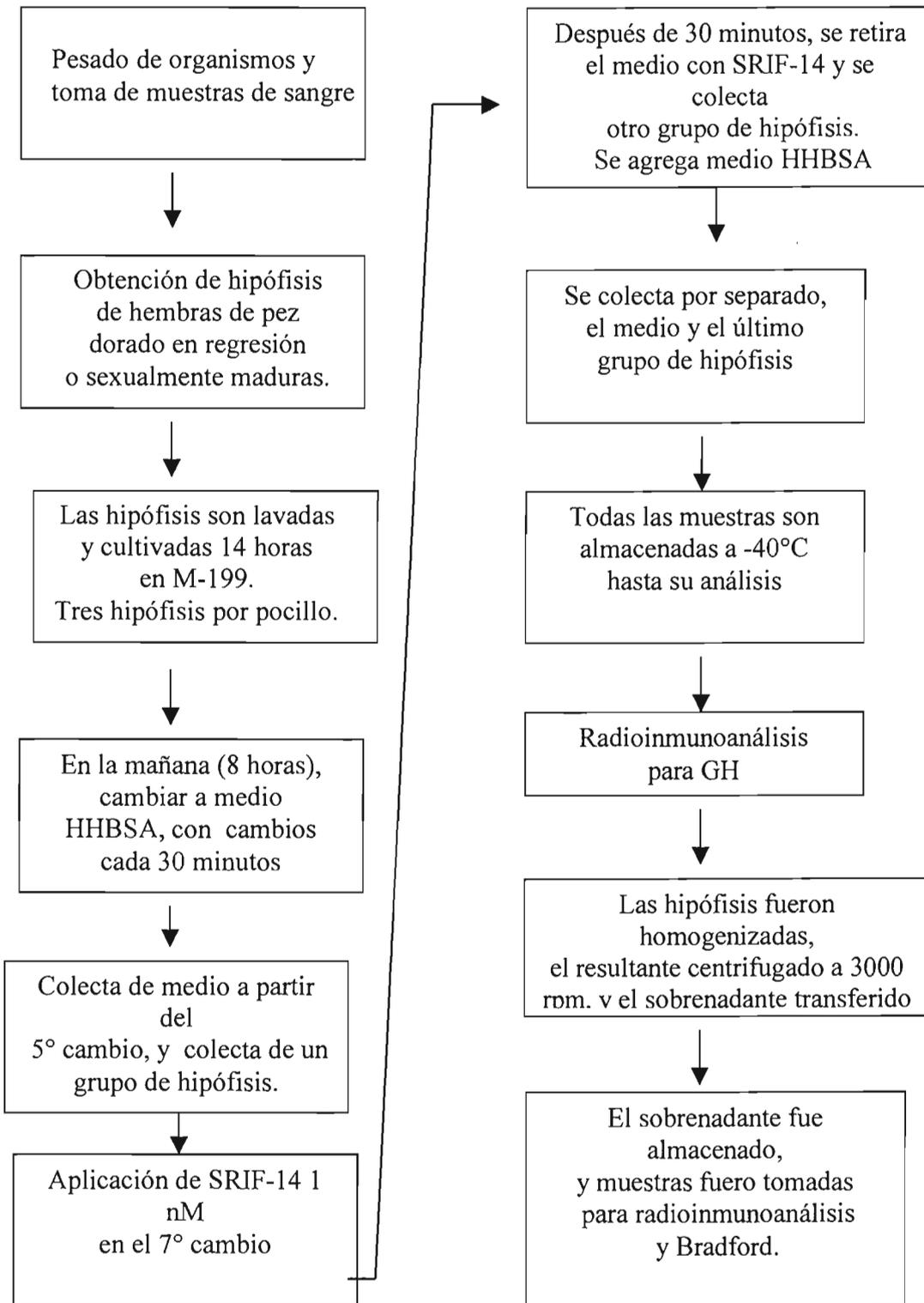


Figura 6.- Diagrama de la metodología seguida para la realización de experimentos bajo condiciones naturales (cultivos estáticos).

amortiguador y el primer anticuerpo se incubaron a 4°C durante 24 horas. Después de este tiempo se les agregó a cada uno de los tubos de incubación 100 µl de la hormona de crecimiento de carpa marcada radiactivamente. La mezcla se incubó nuevamente por 24 horas y al término de este lapso, se les adicionó a cada una de las muestras 200 µl de IgG de chivo antiinmunoglobulina de conejo a una dilución final de 1:1,000 y nuevamente incubadas a 4°C durante 24 horas. Después de este tiempo los tubos fueron centrifugados a 4000 g durante 30 minutos, el sobrenadante decantado y se midió la radioactividad presente en la pastilla. La determinación de la radioactividad presente en cada fracción fue realizada por medio de un contador gamma ICN mod. 10/600 de diez canales. Los coeficientes de variación interensayo fueron de $10.8\% \pm 0.9$, y el coeficiente de variación intraensayo de $7.3\% \pm 1.1$.

Los anticuerpos anti-cGH y anticonejo fueron proporcionado por el Dr. R.E. Peter (Universidad de Alberta, Facultad de Ciencias, Departamento de Ciencias Biológicas, Edmonton, Alberta, Canadá).

B) Estradiol

Se determinó la concentración de estradiol a las muestras de sangre obtenidas de hembras en regresión y maduras (n= 15 peces/ etapa del ciclo sexual) de acuerdo con las instrucciones del estuche de reactivos de DiaSorin s.r.l. (Italia) cat. 200/007-818.

Extracción de ARN y cuantificación de la expresión del ARNm del receptor a SRIF-14 del subtipo sst₂.

Para la obtención de ARN total se utilizaron hipófisis de hembras de *Carassius auratus* (n= 15 hembras/grupo) en etapa de regresión gonadal tratadas con estradiol, testosterona o sin tratamiento (testigo) (Trudeau y col.,1991). La técnica de extracción de ARN total se realizó con reactivo Trizol, que se basa en el método descrito por Chomczynsky y Sacchi (1987). La cantidad de ARN fue determinada midiendo la densidad óptica de una dilución 1:1,000 de ARN en un espectrofotómetro PGC Scientifics mod. 690. La integridad del ARN obtenido fue corroborada por medio de electroforesis en geles de agarosa al 2% y la presencia de 2 bandas correspondientes a los ARN ribosomales.

Para establecer el grado de expresión del ARNm de sst₂, muestras con 20 µg de ARN total fueron sometidas a electroforesis en geles de agarosa al 1.5% con 3% de formaldehído. El gel se corrió a 100 Volts durante una hora y media aproximadamente, usando como amortiguador MOPS 20 mM adicionado con 7.5% de formaldehído. Los ARN fueron transferidos del gel a una membrana de nylon Hybond por la técnica de transferencia capilar. Las membranas fueron secadas y los ARN fijados por exposición a la luz ultravioleta.

Las sondas de ADN: sst₂-1 (5'TGGACACGAAATGGACGTTTC3') y sst₂-2 (5'GAAGC-CTCTAAAAGCTGG3'), diseñadas para la obtención del ADNc de sst₂ fueron incorporadas a una mezcla que contenía el juego de reactivos T7QuickPrime®, y se usó como molde la secuencia del ADN plasmídico que con anterioridad demostró tener incorporado el gen de gsst₂ (Lin y col.,2000). La sonda fue marcada con [α -P³²]-CTP.

El procedimiento de hibridación se realizó según el método descrito por Church y Gilbert (1984), que consiste en llevar a cabo una prehibridación de las membranas con el mismo amortiguador de hibridación (Solución de NaHPO_4 0.5 M, lauril sulfato de sodio (SDS) al 7%, EDTA 1 mM y BSA al 1%) por una hora a 65°C . Después de este tiempo la solución es desechada y se agrega solución amortiguadora adicionada con la sonda previamente marcada. El sistema se mantiene a 65°C durante toda la noche, para por la mañana siguiente descartar la solución de hibridación y lavar las membranas con una solución de lavado (NaHPO_4 0.4 M, 1 mM de EDTA y 1% de SDS) en tres ocasiones. Posteriormente, las membranas son secadas y colocadas en un cassette que contiene una pantalla sensible a radiación (Phosphoimaging screen, Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) durante 72 horas. Al cabo de este tiempo, el rastro de radioactividad es registrado a través de un escáner PhosphoImager 445 SI (Molecular Dynamics) y las imágenes analizadas con el programa ImageQuant (molecular Dynamics). Se utilizó ARN de α -actina como control. (Figura 7).

Este procedimiento fue utilizado también para analizar la presencia del ARNm de *sst2* en las hipófisis de hembras en regresión y de hembras maduras ($n= 30$ peces/ etapa del ciclo sexual).

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando la prueba de ANOVA ($p<0.05$) para demostrar diferencias entre grupos.

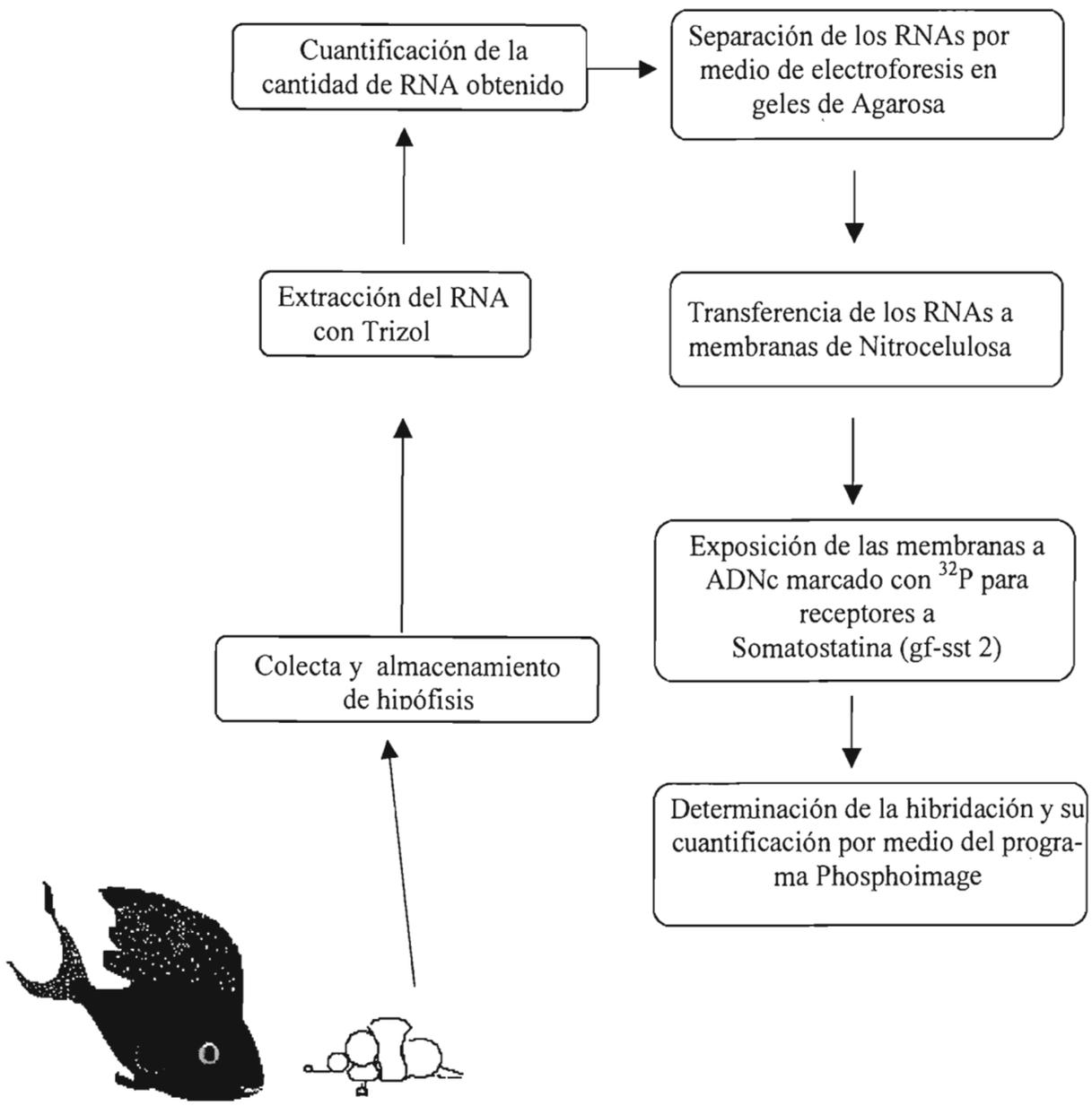


Figura 7.- Metodología seguida para medir los niveles de ARNm de receptores a somatostatina sst2.

RESULTADOS

1) Efectos de tratamientos hormonales (aplicación de estradiol o testosterona) en hembras en regresión.

1. a) Concentraciones de GH en el suero.

En la Figura 8 se presentan las concentraciones de GH en suero de peces hembras en regresión tratadas con estradiol o testosterona y comparadas con las hembras del grupo testigo. En las hembras que se trataron con estradiol la concentración de GH aumentó de manera significativa en relación con el grupo testigo (137%), mientras que en las hembras que recibieron testosterona, la concentración de GH también aumentó, pero el incremento fue menos evidente (68%).

1. b) Liberación de GH en hipófisis perfundidas en respuesta al tratamiento con somatostatina

La liberación basal de GH vertida al medio proveniente de las hipófisis de los animales tratados con estradiol , mostró valores que oscilaron de forma estable entre 99 y 105 ng/ml para las fracciones colectadas 7 a 11, en comparación con las cantidades de GH vertidas en fracciones previas (1-6). Después del pulso de SRIF-14 1nM en la fracción 12, los efectos inhibidores de dicha sustancia sobre la liberación de GH se hicieron evidentes en la fracción 15 (15 minutos después de la aplicación del inhibidor), obteniéndose un punto máximo de inhibición en la fracción 16 con un valor de 82.82 ± 6.11 ng/ml. A partir de la fracción 17 se observó un incremento en la GH liberada hasta obtener una recuperación de los valores de concentración similares o aún mayores a las condiciones previas al pulso (120-130 ng/ml) entre las fracciones 18-21.

