

00346

2
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
División de Estudios de Posgrado

DISTRIBUCION DE RECEPTORES A
SOMATOSTATINA EN EL ENCEFALO
DE PEZ DORADO

T E S I S

Que para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)

p r e s e n t a:

RODOLFO CARDENAS REYGADAS

DIRECTOR DE TESIS: DR. CARLOS ARAMBURO DE LA HOZ

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1998

268100



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.

AGRADECIMIENTOS

Cuando se llega a esta parte del texto que generalmente, es de lo último que se escribe, pero de las primeras cosas que quien revisa un trabajo lee, él o los autores hacen recuento de todas las personas que ayudaron para que el trabajo lograra buen término, y lo que menos se desea es cometer omisiones, si acaso cometo alguna, mil disculpas.

Primeramente deseo expresar mi más profundo agradecimiento a tres personas. Las tres confiaron en mi e impulsaron el trabajo de una manera sobresaliente, no sólo con el estímulo de sus palabras, sino apoyando el proyecto con recursos materiales y brindando valiosos comentarios e ideas. Estas tres personas son: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, el director de este trabajo, Dr. Richard Ector Peter, jefe del laboratorio de Neuroendocrinología de teleósteos y Decano de la facultad de Ciencias de la Universidad de Alberta, Canada, y Carol Nahorniak, en esos momentos técnico académico de Dick. Para ustedes tres, decir muchas, muchas gracias es muy poco.

La Dra. Beverly A. Himick con su amplia experiencia también contribuyo de una manera notable a este trabajo.

A mi comité tutorial : Dra. Rosario Muñoz C. y Dra. Rebecca E. Franco y Bourland, muchas gracias por el sin fin de sugerencias y consejos en estos dos años.

Al Dr. Luis A. Baiza G., MIIB Gustavo Ortega L., Dr. Alfredo A. Ulloa A. y Dr. Baltazar Barrera M. por su trabajo y valiosos comentarios.

Estoy también en deuda con la Dra. Maricela Luna quien me auxilió en la requisición de materiales.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Jesús Calderón Tinoco, jefe del Depto de Biología Celular, y las Doctoras Martha Romano y Ma. Eugenia Mendoza del Depto de Fisiología, por todas las facilidades brindadas en sus respectivos laboratorios del CINVESTAV, Zacatenco.

A Mónica Chávez M., por su asistencia técnica en varios de los experimentos realizados, gracias.

A mis amigos de siempre de la ENEP Iztacala, M. en C. Ignacio Peñalosa Castro, M. en C. Sergio Vaca Pacheco, Biol. José del Carmen Benítez Flores, Dr. Luis Arturo Baiza Gutman, M. en C. Ramón Moreno Torres, Biol. Elías Piedra Ibarra, Biol. Héctor Barrera Escorcía, M. en C. Guadalupe Martínez Hernández, Biol. Leticia Verdín Terán, C.D. Francisco Gómez Clavel, Biol. Enrique Godínez Cano, Biol. Amaya González Ruíz, Biol. Esmaragdo Jiménez Nogales, Biol. Mario Chávez Arteaga, Biol. Ramón Cisneros Barrios, Biol. Roberto Rico Montiel, Biol. Antonio Meyran Camacho, por su amistad incondicional mostrada a lo largo de los años.

Finalmente, el más grande de los agradecimientos a quienes directamente han soportado neurosis y frustraciones, no sólo en este periodo, mi familia, a mis hermanas Poli, Chela y Chacha, a mi sobrino Juan, y a quienes además de lo anterior, me han cedido mucho de su tiempo y me han demostrado su paciencia, confianza y amor: mi esposa Paty y mis hijos Andrea y Luis.

ÍNDICE

Antecedentes

La Somatostatina.....	1
<i>Generalidades</i>	1
<i>Características estructurales de las somatostatinas</i>	1
<i>Efectos de la somatostatina en diversos sistemas</i>	2
<i>Importancia clínica y terapéutica de la somatostatina y sus análogos</i>	4
<i>Parte activa de la molécula</i>	7
<i>Estudios acerca de la somatostatina en peces</i>	7
Receptores a Somatostatina.....	12
<i>Generalidades</i>	12
<i>Subtipos de receptores a somatostatina</i>	15
<i>Sistemas de transducción de señales usados por la somatostatina</i>	19
<i>Expresión de los subtipos de receptor</i>	21
Objetivos	23
Metodología	24
<i>Animales usados para el experimento</i>	24
Procedimientos experimentales.....	25
<i>Experimentos para la caracterización cinética del receptor a somatostatina</i>	25
<i>Experimentos de distribución del receptor a través del encéfalo</i>	27

Resultados	33
<i>Caracterización cinética del receptor</i>	33
<i>Distribución del receptor α somatostatina en el encéfalo de pez dorado</i>	39
Discusión	52
Conclusiones	58
Referencias	59

RESUMEN

La somatostatina es una molécula que presenta una amplia distribución en los organismos. Catalogada como hormona y neuromodulador, entre sus principales efectos encontramos la inhibición de la secreción de las hormonas de crecimiento, estimulante de la tiroides, adrenocorticotrópica en la hipófisis; en el páncreas es inhibidora de la secreción de insulina, del glucagon y de enzimas digestivas, mientras que en tracto digestivo es inhibidora de la secreción de gastrina y motilina, siendo ello sólo ejemplos de la abundancia de los sistemas en que la somatostatina participa.