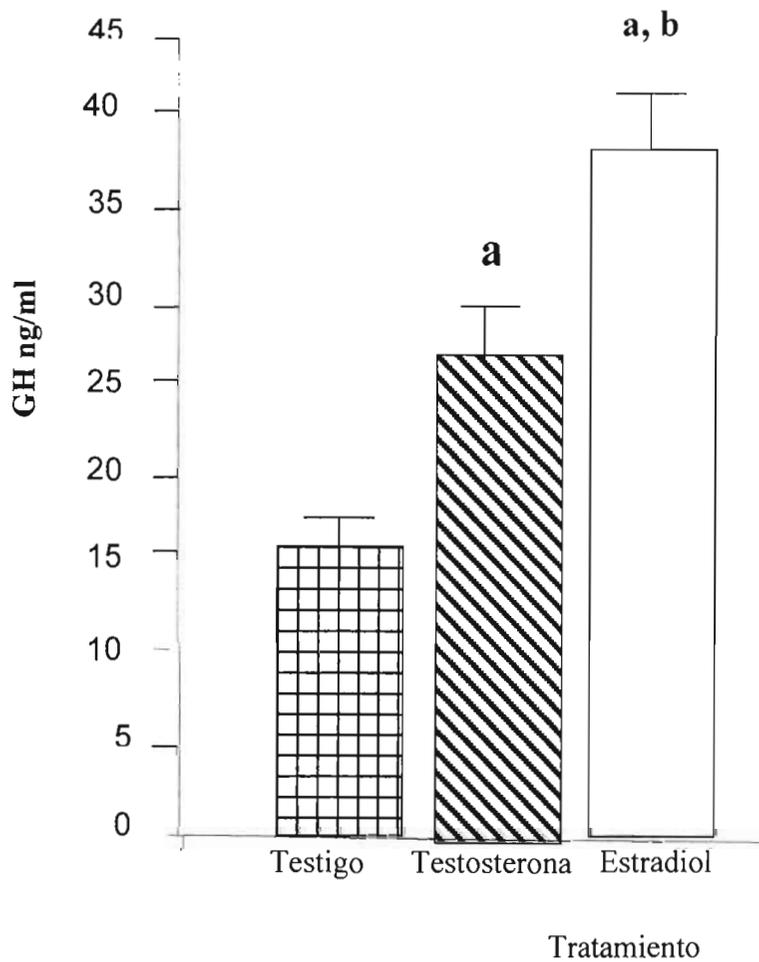


Figura 8.- Efecto de tratamientos con estradiol o testosterona sobre la concentración de GH en suero de hembras de pez dorado en regresión gonadal. Los valores son la media \pm S.E.M. ($n = 5$ muestras/colecta, y se realizaron 5 colectas). El análisis estadístico utilizado fue ANOVA. **a**, $P < 0.05$ vs grupo testigo. **B**, $P < 0.05$ vs grupo tratado con testosterona.

Las glándulas del grupo tratado con testosterona vertieron cantidades de GH que variaron entre los 55 y 70 ng/ml (fracciones 1-11). De la misma manera que para el grupo anterior, el pulso de somatostatina fue aplicado en la fracción 12. En el punto de inhibición máxima (fracción 16, 20 minutos postpulso), la cantidad de hormona de crecimiento liberada al medio fue de 41.73 ± 6.53 ng/ml. Un aumento en la liberación de GH comenzó en la fracción 17, llegando a valores similares a los registrados antes de la aplicación de SRIF-14 (55-62 ng/ml), a partir de la fracción 19 y manteniéndose así en las fracciones 20 y 21. Las hipófisis de hembras del grupo testigo fueron las que menor cantidad de hormona exportaron al medio, con concentraciones basales que se encontraron entre los 34 y 43 ng/ml. Los efectos de la somatostatina fueron apreciables desde la fracción 14 obteniéndose la menor liberación de GH en la fracción 16 con 29.79 ± 5.5 ng/ml. Cantidades de GH similares a las vertidas antes de la aplicación del inhibidor fueron registradas hasta la fracción 21.

En término de porcentaje, el tratamiento de los fragmentos hipofisarios con el pulso de SRIF-14 1nM produjo una reducción significativa de la liberación de GH en las glándulas provenientes de los 3 grupos de peces (Fig. 9A). Las hipófisis de animales tratados con testosterona respondieron en forma semejante a las de los animales testigo (Fig. 9A y 9B). En ambos casos los fragmentos de hipófisis mostraron un decremento de la liberación de GH en la primera fracción posterior al pulso de SRIF, y dicha disminución en la liberación se mantuvo hasta por 40 minutos (8 fracciones) y se observó una recuperación a las concentraciones basales hasta los 45 minutos (Fig. 9 A). Por su parte, en

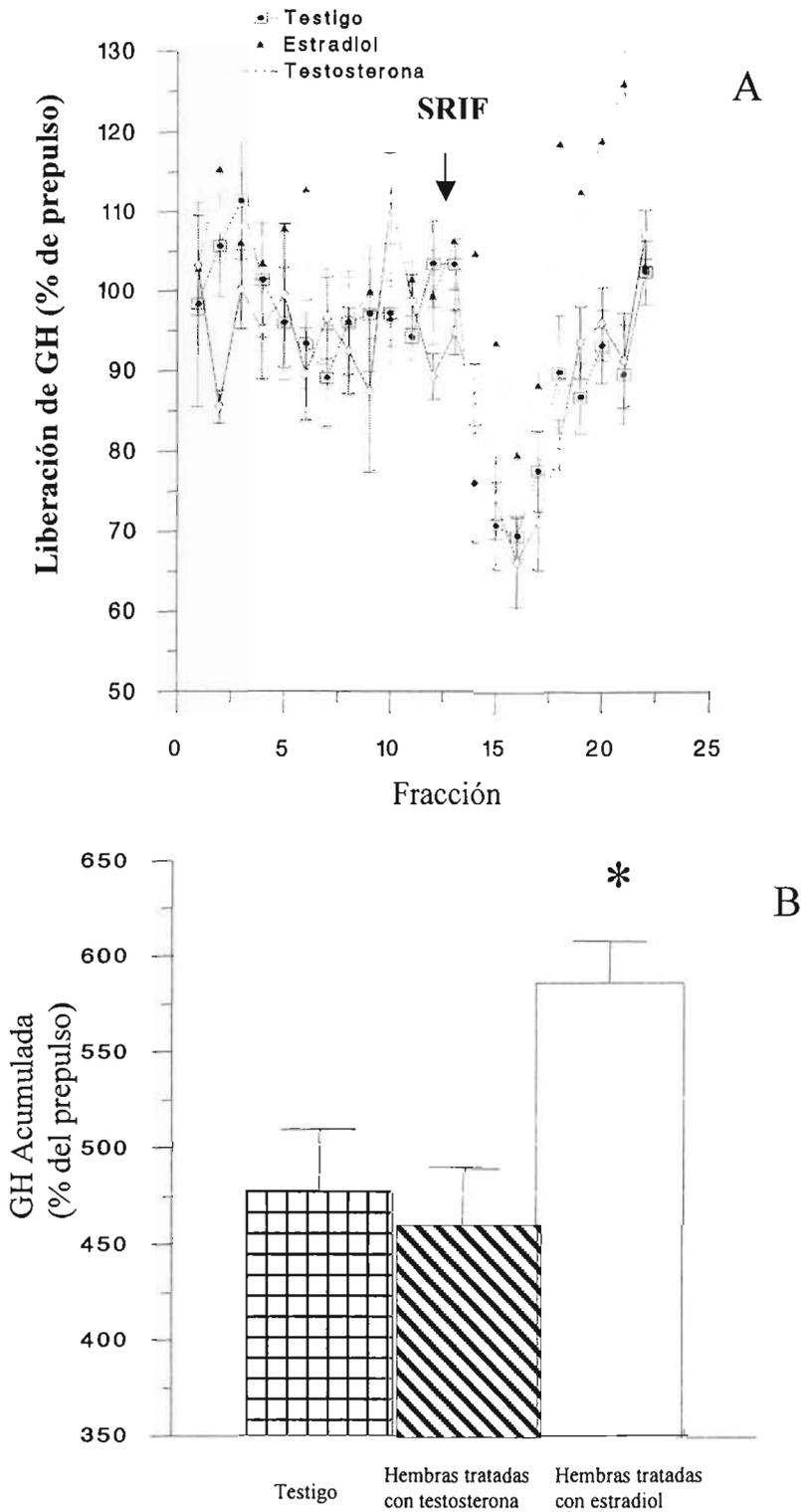


Fig. 9.- (A) Efecto de un pulso de 2 minutos de 1 nM de SRIF sobre la liberación de GH en fragmentos hipofisarios de hembras en regresión implantadas con estradiol, testosterona o polímero durante 5 días. La liberación de GH se expresa como porcentaje de la concentración prepulso. Cada punto es la media de datos de nueve columnas. (B) Respuesta de GH acumulada en las ocho fracciones postpulso medidas como porcentaje de la concentración de GH durante el periodo prepulso. El asterisco indica diferencia significativa (ANOVA, $p < 0.05$). Los valores son la media \pm SEM.

los fragmentos hipofisarios de los peces tratados con estradiol se observó una disminución significativa de la liberación de GH en respuesta al pulso de SRIF-14 hasta los 15 minutos (tercera fracción posterior al pulso, Fig. 9A), la inhibición duró sólo 10 minutos (2 fracciones) y se observó un incremento en la liberación de GH por arriba de los valores basales, aunque no se encontró una diferencia significativa con estos. La respuesta acumulada para la GH liberada en las ocho fracciones postpulso fue significativamente mayor en las glándulas provenientes de peces tratados con estradiol, en comparación con las de peces testigo y los tratados con testosterona (Fig. 9B).

I. c) Expresión del ARNm de sst₂.

No se encontraron diferencias significativas en la expresión del ARNm de sst₂ entre las glándulas provenientes de animales del grupo testigo y los que recibieron testosterona (51.38 versus 48.4 unidades de densidad óptica, (UDO), respectivamente). En contraste, las hipófisis de hembras en regresión tratadas con estradiol mostraron una disminución significativa (38.6 UDO) del ARNm de sst₂ con respecto a los otros grupos. En la figura 10 se muestran las diferencias en términos de porcentaje en la expresión de los ARNm de sst₂.

II) Estudios con animales en condiciones naturales del ciclo sexual (hembras maduras y en hembras en regresión).

II. a) Concentraciones de estradiol en el suero.

La concentración de estradiol en las muestras de sangre de organismos en regresión fue significativamente menor ($0.8 \text{ ng/ml} \pm 0.49$) que en las hembras sexualmente maduras ($3.1 \text{ ng/ml} \pm 0.67$); (ANOVA $p < 0.05$).

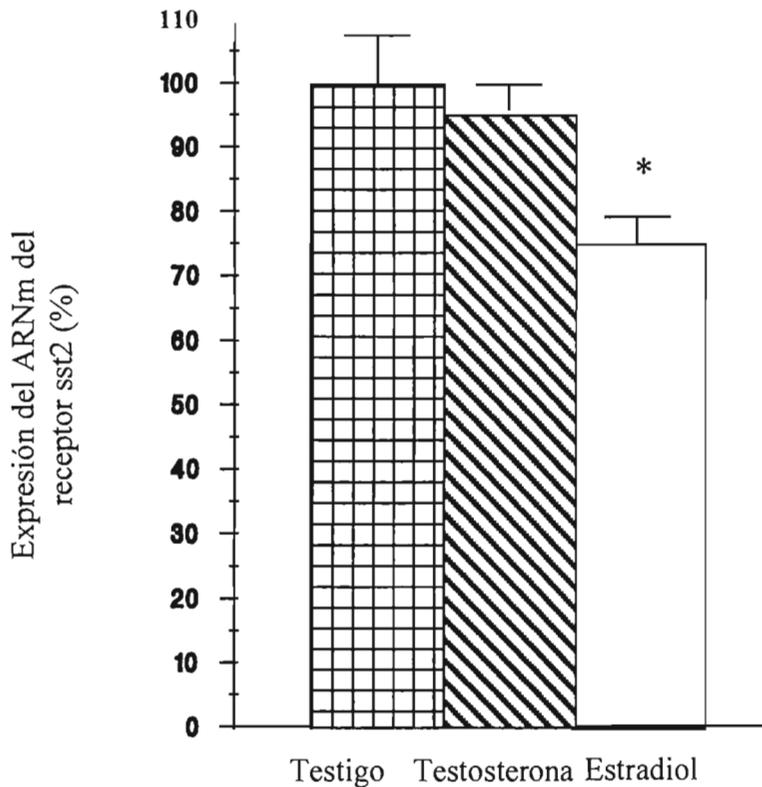


Figura 10.- Efecto de 5 días de tratamiento con estradiol (100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso corporal) o testosterona (100 $\mu\text{g}/\text{g}$ de peso corporal) en la expresión ARNm de sst2. Los valores de sst2 son expresados como coeficiente del ARNm de sst2 y del ARNm de β -actina (control interno) y normalizado como porcentaje del grupo testigo. La determinación se realizó por medio de Northern blot. Los valores son la media \pm S.E.M. ($n= 5$ conjuntos de hipófisis/grupo, 3 hipófisis/conjunto). (*) indica diferencia significativa respecto al grupo testigo ($P < 0.05$). Análisis estadístico, ANOVA seguido de prueba de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls.

II. b) Concentraciones de GH en el suero

En la Figura 11 se muestran la concentración sérica de GH de hembras maduras y hembras en regresión gonadal.

La concentración de GH fue 327% mayor en la etapa de madurez sexual que en la etapa de regresión ($p < 0.05$).

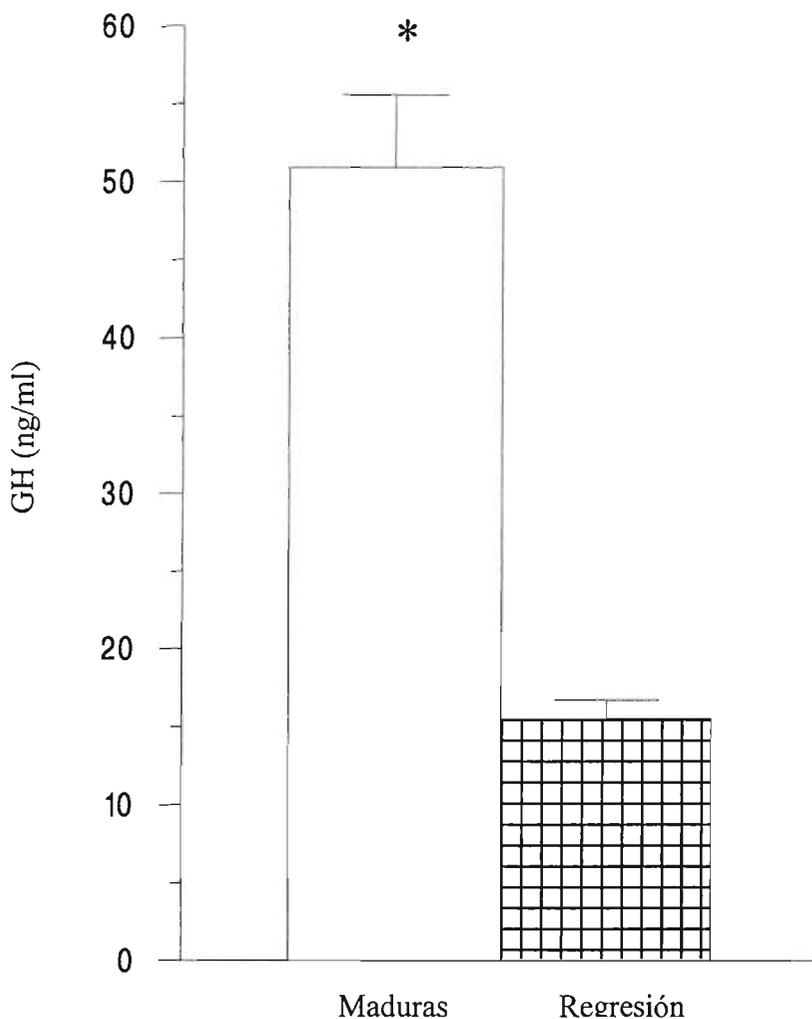


Figura 11.- Concentración de GH en suero de hembras de pez dorado en diferentes etapas del ciclo reproductor (madurez o regresión sexual). Los valores son la media \pm S.E.M. ($n = 5$ muestras/colecta, y se realizaron 3 colectas). El análisis estadístico utilizado fue ANOVA. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$).

II. c) Liberación de GH en respuesta a somatostatina en cultivos estáticos de hipófisis.

En los cultivos estáticos la liberación basal de GH fue significativamente mayor en las glándulas provenientes de hembras sexualmente maduras que en las provenientes de hembras en regresión (Tabla II). El efecto inhibitorio del tratamiento con SRIF-14 1nM durante 30 minutos, expresado como porcentaje de inhibición, fue significativamente menor en las hipófisis de hembras maduras que en las de hembras en regresión.

TABLA II.- Efecto de la somatostatina 1 nM sobre la liberación de GH en cultivos estáticos de hipófisis de hembras de pez dorado.

	Regresión (ng/ml)	Maduras (ng/ml)	Porcentaje maduras/en regresión
Concentración basal	439.3 ± 16.24	679.55 ± 32.35*	154.6%
SRIF-14	304.9 ± 9.82	562.4 ± 12.6*	184.4%
Porcentaje de inhibición	30.74 ± 1.35	17.52 ± 1.96*	56.9%

Los valores representan la media de tres experimentos (cada uno por triplicado) ± SEM. El asterisco indica diferencia significativa (P<0.05).

El contenido de GH en hipófisis de hembras maduras fue significativamente mayor que en las hembras en regresión. Dicho contenido glandular se incrementó notablemente en ambos grupos después del tratamiento con somatostatina (Tabla III). Sin embargo, la magnitud del incremento en el contenido hipofisiario de GH no fue significativamente diferente entre ambos grupos (37% aumento en animales en regresión versus 32% de aumento en las hembras maduras). Después de eliminar a la SRIF-14 del medio durante 30 minutos el contenido glandular de GH fue semejante al observado en las condiciones basales.

TABLA III. Concentraciones de GH en hipófisis de hembras de pez dorado

	Regresión GH (ng/mg de proteína)	Maduras GH (ng/mg de proteína)
Basales	25.1 ± 1.3	42.5 ± 3.0*
Después de incubación con SRIF-14 durante 30 minutos	34.4 ± 2.3**	55.8 ± 3.9**
Después de 30 minutos de eliminar SRIF-14	24.4 ± 1.6	42.9 ± 2.8*

* indica diferencia significativa con respecto a las hembras en regresión (ANOVA, P<0.05)

** indica diferencia significativa con respecto a las concentraciones basales (ANOVA, P<0.05)

II. d) Expresión del ARNm de *sst*₂.

La expresión de ARNm del *sst*₂ extraído de hipófisis de hembras maduras mostró un valor significativamente menor (29.91 ± 2.1 U.D.O.) en relación con los valores registrados para el ARNm del receptor aislado de las hipófisis de hembras en regresión (45.57 ± 5.09 U.D.O) (ANOVA seguido de prueba de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls). Los resultados expresados en porcentaje se muestran en la Figura 12.

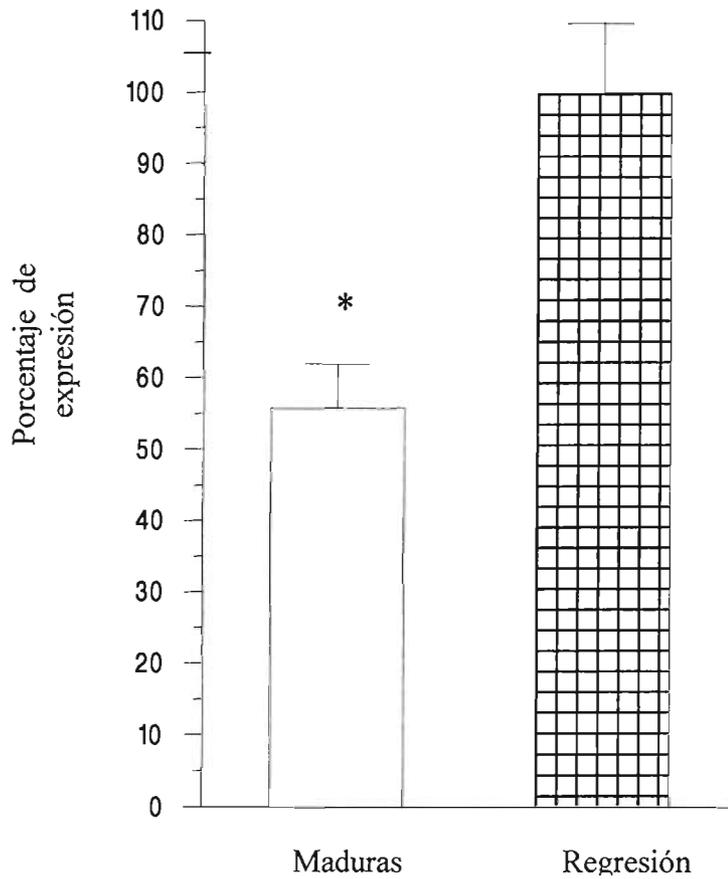
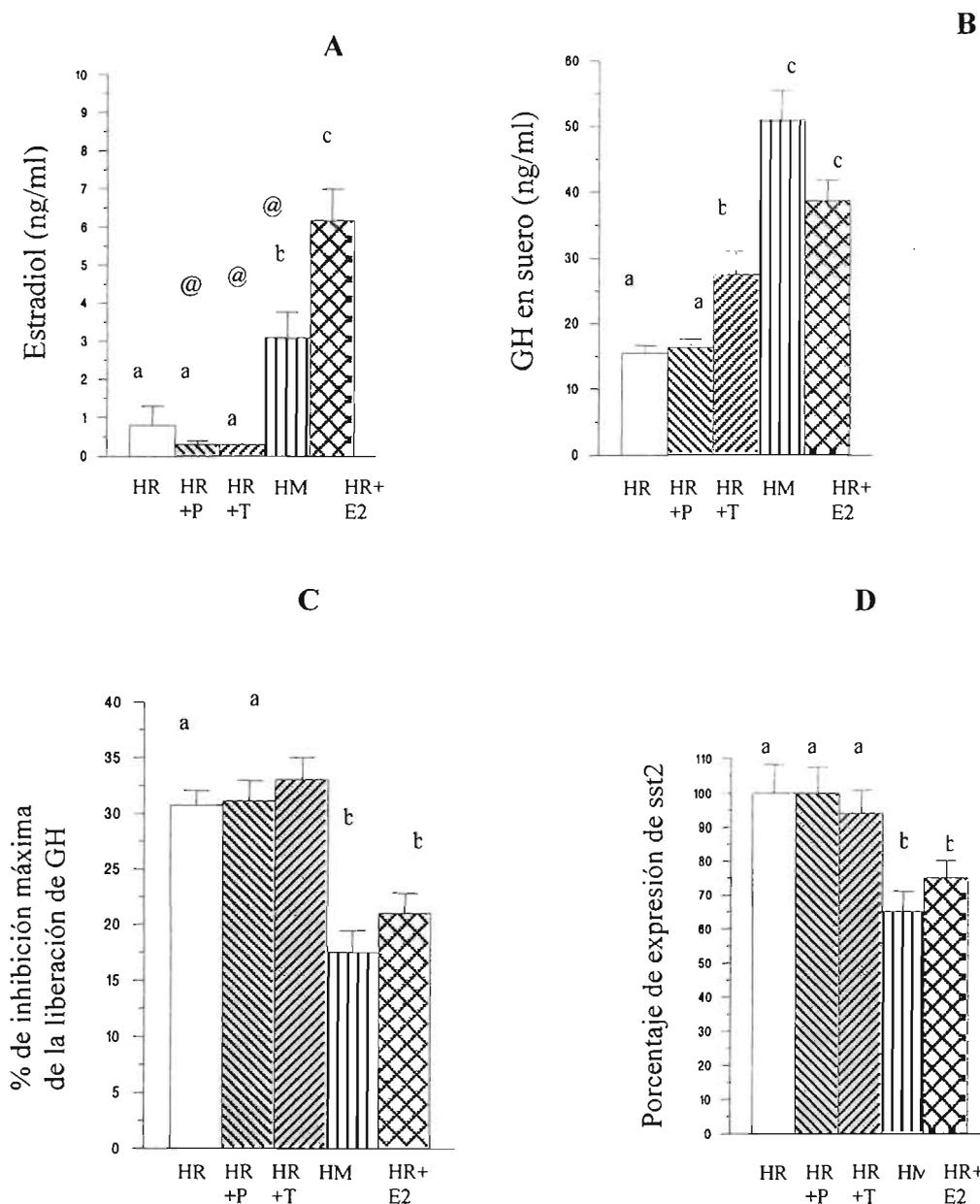


Figura 12.- Expresión del ARNm de *sst2* en hipófisis de hembras de pez dorado de acuerdo a la etapa del ciclo reproductor. Los valores de *sst2* son expresados como coeficiente del ARNm de *sst2* y del ARNm de β -actina (control interno) y normalizado como porcentaje del grupo de hembras en regresión. La determinación se realizó por medio de *slot blot*. Los valores son la media \pm S.E.M. El asterisco indica diferencia significativa ($p < 0.05$). Análisis estadístico, ANOVA seguido de prueba de comparación múltiple de Student-Newman-Keuls.

III.- *Análisis de los resultados obtenidos entre los animales bajo condiciones naturales y los que se implantaron con hormonas esteroideas.*

En la figura 13 se muestra que la concentración de estradiol en suero fue significativamente mayor en las hembras sexualmente maduras y en las hembras en regresión tratadas con estradiol en comparación con las hembras en regresión y las tratadas con testosterona (Fig. 13A). De forma similar, las concentraciones séricas de GH fueron significativamente mayores en las hembras maduras y en las hembras en regresión tratadas con estradiol que en hembras en regresión (Fig. 13B). La aplicación de SRIF-14 1 nM produjo una inhibición significativamente mayor en las hembras en regresión, tanto en condiciones naturales como las implantadas únicamente con polímero o con testosterona, que la que se obtuvo en las hembras maduras y en las hembras en regresión tratadas con estradiol. (Fig. 13C). La expresión del ARNm de *sst₂* fue significativamente menor en las hipófisis de hembras maduras y en las hembras en regresión tratadas con estradiol, que en las hembras en regresión en condiciones naturales o tratadas con implantes de polímero o de testosterona (Fig. 13D).



Figuras 12.- Comparación de resultados entre el modelo de hembras implantadas con esteroides y el modelo de hembras bajo condiciones naturales del ciclo reproductor, en el pez dorado. A) Concentraciones circulantes de estradiol. B) Concentraciones circulantes de GH. C) Respuesta de la hipófisis al tratamiento con SRIF-14 1 nM sobre la liberación de GH. D) Expresión hipofisiaria del ARNm que codifica para el receptor sst2 a somatostatina. HR: hembras en regresión; HR+P: hembras en regresión implantadas con polímero; HR+T: hembras en regresión implantadas con testosterona; HM: hembras sexualmente maduras; HR+E2: hembras en regresión implantadas con estradiol. @Valores tomados de *Trudeau y col., 1991*. El análisis estadístico se hizo por ANOVA. Letras diferentes indican diferencias significativas ($p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la hipófisis de la hembra de *Carassius auratus* sexualmente madura es menos sensible al efecto inhibitor de la somatostatina sobre la liberación de la GH que la de hembras en regresión, lo cual depende de los efectos del estradiol. Esta respuesta posiblemente es mediada por una disminución en los receptores sst_2 hipofisarios, lo que tendría como consecuencia un aumento en la concentración circulante de GH.

En las hembras de teleósteos, una alta concentración de esteroides circulantes está asociada con un incremento de la GH sérica, por ello, los resultados encontrados en el presente trabajo en que un aumento en la concentración de GH fue inducido por la testosterona, es similar al descrito por otros autores (Huggard y col.,1996; Trudeau et al, 1992). Si bien, hasta la fecha no existe un mecanismo propuesto para explicar el aumento de la GH circulante inducido por dicho esteroide, nuestros resultados nos permiten sugerir que no involucra la participación del receptor sst_2 a somatostatina, pues no observamos una disminución significativa en la expresión de dicho receptor en la hipófisis entre peces tratados con testosterona y los peces del grupo testigo. Algunas de las posibles explicaciones de los mecanismos que pudieran contribuir a incrementar la GH en el suero son: un aumento en la síntesis de GH, quedando por determinar si el efecto del esteroide es directo, pues hasta el momento no existen reportes de la existencia de un elemento de respuesta a testosterona en el gen de GH para pez dorado u otras especies de vertebrados; o indirecto, mediado por la activación de otros genes. Otra posibilidad es la conversión de la testosterona en estradiol, pues se ha reportado la presencia de la enzima aromatasa en la hipófisis del pez dorado (Callard y Tchoudakova, 1997; Pasmanik y Callard, 1985; Pasmanik y col.,1988). Una alternativa más, es la activación de receptores de membrana

por parte del esteroide, que permitan la liberación de la GH, como sucede en otros sistemas que inducen variaciones en la concentración de calcio intracelular favoreciendo la exocitosis de vesículas de secreción (Thomas, 2004). En el pez dorado (Marchant y Peter, 1986, Marchant y col.,1987; 1989; Trudeau y col.,1992) y otras especies de teleósteos (Blaise y col.,1995; Melamed y col.,1996; 1998) durante el ciclo sexual o en hembras implantadas con estradiol (Canosa y col.,2002; Trudeau y col.,1992; Zhou y col.,1997), hay un incremento en la concentración de GH en el suero que se correlaciona de manera positiva con las altas concentraciones de estradiol, lo cual concuerda con los resultados del presente estudio.

Con resultados *in vivo* e *in vitro* se demuestra que hipófisis de truchas arcoiris inmaduras con tratamiento con estradiol, disminuye la sensibilidad de las glándulas al efecto inhibitor de SRIF-14 sobre la liberación de GH (Holloway y col.,1997). Los resultados de nuestro estudio apoyan la idea de que el estradiol desensibiliza al somatotropo de la SRIF, reduciendo la expresión del receptor sst_2 en estas células. En los somatotropos de mamíferos, la acción inhibitoria de la somatostatina se ha vinculado con la presencia de este subtipo de receptor en particular (Kimura y col.,1998; Raynor y col.,1993). La misma asociación de este subtipo de receptor y efectividad de la SRIF-14 para inhibir la liberación de GH se ha establecido en la hipófisis de pollo (Geris y col.,2003).

En peces óseos, la disminución en la capacidad inhibitoria de la somatostatina sobre la liberación de GH, se da a pesar de que la concentración de esta última se encuentra más elevada en los peces maduros y en las hembras tratadas con estradiol (Bjornsson y col.,1994; Kakizawa y col.,1995, Sumpter y col., 1991; Trudeau y col.,1992), estableciéndose un sistema de retroalimentación positiva y aportando otra prueba más, de que la GH desempeña un papel activo en los fenómenos reproductivos, tales como el

desarrollo de la gónada o la estimulación de la esteroidogénesis, lo cual ha sido descrito en varios reportes tanto en peces (Holloway y Leatherland, 1997a; LeGac y col.,1993), como en mamíferos (Childs, 2000; Hull y Harvey, 2000; 2002).

A partir de estos resultados en conjunto, sugerimos que la disminución del efecto inhibidor de la somatostatina, es uno de los mecanismos por los que aumenta la liberación de GH en los peces teleósteos maduros o tratados con estradiol.

Los resultados del presente estudio nos permiten proponer al menos una explicación parcial sobre los mecanismos que subyacen a la disminución de la respuesta hipofisiaria a la somatostatina, al haber encontrado que cuando se presentan altas concentraciones de estradiol disminuye significativamente la expresión del ARNm de sst_2 en las hipófisis, lo que se refleja en un menor número de estos receptores en la membrana de los somatotropos, aumentando la cantidad de GH liberada. Por lo tanto queda claro que existe un marcado efecto diferencial del estradiol sobre la expresión de sst_2 entre la hipófisis y el encéfalo, pues en estudios previos se encontró que hembras en regresión tratadas con estradiol, no tienen variaciones en la expresión del ARNm de sst_2 en ninguna de las partes del cerebro, incluyendo áreas hipotálamicas productoras de SRIF que inervan la pituitaria (Lin y col.,2000).

Contrario a los hallazgos encontrados en peces, en la hipófisis de mamíferos se ha observado que el estradiol disminuye la liberación de GH tanto en condiciones basales como después de la inducción con GHRH (Djordjijevic y col.,1998; Hertz y col.,1989; Jansson y col.,1985). Un dato consistente con el efecto supresor del estradiol sobre la liberación de GH, es que en la glándula de rata, la exposición a altas concentraciones del esteroide, tanto *in vivo* (Kimura y col.,1998) como *in vitro* (Djordjojevic y col.,1998), resulta en el incremento en la expresión del ARNm de sst_2 . Una explicación para este

aumento en la transcripción de *sst*₂ en las hipófisis, se presenta con la identificación de un elemento de respuesta a estradiol (ERE) encontrado en un fragmento distal de 1.5 kb, localizado a una distancia de 3.8 kb del sitio de inicio de la transcripción del gen que codifica para *sst*₂, (Xu y col.,1998). Este hallazgo se hizo en cultivos de células T47D, provenientes de una línea celular humana de cáncer de mama. En contraparte, en el pez dorado la secuencia reportada para *sst*₂ no incluye un elemento de respuesta a estradiol, (Lin y col.,2000), y no existen trabajos que indiquen de la presencia de dicha secuencia reguladora en el gen de *sst*₂ en algún otro teleosteo. Entonces, para explicar el efecto del estradiol en la disminución de la expresión de *sst*₂, se pueden plantear al menos dos posibles explicaciones: no existe el ERE en el gen de *sst*₂ en teleosteos y por lo tanto, el efecto del estradiol es indirecto sobre el mencionado gen, o el ERE se encuentra linealmente alejado del sitio de inicio de la transcripción del gen, pero topográficamente cercano y ejerce influencia sobre la expresión del mismo. Un ejemplo de esto último, es lo descrito líneas arriba para este mismo subtipo de receptor en mamíferos (Xu y col.,1998).

Una explicación respecto a la divergencia de los efectos del estradiol sobre la expresión de *sst*₂ entre los mamíferos y *C. auratus*, es, que al contrario de las hembras de mamíferos, en las cuales la relación en peso del ovario respecto al peso corporal es relativamente constante, las hembras de teleosteos presentan cambios muy drásticos en el índice gonado-somático conforme se acerca la etapa de madurez sexual respecto a la época de regresión. En las hembras de los peces óseos durante la madurez, el ovario puede llegar a constituir el 15% del peso corporal, y en ocasiones, tener proporciones mayores, mientras que durante la regresión el peso de la gónada femenina suele ser de entre un 1 y un 3% del peso corporal (Jameson 1988). Por ello y con base en las observaciones realizadas en la hembras de los teleosteos, en las cuales existe una mayor concentración de GH en suero

durante la madurez respecto a la regresión, se ha supuesto que dicha hormona juega un papel muy activo en el crecimiento de la gónada durante su desarrollo, así como estimulando la esteroidogénesis (Holloway y Leatherland, 1998; Hull y Harvey, 2000; LeGac y col.,1993); y su acción puede ser de manera directa o mediada por otras sustancias como la IGF-I (Holloway y Leatherland, 1998; Hull y Harvey, 2000; LeGac y col.,1993), este último de origen local o extragonadal (Patiño y Sullivan 2002). En este orden de ideas, pudiéramos considerar que para garantizar que se presente el aumento en la concentración de GH en suero, los teleósteos presentan entre otros, un mecanismo de seguridad como es el disminuir la sensibilidad al inhibidor de la liberación de GH, pues no sólo en los ciprínidos como *Carassius auratus* disminuye la sensibilidad a la SRIF, sino también en salmónidos (Holloway y col.,1997), mientras que para los cíclidos como la tilapia, aún no se determina si se presenta dicho fenómeno.

Como en la rata (Mezey y col.,1998; Rohrer y col.,1998) y el pollo (Geris y col.,2003), en la hipófisis de *C. auratus* además de los receptores sst_2 , también se expresan ampliamente los receptores sst_5 (Lin y col.,2000; 2002; Lin y Peter, 2003), mientras que los receptores sst_1 y sst_3 se expresan en baja cantidad (Lin y col.,1999; Lin y Peter, 2003). Si bien, hasta la fecha la asociación del sst_2 como mediador del efecto del SRIF sobre la liberación de la GH, parece ser una situación conservada en la evolución en peces, aves y mamíferos, no se debe descartar la posibilidad de que los receptores sst_5 puedan participar inhibiendo la secreción de GH, entre otras razones, debido a su abundante expresión. Dado que la SRIF-28 mostró una mayor potencia que las otras dos isoformas en cuanto a su capacidad de unión a este subtipo de receptor de pez dorado en sistemas de expresión en las células CCL39-SER-Luci (Lin y col.,2002), existe la posibilidad de que la SRIF-28 juegue un papel importante en la liberación de GH, ya que en el hipotálamo del pez dorado

se expresan tres genes que codifican para precursores de SRIF conocidos como preprosomatostatinas (PSS) y que se designan como PSS-I, PSS-II y PSS-III, los que potencialmente pueden ser procesados y dar origen a SRIF-14, SRIF-28 y [Pro²]-SRIF-14, y sst5 presenta alta afinidad para SRIF-28.

En las hembras de pez dorado la expresión más elevada del gen que codifica para SRIF-14 ocurre durante la etapa de madurez sexual, mientras que la expresión de los genes que codifican SRIF-28 y [Pro²]-SRIF-14 alcanza su máximo durante la fase de regresión sexual (Lin y col.,1999). El tratamiento con estradiol a hembras de pez dorado durante la etapa de regresión sexual provoca un incremento notable en la expresión del gen de SRIF-14, así como un aumento modesto en la transcripción del gen de [Pro²]-SRIF-14, pero no tiene efecto sobre la expresión del gen de SRIF-28 (Canosa y col.,2002). Por otra parte, no se observaron diferencias en la potencia inhibidora entre la SRIF-14 y la [Pro²]SRIF-14 sobre la liberación de GH en hipófisis de pez dorado *in vitro*. (Lin y col.,1999a). Por lo tanto, inferimos que el cambio conformacional de la sustitución de la glicina por prolina en la posición 2 de la SRIF-14 no afecta la actividad del péptido, siendo ello una prueba indirecta de que, al igual que en mamíferos, la parte activa de la molécula se encuentra alrededor del aminoácido lisina en la posición 9, (Epelbaum, 1992; Patel y Srikant, 1997).

Por lo anteriormente expuesto, no resulta claro todavía cual de las tres isoformas de SRIF juega el principal papel regulador sobre la liberación de GH, si es que alguna de las tres variedades desempeña dicha función, o que se presente un mecanismo que implique variaciones de SRIF-14, [Pro²]-SRIF-14 y SRIF-28 y sus respectivos receptores, en diferentes momentos del ciclo reproductor para regular la liberación de GH, siendo claro que se requieren más estudios para determinar si existen diferencias funcionales entre las diferentes variantes de SRIF en relación a su efecto inhibitorio sobre la liberación de GH.

En contraste, en el cerebro de la trucha arcoiris, se ha observado que el estradiol ejerce un efecto negativo sobre la expresión del gen que codifica para SRIF (Holloway y col.,2000), demostrando la amplia diversidad de respuestas fisiológicas que se presentan en los teleósteos.

En este trabajo se demostró que el implante de estradiol en hembras de pez dorado en regresión, mimetiza de forma razonable lo que se observa durante la etapa de madurez sexual en condiciones naturales, en cuanto a su efecto sobre la concentración sérica de GH así como la respuesta hipofisiaria al tratamiento con SRIF y a la expresión del ARNm del receptor sst_2 . Con base en estos resultados propongo que este modelo experimental puede ser utilizado confiablemente para incursionar en un mayor número de estudios que permitan entender mejor los mecanismos de regulación de la liberación de GH.

Tomados en conjunto, los resultados obtenidos durante el presente estudio así como aquellos reportados previamente en la literatura, nos permiten sugerir que el mecanismo de regulación que ejercen las hormonas esteroides sexuales sobre la liberación de GH en los peces incluyen acciones sobre la producción de SRIF a nivel cerebral y sobre la expresión de receptores a SRIF a nivel hipofisiario. Esto último provee un mecanismo, al menos parcial, para explicar las alteraciones estacionales que se observan en la respuesta hipofisiaria al SRIF.

CONCLUSIONES.

- a) En las hembras de pez dorado las concentraciones elevadas de estradiol circulante, tanto en condiciones naturales del ciclo reproductor como en hembras implantadas con dicho esteroide, correlacionan con un aumento en las concentraciones séricas de GH.
- b) Las hipófisis de hembras de pez dorado expuestas a una concentración elevada de estradiol circulante son menos sensibles al efecto inhibitor de la somatostatina.
- c) La expresión hipofisiaria del ARNm correspondiente al subtipo sst2 del receptor a somatostatina disminuye de forma importante en hembras de pez dorado que presentan concentraciones elevadas de estradiol en la circulación.
- d) El modelo de implantes de esteroides en el pez dorado es útil para el estudio de los mecanismos que regulan la liberación de GH, pues genera efectos muy parecidos a los que se registran en condiciones fisiológicas naturales.

Los datos obtenidos en este estudio apoyan la hipótesis de que, en el pez dorado, las concentraciones elevadas de estradiol estimulan un aumento en la liberación de hormona de crecimiento a través de una disminución en la sensibilidad hipofisiaria a la somatostatina, provocada por un decremento en la producción del receptor sst₂ para dicho neuropéptido.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

PERSPECTIVAS

Si bien, el presente trabajo aporta una contribución para comprender mejor la regulación de la secreción de la hormona de crecimiento en *Carassius auratus*, quedan por determinar cuál o cuáles son las sustancias que median la acción del estradiol para aumentar la producción de GH.

También, debe de establecerse si existen en los elementos transcripcionales, secuencias identificadas como elementos de respuesta a estradiol, con lo que se pueda explicar el aumento o la disminución de la transcripción de varios genes que impacten la concentración sérica de GH.

Otras preguntas que seguramente surgirán son: En el pez dorado, ¿Se incrementa el número de somatotropos cuando se tienen altas concentraciones de estradiol circulante?

¿Es posible vincular el efecto de altas concentraciones de estradiol con alguno de los subtipos de receptor a dicha hormona en los somatotropos de *C. auratus*?

¿Existen factores paracrinós procedentes de otras células endocrinas de la adenohipófisis que estén influyendo en la expresión de la GH?

Todo ello, entre otras muchas preguntas.

REFERENCIAS

Abdel-Meguid, S.S., Shieh, H.S., Smith, W.W., Dayringer, H.E., Violand, B.N., Bentle, L.A. (1987) Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6434-6437.

Aramburo, C., Carranza, M., Martinez, H., Luna, M. (1997) A comparative overview of growth hormone: proteins and genes. In: "Advances in comparative endocrinology". Monduzzi Ed. Pp 893-898.

Argellon, L.B., Davis, S.L., Lin, C.M., Chen, T.T., Powers, D.A. (1988) Rainbow trout has two genes for growth hormone. *Mol. Reprod. Dev.* 1: 11-17.

Argenton, F., Vianello, S., Bernardini, S., Lopreiato, R., Colombo, L., Bortolussi, M. (2002) Trout GH promoter analysis reveals a modular pattern of regulation consistent with diversification of GH gene control and function in vertebrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189: 11-23.

Bjornsson, B., Taranger, G.L., Hansen, T., Stefanson, S.O., Haus, C. (1994) The interrelation between photoperiod, growth, and sexual maturation of adult atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 93: 70-81.

Blaise O., LeBail P.Y., Weil C. (1995) Lack of gonadotropin-releasing hormone action on *in vivo* and *in vitro* growth hormone release in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol.* 110C : 133-141.

Bosma, P.T., Kolk, S.M., Rebers, F.E.M., Lescroart, O., Roelants, I., Willems, P.H.G.M., Schultz, R.M. (1997) Gonadotrophs but not somatotrophs carry gonadotropin-releasing hormone receptors: Receptor localization, intracellular calcium, and gonadotropin and GH release. *J. Endocrinol.* 152: 437-446.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.

Bruns, Ch., Weckbecker, G., Raulf, H.L., Hoyer, D. (1995) Characterization of somatostatin receptors subtypes. In "Somatostatin and its receptors". Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 190) pp 89-110.

Callard, G.V., Tchoudakova, A. (1997) Evolutionary and functional significance of two CYP19 genes differentially expressed in brain and ovary in goldfish. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 61: 387-392.

Canosa, L.F., Lin, X.W., Peter, R.E. (2002) Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. *Neuroendocrinoly* 76: 8-17.

Company R., Astola A., pendon C., Valdivia M.M., Perez-Sanchez J. (2001) Somatotropic regulation of fish growth and adiposity: growth hormone (GH) and somatolactin (SL) relationship. *CBP C130*: 435-445.

Cook, A.F., Peter, R.E. (1984) Effects of somatostatin on serum growth hormone levels in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 54: 109-113.

Chan K.W., Yu K.L., Rivier J., Chow B.K.C. (1998) Identification and characterization of a receptor from goldfish specific for a teleost growth hormone-releasing hormone-like peptide. *Neuroendocrinology* 68 : 44-56.

Chang, J.P., Cook, H., Freedman, G.L., Wiggs, A.J., Somoza, G.M., de Leeuw, R., Peter, R.E. (1990) Use of a pituitary cell dispersion method and primary culture system for the studies of gonadotropin-releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus*. I initial morphological, static, and cell column perfusion studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 265-282.

Chang J.P., Jobin R.M., Wong A.O.L. (1993) Intracellular mechanism mediating gonadotropin and growth hormone release in goldfish *Carassius auratus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 11: 25-33.

Childs, G.V. (2000) Growth hormone cells as co-gonadotropes: partners in the regulation of the reproductive system. *TEM* 11: 168-175.

Chomczynski, P., Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162: 1556-1559.

Djordjijevic D., Zhang, J., Priam M., Viollet C., Gourdji D., Kordon C. (1998) Effect of 17 β -estradiol on somatostatin receptor expression and inhibitory effects on growth hormone and prolactin release in rat pituitary. *Endocrinology.* 139: 2272-2277.

Fradinger, E.A., Sherwood, N.M. (2000) Characterization of the gene encoding both growth hormone-releasing (GRF) and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) in the zebrafish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 165: 211-29.

Geris, K.L., De Groef, B., Rohrer, S.P., Geelissen, S., Kuhn, E.R., Darras, V.M. (2003) Identification of somatostatin receptors controlling growth hormone and tyrotropin secretion in the chicken using receptor subtype-specific agonist. *J. Endocrinol.* 177: 279-286.

Habibi H.R., Peter R.E., Nahorniak C.S., Milton R.C., Millar P.P. (1992) Activity of vertebrate gonadotropin-releasing hormones and analogs with variant amino acid residues in positions 5, 7 and 8 in goldfish pituitary. *Regul. Peptides* 37 : 271-284.

Hertz, p., Silberman, M., Eve, L., Hochberg, Z. (1989) Effects of sex steroids on the response of cultured rat pituitary cells to growth hormone-releasing hormone and somatostatin.. *Endocrinology* 125: 581-585.

Holloway, A. C., Sheridan M.A., Leatherland, J. F. (1997) Estradiol inhibits plasma somatostatin 14 (SRIF-14) levels and inhibits the response of somatotrophic cells to SRIF-

14 challenge *in vitro* in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106 : 407-414.

Holloway, A.C., Leatherland, J.F. (1997a) The influence of reproductive status on the stimulatory action of N-methyl-D-, L-aspartate on growth hormone secretion, *in vitro* and in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Fish. Physiol. Biochem.* 16: 411-416.

Holloway, A.C., Melroe, G.T., Ehrman, M.M., Reddy, P.K., Leatherland, J.F., Sheridan, M.A: (2000) Effect of 17 β -estradiol on the expression of somatostatin genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 279 : R389-R393.

Hoyer,D., Bell, G.I., Berelowitz,M., Epelbaum, J., Feniuk,W., Humphrey, P.P.A., O'Carrol,A.M., Patel, Y.C., Schonbrunn,A.,Taylor,J.E., Reisine, T. (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *TIPS.* 16: 86-88.

Huggard, D., Khakoo, Z., Kassam, G., Habibi H.R. (1996) Effect of testosterone on growth hormone gene expression in the goldfish pituitary. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 74: 1039-1043.

Hull , K.L., Harvey, S. (2000) Growth hormone: A reproductive endocrine-paracrine regulator? *Rev. Reprod.* 5: 175-182.

Hull , K.L., Harvey, S. (2002) GH as a co-gonadotropic: the relevance a correlative changes in GH secretion and reproductive state. *J. Endocrinol.* 72: 1-19.

Jafri, S.I.H., (1979) Combined stain for fish pituitary. *Stain Technol.* 54: 93-95.

Jameson, E.W. (1988) Vertebrate Reproduction. John Wiley and Sons. pp 48-70

Jansson, J.O., Edén, S., Isaksson, O. (1985) Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrin. Rev.* 6: 128-147.

Johansen, B., Johansen, O.C., Valla, S. (1989) The complete nucleotide sequence of the growth-hormone gene from atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gene* 77: 317-324.

Kakizawa, S., Kaneko, T., Ogasawara, T., Hirano, T., (1995) Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish. Physiol. Biochem.* 14: 93-101.

Kimura, N., Tomizawa, S., Arai, N. K., Kimura, N. (1998) Chronic treatment with estrogen up-regulates expression of sst2 messenger ribonucleic acid (mRNA) but down-regulates expression of sst5 mRNA in rat pituitaries. *Endocrinology* 139: 1573-1580.

Kim, M.H., oka, Y., Amano, M., Kobayashi, M., Okuzawa, K., Hasegawa, Y., Kawashima, S., Suzuki, Y., Aida, K., (1995) Immunocytochemical localization of sGnRH and cGnRH-II in the brain of goldfish., *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 356: 72-82.

Kimura, N., Tomizawa, S., Arai, K.N., Osamura, R.Y., Kimura, N. (2001) Characterization of 5'-flanking region of rat somatostatin receptor sst2 gene: Transcriptional regulatory elements and activation Pitx1 and estrogen. *Endocrinology* 142: 1427-1441.

Klausen, C., Chang, J.P., Habibi, H.R. (2001) The effect of gonadotropin-releasing hormone on growth hormone and gonadotropin subunit gene expression in the pituitary of goldfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 129: 511-516.

Laiz- Carrión, R., Segura-Noguera, M.M., Martín del Río M.P., Mancera, J.M. (2003) Ontogeny of adenohypophyseal cells in the pituitary of american shad (*Alosa sapidissima*). *Gen Comp. Endocrinol.* 132: 454-464

Law, M.S., Cheng, K.W., Fung, T.K., Chan, Y.H., Yu, K.L., Chan, K.M. (1996) Isolation and characterization of two distinct growth hormone cDNAs from the goldfish, *Carassius auratus*. *Arch. Biochem. Biophys.* 330: 19-23.

Le Bail, P.Y., Sumpter, J.P., Carragher, J.F., Mourot, B., Niu, P.D., Weil, C. (1991) Development and validation of a highly sensitive radioimmunoassay for chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 75-85.

Le Gac, F., Blaise, O., Fostier, A., LeBail, P.Y., Loir, M., Mourot, B., Weil, C. (1993) Growth hormone (GH) and reproduction : a review. . *Fish. Physiol. Biochem.* 11 : 219-232.

Lin, X.W., Lin, H.R., Peter, R.E. (1993) Growth hormone and gonadotropin secretion in the common carp (*Cyprinus carpio* L.): *In vitro* interactions of gonadotropin-releasing hormone, somatostatin, and the dopamine agonist apomorphine. *Gen. Comp. Endocrinol.* 89: 62-71.

Lin, H.R., Lu, M., Lin, X.W., Zhang, W.M., Sun, Y., Chen, L.X. (1995) Effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) analogs and sex steroids on growth hormone (GH) secretion and growth in common carp (*Cyprinus carpio* L.) and grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*). *Aquaculture* 135: 174-184.

Lin, X.W., Otto, C.J., Peter, R.E., (1999a). Expression of three distinct somatostatin messenger ribonucleic acids (mRNAs) in goldfish brain: Characterization of the complementary deoxyribonucleic acids, distribution and seasonal variations of the mRNAs, and action of somatostatin-14 variant. *Endocrinology* 140: 2089-2099.

Lin, X.W., Janovick, J.A., Brothers, S., Conn, P.M., Peter, R.E. (1999b) Molecular cloning and expression of two type one somatostatin receptors in goldfish brain. *Endocrinology* 140: 5211-5219.

Lin, X.W., Janovick, J.A., Cardenas, R., Conn, P.M., Peter, R.E. (2000) Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 166: 75-87.

Lin, X.W., Nunn, C., Hoyer, D., Rivier, J., Peter, R.E. (2002) Identification and characterization of a type five-like somatostatin receptor in goldfish pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189: 105-116.

Lin, X.W., Peter, R.E. (2003) Somatostatin like-receptors in goldfish: cloning of four new receptors. *Peptides* 24: 53-63.

Luo, D., McKeown, B.A, Rivier, J., Vale, W. (1990) *In vitro* responses of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) somatotrophs to carp growth hormone-releasing factor (GRF) and somatostatin. *Gen. Comp. Endocrinol.* 80 : 288-298.

Luo D., McKeown B.A. (1991) Interaction of carp growth hormone-releasing factor and somatostatin on *in vivo* release of growth hormone in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Neuroendocrinology.* 54 : 359-364.

Mahmoud, S.S., Moloney, M.M., Habibi, H.R., (1996) Cloning and sequencing of the goldfish growth hormone cDNA. *Gen Comp. Endocrinol.* 101 : 139-144.

Mahmoud, S.S., Wang, S., Moloney, M.M., Habibi, H.R. (1998) Production of a biologically active novel goldfish growth hormone in *Escherichia coli*. *Comp. Biochem. Physiol.* 120: 657-663.

Marchant, T.A., Peter, R.E. (1986) Seasonal variations in the body growth rates and circulating levels of growth hormone in the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Exp. Zool.* 237: 231-239.

Marchant, T.A, Fraser, R.A., Andrews, P.C., Peter, R.E. (1987) The influence of mammalian and teleost somatostatins on the secretion of growth hormone from goldfish (*Carassius auratus* L.), pituitary fragments *in vitro*. *Regul. Peptides* 17: 41-52.

Marchant, T.A., Peter, R.E. (1989) Hypothalamic peptides influencing growth hormone secretion in the goldfish, *Carassius auratus*. *Fish. Physiol. Biochem.* 7: 133-139.

Marchant, T.A., Chang J.P., Nahorniak C.S., Peter R.E. (1989) Evidence that gonadotropin-releasing hormone also functions as a growth hormone-releasing factor in the goldfish. *Endocrinology* 124 : 2509-2518.

Marchant, T.A., Moroz; B.M. (1993) Hormonal influence on *in vitro* (³⁵S)-sulphate uptake by gill arches from goldfish (*Carassius auratus*) L. *Fish Physiol. Biochem.* 11 : 393-399.

McRory, J.E., Parker, D.B., Ngamvongchon, S., Sherwood, N.M. (1995) Sequence and expression of cDNA for pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) and growth hormone-releasing hormone (GHRH)-like peptide in catfish. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108: 167-177.

Melamed, P., Gur, G., Elizur, A., Rosenfeld, H., Sivan, B., Rentier-DelRue, F., Yaron, Z. (1996) Differential effects of gonadotropin-releasing hormone, dopamine and somatostatin and their second messenger on the mRNA levels of gonadotropin II β subunit and growth hormone in the teleost fish, tilapia. *Neuroendocrinology* 64 : 320-328.

Melamed, P., Rosenfeld, H., Elizur, A., Yaron, Z. (1998) Endocrine regulation of gonadotropin and growth hormone gene transcription in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 119 : 325-338.

Mezey, E., Hunyady, B., Mitra, S., Hayes, E., Liu, Q.S., Schaeffer, J., Schonbrunn, A. (1998) Cell specific expression of SST2A and SST5 somatostatin receptors in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* 139: 414-419.

Montero, M., Yon, L., Rousseau, K., Arimura, A., Fournier, A., Dufour, S. Y., Vaudry, H. (1998) Distribution, characterization, and growth hormone-releasing activity of pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in the European eel, *Anguilla anguilla*. *Endocrinology* 139: 4300-4310.

Murthy, C.K., Nahorniak, C.S., Rivier, J.E., Peter, R.E. (1993) *In vitro* characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) antagonist in goldfish, *Carassius auratus*. *Endocrinology* 98: 1633-1644.

Murthy, C.K., Peter, R.E. (1994a) Functional evidence regarding receptors subtypes mediating the actions of native gonadotropin-releasing hormone (GnRH) in goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 94 : 78-91.

Murthy, C.K., Nahorniak, C.S., Rivier, J.E., Peter, R.E. (1994b) Differential actions of a mammalian gonadotropin-releasing hormone antagonist on gonadotropin-II and growth hormone release in goldfish, *Carassius auratus*. *Neuroendocrinology* 59 : 561-571.

Norris, D.O. (1997) Vertebrate endocrinology. Academic Press. U.S.A. pp167-179.

Oliverau, M., Ollevier, F., Vandesande, F., Oliverau, J. (1984) Somatostatin in the brain and the pituitary of some teleost. *Cell Tissue Res.* 238 : 289-296.

Pankhurst, N.W., Stacey, N.E., Peter, R.E. (1986) An evaluation of techniques for administration of 17- β estradiol to teleosts. *Aquaculture* 52: 145-155.

Parker, D.B., Coe, I.R., Dixo, G.H., Sherwood N.M. (1993) Two salmon neuropeptides encoded by one brain cDNA are structurally related to members of the glucagon superfamily: *Eur. J. Biochem.* 215: 439-448.

Pasmanik, M., Callard, G.V., (1985) Aromatase and 5 α -reductase in the teleost brain, spinal cord and pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* 60: 244-251.

Pasmanik, M., Schilinger, B. A., Callard, G.V., (1988) *In vivo* steroid regulation of aromatase and 5 α -reductase activities in brain and pituitary in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 175-182.

Patel Y.C., Srikant C.B. (1997) Somatostatin receptors. *TEM* 8: 398-404.

Patiño, R., Sullivan, C.V. (2002) Ovarian follicle growth, maturation and ovulation in teleost fish. *Fish Physiol. Biochem.* 26: 57-72.

Peng, C., Peter, R.E. (1997) Neuroendocrine regulation of growth hormone secretion and growth in fish. *Zool. Studies* 36: 79-89.

Peter, R.E., Trudeau, V.L., Sloley, B.D. (1991) Brain regulation of reproduction in teleost. *Bull. Inst. Zool. Acad. Sinica* 16: 89-118.

Peter, R.E., Chang, J.P. (1999) Brain regulation of growth hormone secretion and food intake in fish. In "Neural regulation in the vertebrate endocrine system". Kluwer Academic/Plenum Publishers, NY. NY. Pp 55-67.

Pickavance, L.C., Staines, W.A., Fryer, J.N. (1992) Distribution and colocalization of neuropeptide Y and somatostatin in the goldfish brain. *J. Chem. Neuroanat.* 5 : 221-233.

Raynor, K., Murphy, W., Coy, D., Taylor, J., Moreau, J., Yasuda, K., Bell, G.I., Reisine, T. (1993) Cloned somatostatin receptors: identification of subtype-selective peptides and demonstration of high affinity binding of linear peptides. *Mol. Pharmacol.* 43: 838-844.

Rand-Weaver, M., Walther, B.T., Kawauchi, H. (1989) Isolation and characterization of growth hormone from Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 73: 260-269.

Rao, S.D., Prasada Rao, P.D., Peter, R.E. (1996) Growth hormone-releasing hormone immunoreactivity in the brain, pituitary and pineal of the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 102: 210-220.

Rohrer, S.P., Birzin, E.T., Mosley, R.T., Berk, S.C., Hutchins, S.M., Shen, D.M., Xiong, Y.S., Hayes, E.C., Parmar, R.M., Foor, F., Mitra, S.W., Degrado, S.J., Shu, M., Klopp, J.M., Cai, S.J., Blake, A., Chan, W.W.S., Pasternak, A., Yang, L.H., Patchett, A.A., Smith, R.G., Chapman, K.T., Schaeffer, J.M. (1998) Rapid identification of subtype-selective agonist of the somatostatin receptor through combinatorial chemistry. *Science* 282: 737-740.

Sekine, S., Mizukami, T., Saito A., Kawauchi, H., Ito, S. (1989) Isolation and characterization of a novel growth hormone cDNA from chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Biochem. Biophys. Acta* 1009: 117-120.

Small, B.C., Nonneman, D. (2001) Sequence and expression of a cDNA encoding both pituitary adenylate cyclase activating polypeptide and growth hormone-releasing hormone-like peptide in channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Gen Comp. Endocrinol.* 122: 354-363.

Sumpter, J.P., Lincoln, R.F., Bye, V.J., Carragher, J.F., Le Bail, P.Y. (1991) Plasma growth hormone levels during the sexual maturation in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen Comp. Endocrinol.* 83: 103-110.

Thomas, P. (2004) Rapid, nongenomic steroid actions initiated at the cell surface: lessons from studies in fish. *Fish Biochem. Physiol.* 28: 3-12.

Trabucchi, M., Tostivint, H., Lihmann, I., Vallarino, M., Vaudry, H. (2001) Molecular cloning of a second somatostatin cDNA in the chicken: evolutionary perspectives. In "Perspectives in comparative endocrinology: Unity and diversity" Monduzzi, Editor, Bologna, Italia. pp 1279-1284.

Trudeau, V.L., Peter, R.E., Sloley, B.D. (1991) Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biol. Reprod.* 44: 951-960.

Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Nahorniak, C.S., Peter, R.E. (1992) Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology* 56 : 483-490.

Van Oordt, P.G.W.J., Peute, J. (1983) The cellular origin of pituitary gonadotropins in teleosts. In *Fish Physiology*, vol. IX (edited by Hoar, W.S., Randall, D.J. & Donaldson, E.M.) pp. 137-186. New York: Academic

Vaughan, J.M., Rivier, J., Spiess, J., Peng, C., Chang, J.P., Peter, R.E., Vale, W. (1992) Isolation and characterization of hypothalamic growth hormone-releasing factor from common carp, *Cyprinus carpio*. *Neuroendocrinology* 56: 539-549.

Villaplana, M., García, A.A., García, H.M.P., Agulleiro, B. (2003) Immunocytochemical and ultrastructural characterization of mammosomatotrope-, growth hormone-, and prolactin-cells from gilthead sea bream (*Sparus aurata* L., Teleostei): An ontogenic study. *J. of Morphol.* 255: 347-357.

Viollet, C., Prévost, G., Maubert, E., Faivre-Bauman, A., Gardette, R., Kordon, C., Loudes, C., Slam, A., Epelbaum, J. (1995) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 9: 107-113.

Wong, A.O.L., Ng, S., Lee, E.K.Y., Leung, R.C.Y., Ho, W.K.K. (1998) Somatostatin inhibits (D-Arg⁶, Pro⁹-Net) salmon gonadotropin-releasing hormone and dopamine D₁-stimulated growth hormone release from perfused pituitary cells of chinese grass carp, *Ctenopharyngodon idellus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 110: 29-45.

Wong, A.O.L., Chang, J.P., Peter, R.E. (1992) Dopamine stimulates growth hormone release from the pituitary of goldfish, *Carassius auratus*, through the dopamine D₁ receptors. *Endocrinology* 130: 1201-1210.

Wong, A.O.L., Chang, J.P., Peter, R.E. (1993) *In vitro* and *in vivo* evidence that dopamine exerts growth hormone-releasing activity in goldfish. *Am. J. Physiol.* 264: E925-E932.

Wong, A.O.L., Van der Kraak, G., Chang, J.P. (1994) Cyclic 3',5'-adenosine monophosphate mediates dopamine D₁-stimulated growth hormone release from goldfish pituitary cells. *Neuroendocrinology*. 60: 410-417.

Wong, A.O.L., Li, W.S., Lee, E.K.Y., Leung, M.Y., Tse, L.Y., Chow, B.K.C., Lin, H.R., Chang, J.P. (2000) Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide as a novel hypophysiotropic factor in fish. *Biochem. Cell. Biol.* 78: 329-343.

Xu Y., Berelowitz M., Bruno J.F. 1998 Characterization of the promoter region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness. *Mol. Cell Endocrinol.* 139: 71-77

Yang, B.Y., Chan, K.M., Lin, C.M., Chen, T.T. (1997) Characterization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) growth hormone1 gene and the promoter region of growth hormone 2 gene. *Arch. Biochem. Biophys.* 340: 359-368.

Yu, K.L., Sherwood, N.M., Peter, R.E., (1988) Differential distribution of two molecular forms of gonadotropin-releasing hormone in discrete brain areas of goldfish (*Carassius auratus*) . *Peptides* 9: 625-630.

Zhou, J. J., Trudeau, V. L., Cui, Z., Brechin, J., Mackenzie, K.,Zhu, Z., Houlihan, D. F., Peter, R.E. (1997) Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106 : 102-112.

ANEXO I



ACADEMIC
PRESS

Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

General and Comparative Endocrinology 132 (2003) 119–124

GENERAL AND COMPARATIVE
ENDOCRINOLOGY

www.elsevier.com/locate/ylgcn

Estradiol reduces pituitary responsiveness to somatostatin (SRIF-14) and down-regulates the expression of somatostatin sst₂ receptors in female goldfish pituitary

Rodolfo Cardenas,^a Xinwei Lin,^b Luis Fabián Canosa,^b Maricela Luna,^c
Carlos Arámburo,^c and Richard E. Peter^{b,*}

^a *Unidad de Morfología y Función, Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. de los Barrios #1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, Edo de Mex. 54090, México*

^b *Department of Biological Sciences, University of Alberta, Edmonton, Alta., Canada T6G 2E9*

^c *Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Neurobiología, Campus UNAM-UAQ Juriquilla, Querétaro, Qro, 76230, México*

Accepted 30 December 2002

Abstract

Sex steroid hormones have been shown to regulate somatostatin (SRIF) gene expression in goldfish brain, which in turn influences the regulation of GH secretion. In this study, the influences of sex steroids on pituitary responsiveness to SRIF-14 and the pituitary expression of a type two SRIF receptor (sst₂) were examined. Results from *in vitro* perfusion of pituitary fragments show that pituitaries from estradiol-primed sexually regressed female fish have significantly lower GH release responsiveness to pulse exposure to SRIF-14 than pituitaries from control or testosterone-treated sexually regressed females. Results from *in vitro* static culture show that pituitaries from sexually mature female fish have lower GH release responsiveness to SRIF-14 than those from sexually regressed females. In addition, the sst₂ receptor mRNA levels in pituitaries from mature and recrudescing female fish are significantly lower than in sexually regressed female fish. Our results indicate that estradiol acts at the level of the pituitary to regulate GH secretion by influencing the responsiveness to SRIF-14. The underlying mechanism includes, in part, reduction of the expression of sst₂ receptors, presumably leading to the lower number of the receptors available for SRIF binding.

© 2003 Elsevier Science (USA). All rights reserved.

Keywords: Sex steroids; Somatostatin; Growth hormone; Somatostatin receptor; Gene expression; Pituitary; Goldfish

1. Introduction

Somatostatin (SRIF) is a major inhibitor of pituitary growth hormone (GH) secretion. GH plays a central role in the control of growth, including development of the gonads. In several fish species, it has been demonstrated that GH levels increase during sexual maturation as the sex steroid hormone levels increase (Bjornsson et al., 1994; Kakizawa et al., 1995; Stacey et al., 1984; Sumpter et al., 1991; Trudeau et al., 1992). In goldfish, tilapia and rainbow trout, treatments to increase circulating levels of the sex steroid estradiol stimulate increases in the circulating levels of GH (Bjornsson et al.,

1994; Holloway et al., 1997; Kakizawa et al., 1995; Melamed et al., 1995; Trudeau et al., 1992; Zhou et al., 1997). However, how estradiol acts at the level of the pituitary to regulate GH release is unclear. In sexually immature rainbow trout, it has been reported that a 2-week implantation with estradiol abolishes the pituitary responsiveness to SRIF-14 *in vitro* (Holloway et al., 1997), suggesting a pathway in which estradiol acts on the pituitary level.

In goldfish, three SRIF cDNAs were cloned from brain, which encode three preprosomatostatins (PSS) designated as PSS-I, PSS-II, and PSS-III, potentially processing into SRIF-14 with sequence identical to mammalian SRIF-14, SRIF-28 with [Glu¹, Tyr⁷, Gly¹⁰]SRIF-14 at its C-terminus, and [Pro²]SRIF-14, respectively (Lin et al., 1999). In addition, type one, two,

* Corresponding author. Fax: +1-780-492-9234.

E-mail address: dick.peter@ualberta.ca (R.E. Peter).

and five SRIF receptors have been identified and characterized in goldfish brain and pituitary (Lin et al., 1999, 2000, 2002). The identification of three distinct SRIF genes and multiple types of SRIF receptors in goldfish makes this species an ideal model for study of the role of SRIF in the regulation of GH release. In our recent studies, sex steroids have been shown to act on the brain level to regulate PSS-I and PSS-III gene expression in forebrain, which in turn influences the regulation of GH secretion (Canosa et al., 2002). Sex steroid hormones also have effects on the type two SRIF receptor gene expression in goldfish pituitary but not brain (Lin et al., 2000). In mammals, although all five types of SRIF receptors are expressed in the major pituitary cell types; *sst*₅ and *sst*₂ are the principle subtypes expressed in the rat pituitary somatotrophs (Kumar et al., 1997). In addition, using subtype-selective peptidyl or nonpeptidyl analogs, it has been demonstrated that *sst*₂ and *sst*₅ are involved in the inhibition of stimulated GH secretion from rat pituitary cells (Parmar et al., 1999; Shimon et al., 1997). Our previous studies also showed that in goldfish *sst*₂ and *sst*₅ are highly expressed in the pituitary (Lin et al., 2000, 2002; Lin and Peter, 2003).

In this study, we examined the differences in pituitary responsiveness to SRIF-14 between regressed and mature female goldfish, and between natural and estradiol-primed sexually regressed female goldfish. We also examined the differences in brain and pituitary *sst*₂ mRNA levels between sexually regressed, recrudescing and mature female goldfish.

2. Materials and methods

2.1. Animals

Goldfish (*Carassius auratus*) of the common or comet varieties with body weight (bw) ranging from 20 to 50 g were purchased from Mt. Parnell Fisheries (Mercersburg, PA) for experiments in Edmonton, and local dealers for experiments in Mexico, and maintained in 300 L aquaria at 17 °C in Edmonton and 21 °C in Mexico under simulated local photoperiods. The fish were fed with commercial prepared food (United Feeds, Calgary, Canada or Warley, USA). Sexually regressed, recrudescing and mature fish were used for the experiments. Goldfish were anesthetized with 0.05% tricaine methanesulfonate (Syndel, Vancouver, BC, Canada) before treatment and sample collection.

2.2. Reagents and substances

Estradiol and SRIF-14 were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Trizol reagent, Hanks' salt solution and M-199 medium were purchased from Life Technologies (Gaithersburg, MD). Complete EDTA-free

Protease inhibitor cocktail was obtained from Roche (Indiana, IN). Solid silicone pellets containing estradiol (100 µg/g bw), testosterone (100 µg/g bw) or no steroid (blank) were manufactured according to Pankhurst et al. (1986), washed in saline and implanted intraperitoneally for five days, as described by Trudeau et al. (1991). This method ensures a stable hormone supply for, at least, 20 days (Pankhurst et al., 1986). For each experiment, the animals were anaesthetized and blood, forebrain and pituitary samples collected. Forebrain and pituitary tissues were maintained at -70 °C until RNA extraction. Blood was allowed to clot overnight at 4 °C and then centrifuged, and serum was collected and stored at -20 °C until radioimmunoassay (RIA).

2.3. Perfusion of pituitary fragments

Pituitaries from estradiol-primed or control sexually regressed female goldfish were collected and put in 15 ml of ice-cold Hanks' solution with 15 mM Hepes and 0.3% BSA. The pituitaries were washed three times in same Hanks' solution and chopped into fragments (less than 0.125 mm³). Fragments were placed into 0.5 ml perfusion chamber (3.5 pituitaries/chamber). The fragments were perfused with M199, 15 mM Hepes and Nystatin overnight at flow rate 5 ml/h at 18 °C. Next morning the medium was switched to Hanks' solution with 15 mM Hepes and 0.1% BSA (HHBSA) and the flow rate increased to 15 ml/h. After 2 h perfusion to stabilize the basal level of hormone release, the medium was collected in 5 min fractions. After collection of 12 fractions (60 min), the pituitary fragments were challenged with a single 2 min pulse of 1 nM SRIF-14 and the medium was collected for another 50 min in 5 min fractions. The samples were kept at -25 °C until GH determination.

2.4. Static cultures of pituitary fragments

Pituitaries from sexually mature (GSI > 8%) or regressed (GSI < 2%) female goldfish were collected, and kept in Hanks' solution containing 0.3% BSA at 4 °C. The pituitaries were washed three times with the same solution and chopped manually into fragments (less than 0.125 mm³). The fragments were distributed into 24-well cluster plates with the equivalent of three pituitaries per well, and cultured overnight in M199 containing 15 mM Hepes and Nystatin in a humidified atmosphere (28 °C) containing 5% CO₂ (Chang et al., 1990). Following the overnight culture, the medium was changed to HHBSA (test medium) and the fragments were allowed to rest for 1 h. Then the medium was changed twice with fresh medium. The fragments were allowed to rest for 30 min in test medium and three wells of pituitary fragments were removed and their media collected before application of SRIF-14 (pre-application). Then the rest of pituitary fragments were treated

with SRIF-14 for 30 min by replacing the medium with fresh medium containing 1 nM SRIF-14. After the 30 min treatment, the pituitary fragments were removed and their media collected. The media were stored at -40°C until determination of GH concentrations. The pituitary fragments were frozen on dry ice and stored at -70°C for determination of GH content and protein concentrations. The pituitary fragments were washed with double distilled water containing inhibitor of proteases (pH 9.0) and homogenized with 1 ml double distilled water with pre-chilled glass homogenizer. The samples were centrifuged at 600g for 5 min at 4°C and the supernatant was transferred to a fresh tube. The determination of proteins was by the Bradford method using BSA as standard (Bradford, 1976).

2.5. GH radioimmunoassay

Serum and pituitary GH concentrations were determined using a double antibody RIA as described previously (Marchant et al., 1989).

2.6. Slot blot analysis

Pituitaries and forebrain (telencephalon including preoptic region and hypothalamus (Lin et al., 1999), from sexually regressed (GSI lower than 2%), recrudescing (GSI between 3 and 8%), and mature (GSI higher than 8%) female goldfish were dissected and frozen immediately on dry ice. Total RNA was extracted using Trizol reagent, based on the acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction method (Chomczynski and Sacchi, 1987).

Total RNA was blotted onto a Hybond nylon membrane (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) using a Bio-Dot SF blotting apparatus (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Specific cDNA probes for *sst2* and goldfish β -actin were amplified by PCR according to Lin et al. (2000) and labeled with [α - ^{32}P]dCTP using T7 Quick primer Kit (Pharmacia Biotech, Baie d'Urfe, Que., Canada) based on the random primer method (Fienberg and Vogelstein, 1983). The labeled probes were purified through a silica cartridge using the QIAquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Santa Clarita, CA, USA). Hybridization was performed according to Church and Gilbert (1984). The membranes were pre-hybridized in hybridization solution (0.5 M NaH_2PO_4 , 7% SDS, 1 mM EDTA, 1% BSA) for 3 h. The hybridization solution was then replaced by fresh hybridization solution and 10^6 cpm per ml of labeled probe was added. After overnight hybridization at 65°C the membranes were washed three times for 30 min with wash solution (40 mM NaH_2PO_4 , 1 mM EDTA, 1% SDS) and exposed to a Phosphorimager screen for 72 h. As internal control, the membranes were stripped and reprobed with [α - ^{32}P]dCTP labeled cDNA

probe for goldfish β -actin. The radioactive signal was scanned using a Phosphorimager 445 SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) and quantified by ImageQuant Software (Molecular Dynamics).

3. Results

Treatment of pituitary fragments with a 2 min pulse of 1 nM SRIF-14 resulted in significant reduction in GH release in control, and estradiol- and testosterone-treated fish (Figs. 1A and B). The pituitaries from testosterone-treated fish performed similarly to those from control fish (Fig. 1B). In both cases the pituitary fragments had decreased release of GH in the first fraction following exposure to the SRIF pulse, with decreased release lasting for a total of up to eight fractions (40 min) and recovery back to the baseline at about 45 min (Fig. 1A). In the pituitary fragments from estradiol-treated fish, a significant decrease in the GH release response to SRIF-14 pulse was observed at only 15 min (third fraction) after the introduction of the pulse (Fig. 1A). The

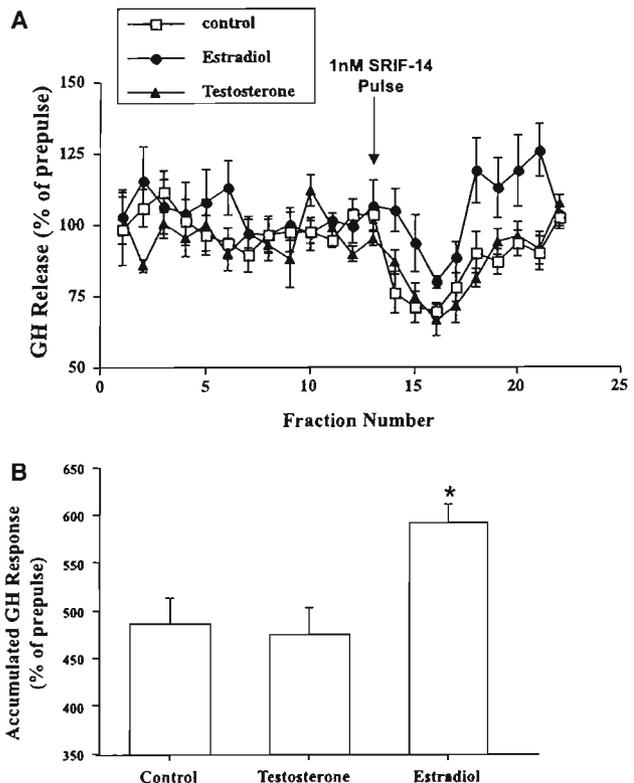


Fig. 1. (A) Effect of 2 min pulse of 1 nM SRIF-14 on GH release from perfused pituitary fragments from regressed female goldfish implanted with estradiol, testosterone or blank pellet for 5-days. The GH release is expressed as percentage of prepulse. Each point is the mean of data from nine columns. (B) The accumulated GH response of the eight post-pulse fractions measured as a percentage of prepulse GH levels. *Significantly different from control, $p < 0.05$. All values are means \pm SEM.

Table 1
Effects of 30 min treatment with 1 nM SRIF-14 on GH release (ng/ml) from goldfish pituitary fragments in the static culture

	Sexually regressed GH (ng/ml)	Sexually mature GH (ng/ml)
Pre-application	439.3 ± 16.24	679.55 ± 32.35*
1 nM SRIF-14	304.9 ± 9.82	562.4 ± 12.6
% Inhibition	30.74 ± 1.35	17.52 ± 1.96*

Note. The values are mean of three experiments (each triplicate) ± SEM.

*Significantly different compared to sexually regressed fish, $p < 0.05$.

inhibition lasted for only two fractions (10 min) and then GH release rebounded to above, but not significantly different from, the prepulse basal levels. The accumulated GH response of the eight post-pulse fractions pulse was significantly greater for pituitaries from estradiol-treated fish, compared to controls and testosterone-treated fish.

In the static cultures, basal rate of GH release was significantly higher by pituitaries from sexually mature females compared to sexually regressed females (Table 1). The inhibitory effect of 30 min treatment with 1 nM SRIF-14, as indicated by percent of inhibition, on pituitary GH release was significantly less in pituitaries from mature females than that in pituitaries from regressed fish (Table 1). The pituitary GH content of sexually mature fish was significantly greater than in the regressed fish, and the GH content was significantly increased in both regressed and mature fish after 30 min treatment with 1 nM SRIF-14 in the static culture (Table 2). However, the magnitude of the increase in pituitary GH content was not significantly different between the pituitaries from sexually mature and regressed (37% increase) and sexually mature (32% increase) fish.

Significantly lower mRNA levels for pituitary *sst*₂ were found in sexually mature and recrudescing female goldfish when compared to regressed fish, under natural conditions (Fig. 2A); pituitary *sst*₂ mRNA levels in recrudescing and mature females were 70 and 65% of those in regressed females. However, in forebrain there were no significant differences in *sst*₂ mRNA levels during the gonadal cycle (Fig. 2B).

Table 2
GH content (ng/mg protein) in the pituitaries from sexually regressed females and mature females, before and after 30 min treatment with 1 nM SRIF-14

	Sexually regressed GH (ng/mg protein)	Sexually mature GH (ng/mg protein)
Pre-application	25.1 ± 1.3	42.5 ± 3.0*
After 30 min exposure to SRIF-14	34.4 ± 2.3**	55.8 ± 3.9**

*Significantly different compared to sexually regressed fish, $p < 0.05$.

**Significantly different from pre-application levels, $p < 0.05$.

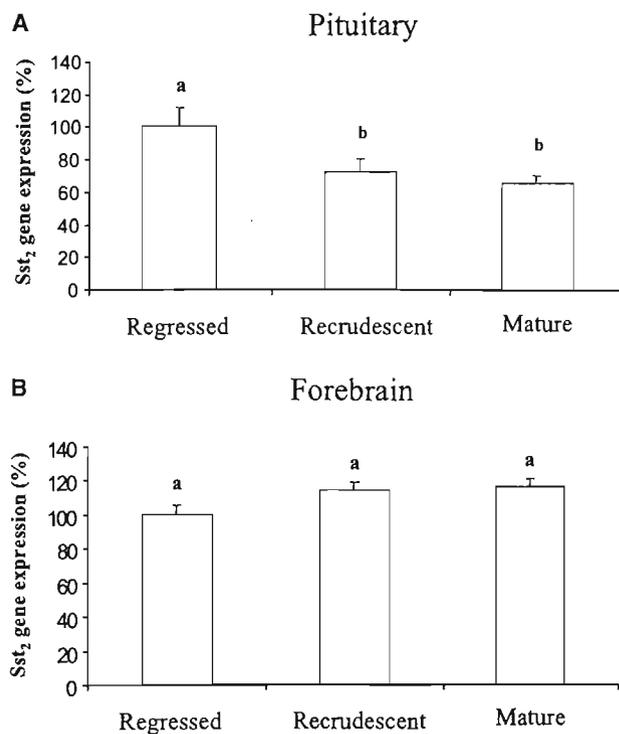


Fig. 2. *Sst*₂ mRNA expression in the pituitary (A) and forebrain (B) from sexually regressed, recrudescing, and mature female goldfish. *Sst*₂ mRNA levels were quantified by slot blot. The *sst*₂ mRNA levels were expressed as a ratio of *sst*₂ mRNA and β -actin mRNA (internal control), and expressed as percentage of regressed group. Data are means ± SEM ($n = 10$ –14 pools/group, 3 pituitaries/pool and 12–16 samples/group in panel A and B, respectively). Statistical analysis was performed using ANOVA followed by Student–Newman–Keuls multiple comparison test. Different letters indicate significant differences with $p < 0.05$.

4. Discussion

The results demonstrate that pituitaries from sexually mature female goldfish or estradiol-treated sexually regressed females have a decreased GH release-response to SRIF-14 compared with sexually regressed fish. This was demonstrated by two in vitro approaches. In perfused pituitary fragments, the suppression of GH release by a pulse of SRIF-14 was smaller in magnitude and for a shorter period of time in the case of pituitaries from estradiol-treated sexually regressed fish compared to pituitaries from controls or testosterone-treated fish. In static culture conditions, SRIF-14 induced a smaller relative inhibition of GH release in pituitaries from sexually mature female fish compared to sexually regressed fish. Holloway et al. (1997) demonstrated that estradiol-primed immature rainbow trout also have decreased pituitary GH responsiveness to SRIF-14. This decrease in responsiveness to SRIF-14 occurs in spite of the fact that circulating GH levels are higher in sexually mature fish (when the sex steroid hormones are higher) and in estradiol-primed female fish (Bjornsson et al.,

1994; Kakizawa et al., 1995; Sumpter et al., 1991; Trudeau et al., 1992; unpublished observations). In vitro, GH release is higher in pituitaries from sexually mature goldfish compared to sexually regressed fish (Trudeau et al., 1992; Zhou et al., 1997; present study). An important mechanism underlying the increase in GH secretion in sexually mature fish is likely the decrease in responsiveness to SRIF.

The results of the present study provide at least a partial explanation to the mechanisms underlying the decrease in responsiveness to SRIF. Significantly lower levels of *sst*₂ mRNA were found in pituitaries of sexually recrudescing and mature females compared with sexually regressed females. In our previous studies, we found that estradiol-priming of sexually regressed female goldfish caused a significant reduction in *sst*₂ mRNA levels in pituitary, but not in brain (Lin et al., 2000). These results indicate that increased estradiol levels cause a decrease in the expression of the *sst*₂ SRIF receptor subtype and, consequently, there will likely be a reduction in number of the *sst*₂ SRIF receptor subtype in the pituitary. This may be at least part of the underlying mechanism for the decrease in somatotrope responsiveness to SRIF-14 in sexually mature fish or estradiol-treated sexually regressed fish, and the subsequent increase in GH release and circulating GH levels. However, both *sst*₂ and *sst*₅ receptors are highly expressed in goldfish pituitary (Lin et al., 2000, 2002; Lin and Peter, 2003), and *sst*₁ and *sst*₃ are expressed at low levels (Lin et al., 1999; Lin and Peter, 2003). Additional studies are needed to determine whether any receptors in addition to *sst*₂ play a role in changes in pituitary responsiveness to SRIF-14.

Contrary to the findings in fish, in mammals, it is generally accepted that estradiol reduces basal and growth hormone-releasing hormone-stimulated GH release (Djordjijevic et al., 1998; Hertz et al., 1989; Jansson et al., 1985). Consistent with the suppressing effects of estradiol on GH release, estradiol up-regulates expression of *sst*₂ mRNA in rat pituitary in vivo (Kimura et al., 1998) and in vitro (Djordjijevic et al., 1998). In addition, a distal 1.5 kb fragment located 3.8 kb from the transcriptional start sites of the human *sst*₂ gene has been shown to mediate the positive transcriptional regulation by estradiol in T47D cells, a human breast cancer cell line (Xu et al., 1998), indicating that the regulation of *sst*₂ gene expression by estrogen could occur at the transcriptional level.

Goldfish express three genes in brain encoding SRIF (see Section 1). Expression of the gene encoding SRIF-14 is highest in sexually mature female goldfish; whereas, expression of the SRIF-28 and [Pro²]SRIF-14 genes are highest in sexually regressed females (Lin et al., 1999). Estradiol treatment of sexually regressed female goldfish causes a large increase in expression of SRIF-14 gene, and a modest increase in expression of [Pro²]SRIF-14

gene, but no effect on expression of SRIF-28 gene (Canosa et al., 2002). It is not clear which of the three SRIFs is the primary regulator of GH release, if indeed any one of the three plays such a role. The potencies for SRIF-14 and [Pro²]SRIF-14, as determined by inhibition of GH release by goldfish pituitaries in vitro, are in a similar low nanomolar range (Lin et al., 1999), providing no evident differences between at least these two peptides. However, goldfish SRIF-28 is somewhat more potent than SRIF-14 and [Pro²]SRIF-14 in terms of binding to goldfish *sst*₅ receptors expressed in CCL39-SRE-Luci cells (Lin et al., 2002), suggesting that additional studies may reveal some functional differences between the three native peptides in their abilities to inhibit GH release. In rainbow trout estradiol exerts a negative effect on SRIF gene expression in brain (Holloway et al., 2000).

Taken together, the results of the present study and previous work in our laboratory indicate that the mechanism of regulation of GH release by sex steroid hormones includes actions of the steroids on SRIF production at the brain level and on SRIF receptor production at the pituitary level. The latter provides a basis, at least in part, for the seasonal alterations in pituitary responsiveness to SRIF.

Acknowledgments

This research was supported by Grant A6371 to REP from the Natural Sciences and Engineering Research Council of Canada (NSERC). We acknowledge the financial support from Concejo Nacional de Investigaciones Cientificas y Tecnicas (CONICET), Argentina of Post-Doctoral Fellowship to LFC. We thank Dr. J.P. Chang for assistance with the growth hormone radioimmunoassays.

References

- Bjornsson, B., Taranger, G.L., Hansen, T., Stefansson, S.O., Haus, C., 1994. The interrelation between photoperiod, growth, and sexual maturation of adult atlantic salmon (*Salmo salar*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 93, 70–81.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Canosa, L.F., Lin, X., Peter, R.E., 2002. Regulation of expression of somatostatin genes by sex steroid hormones in goldfish forebrain. *Neuroendocrinology* 76, 8–17.
- Chang, J.P., Cook, H., Freedman, G.L., Wiggs, A.J., Somoza, G.M., de Leeuw, R., Peter, R.E., 1990. Use a pituitary cell dispersion method and primary culture system for the studies of gonadotropin-releasing hormone action in the goldfish, *Carassius auratus*. I Initial morphology, static and cell column perfusion studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77, 256–273.

- Chomczynski, P., Sacchi, N., 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate–phenol–chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 1556–1559.
- Church, G.M., Gilbert, W., 1984. Genomic sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81, 1991–1995.
- Djordjijevic, D., Zhang, J., Priam, M., Viollet, C., Gourdj, D., Kordon, C., Epelbaum, J., 1998. Effect of 17 β -estradiol on somatostatin receptor expression and inhibitory effects on growth hormone and prolactin release in rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 139, 2272–2277.
- Fienberg, A.P., Vogelstein, B., 1983. A technique of radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132, 6–13.
- Hertz, P., Silberman, M., Even, L., Hochberg, Z., 1989. Effects of sex steroids on the response of cultured rat pituitary cells to growth hormone-releasing hormone and somatostatin. *Endocrinology* 125, 581–585.
- Holloway, A.C., Melroe, G.T., Ehrman, M.M., Reddy, P.K., Leatherland, J.F., Sheridan, M.A., 2000. Effect of 17 β -estradiol on the expression of somatostatin genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 279, R389–R393.
- Holloway, A.C., Sheridan, M.A., Leatherland, J.F., 1997. Estradiol inhibits plasma somatostatin 14 (SRIF-14) levels and inhibits the response of somatotrophic cells to SRIF-14 challenge in vitro in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 407–414.
- Jansson, J.O., Edén, S., Isaksson, O., 1985. Sexual dimorphism in the control of growth hormone secretion. *Endocrine Rev.* 6, 128–147.
- Kakizawa, S., Kaneko, T., Ogasawara, T., Hirano, T., 1995. Changes in plasma somatolactin levels during spawning migration of chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Fish Physiol. Biochem.* 14, 93–101.
- Kimura, N., Tomizawa, S., Arai, K.N., Kimura, N., 1998. Chronic treatment with estrogen up-regulates expression of sst2 messenger ribonucleic acid (mRNA) but down-regulates expression of sst5 mRNA in rat pituitaries. *Endocrinology* 139, 1573–1580.
- Kumar, U., Laird, D., Srikant, C.B., Escher, E., Patel, Y.C., 1997. Expression of the five somatostatin receptor (SSTR1–5) subtypes in rat pituitary somatotrophs: quantitative analysis by double-label immunofluorescence confocal microscopy. *Endocrinology* 138, 4473–4476.
- Lin, X., Otto, C.J., Peter, R.E., 1999. Expression of three distinct somatostatin messenger ribonucleic acids (mRNAs) in goldfish brain: characterization of the complementary deoxyribonucleic acids, distribution and seasonal variation of mRNAs, and action of somatostatin-14 variant. *Endocrinology* 140, 2089–2099.
- Lin, X., Peter, R.E., 2003. Somatostatin-like receptors in goldfish: cloning of four new receptors. *Peptides* 24, 53–63.
- Lin, X., Janovick, J.A., Cardenas, R., Conn, P.M., Peter, R.E., 2000. Molecular cloning and expression of a type-two somatostatin receptor in goldfish brain and pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 166, 75–87.
- Lin, X., Nunn, C., Hoyer, D., Rivier, J., Peter, R.E., 2002. Identification and characterization of a type five-like somatostatin receptor in goldfish pituitary. *Mol. Cell. Endocrinol.* 189, 105–116.
- Marchant, T.A., Dulka, J.G., Peter, R.E., 1989. Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary levels of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73, 458–468.
- Pankhurst, N.W., Stacey, N.E., Peter, R.E., 1986. An evaluation of techniques for the administration of 17 β -estradiol to teleosts. *Aquaculture* 52, 145–155.
- Parmar, R.M., Chan, W.W.-S., Dashkevich, M., Hayes, E.C., Rohrer, S.P., Smith, R.G., Schaeffer, J.M., Blake, A.D., 1999. Nonpeptidyl somatostatin agonists demonstrate that Sst2 and Sst5 inhibit stimulated growth hormone secretion from rat anterior pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 263, 276–280.
- Melamed, P., Eliahu, N., Levavi-Sivan, B., Ofir, M., Frachi-Pisanty, O., Rentier-Delrue, F., Smal, J., Yaron, Z., Naor, Z., 1995. Hypothalamic and thyroidal regulation of growth hormone in tilapia. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 13–30.
- Shimon, I., Taylor, J.E., Dong, J.Z., Bitonte, R.A., Kim, S., Morgan, B., Coy, D.H., Culler, M.D., Melmed, S., 1997. Somatostatin receptor subtype specificity in human fetal pituitary cultures. Differential role of SSTR2 and SSTR5 for growth hormone, thyroid-stimulating hormone, and prolactin regulation. *J. Clin. Invest.* 99, 789–798.
- Stacey, N.E., Mackenzie, D.S., Marchant, T.A., Kyle, A.L., Peter, R.E., 1984. Endocrine changes during natural spawning in the white sucker, *Catostomus commersoni*. I. Gonadotropin, growth hormone and thyroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 56, 333–348.
- Sumpter, J.P., Lincoln, R.F., Bye, V.J., Carragher, J.F., Le Bail, P.Y., 1991. Plasma growth hormone levels during sexual maturation in diploid and triploid rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 83, 103–110.
- Trudeau, V.L., Peter, R.E., Sloley, B.D., 1991. Testosterone and estradiol potentiate the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in goldfish. *Biol. Reprod.* 44, 951–960.
- Trudeau, V.L., Somoza, G.M., Nahorniak, C.S., Peter, R.E., 1992. Interactions of estradiol with gonadotropin-releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone in the control of growth hormone secretion in the goldfish. *Neuroendocrinology* 56, 483–490.
- Xu, Y., Berelowitz, M., Bruno, J.F., 1998. Characterization of the promoter region of the human somatostatin receptor subtype 2 gene and localization of sequences required for estrogen-responsiveness. *Mol. Cell. Endocrinol.* 139, 71–77.
- Zhou, J.J., Trudeau, V.L., Cui, Z., Brechin, J., Mackenzie, K., Zhu, Z., Houlihan, D.F., Peter, R.E., 1997. Estradiol stimulates growth hormone production in female goldfish. *Gen. Comp. Endocrinol.* 106, 102–112.