Los efectos de la somatostatina son mediados a través de receptores de membrana.

En mamíferos se ha determinado la existencia de cinco diferentes subtipos de receptores a somatostatina denominados sstr1, sstr2, sstr3, sstr4, y sstr5.

Diversos mecanismos de transducción son utilizados por los receptores a somatostatina. Así encontramos receptores asociados a adenilil ciclasa, a canales de potasio, a canales de calcio, acoplados a vesículas de exocitosis y asociados a tirosinfosfatasas.

En peces también se ha demostrado que la somatostatina es inhibidor de la secreción de la hormona de crecimiento por parte de la hipófisis, pero, hasta el presente reporte, no existe ningún antecedente de receptores a somatostatina para algún órgano en teleósteos.

En este trabajo se determinaron algunas de las características cinéticas del receptor a somatostatina del encéfalo de pez dorado, como son: afinidad, especificidad, saturabilidad, efectos de pH sobre la afinidad del receptor, cinética de unión de la somatostatina al receptor a temperatura ambiente y a 4°C, así como su distribución en el encéfalo del pez dorado (*Carassius auratus*).

Los resultados fueron la unión de la somatostatina con su receptor en un rango de concentración nanomolar, una alta especificidad del receptor a su ligando cuando es comparada su unión con la de colecistocinina, sustancia P, metionina-encefalina, y péptido vasoactivo intestinal. El sistema tiene una saturabilidad de 63 pM/L. Los receptores a somatostatina tuvieron una mejor unión al ligando a pH de 7.2 que en otros pH probados. La unión de los receptores a somatostatina y el ligando fue mayor a 22°C y con una estabilidad de aproximadamente de 40 a 90 minutos.

Se encontró que a lo largo de todo el encéfalo existe presencia de receptores a somatostatina, y en especial una abundancia de receptores ligada a 4 grandes zonas: la región hipotalámica, el tectum óptico, el tracto mesencéfalo-cerebelar y el lóbulo vago, los cuales guardan relación con el sistema neuroendócrino, integración de estímulos externos, transmisión de información del techo óptico al cerebelo y sentido del gusto respectivamente.

ABREVIATURAS

AA	Ácido araquidónico
aa	Aminoácido(s)
BSA	Albúmina sérica de bovino
Ca _i ⁺⁺	Calcio intracelular
cAMP	Adenosin monofostato cíclico
CCK-8	Colecistocinina 8 sulfato
Ci	Curies
cpm	Cuentas por minuto
CRE	Elemento de respuesta al cAMP
g	Gravedad
G _i	Proteína G inhibidora
K	Potasio
K _a	Constante de afinidad
LH	Hormona luteinizante
LR	Complejo ligando-receptor
M	Molar
mCi	MiliCuries
met-enc	Metionina- encefalina
mM	Milimolar
N	Solución de concentración expresada en normalidad
FSH	Hormona foliculo estimulante
PKA	Proteincinasa A
SP	Sustancia P
SS ó SRIF	Somatostatina
UE	Unión específica
UNE	Unión no específica
UT	Unión total
VIP	Péptido vasoactivo intestinal
¹²⁵ I	Yodo radioactivo (isotopo yodo 125)

DISTRIBUCIÓN DE RECEPTORES A SOMATOSTATINA EN EL ENCÉFALO DE PEZ DORADO.

RODOLFO CARDENAS REYGADAS.

ASESOR : DR. CARLOS ARÁMBURO DE LA HOZ

ANTECEDENTES

LA SOMATOSTATINA.

Generalidades.

La somatostatina es un péptido descubierto por Brazeau *et al.* en 1973 en el hipotálamo de mamíferos. Posteriormente se descubrió que poseía una distribución más amplia en el organismo. Entre los órganos que de manera natural producen dicho péptido, además de la zona hipotalámica anteriormente referida, se encuentran: el sistema nervioso central en el telencéfalo, el diencéfalo, el mesencéfalo, el rombencéfalo y la médula espinal; los islotes de Langerhans en especial en las células δ del páncreas endocrino, el tracto gastrointestinal, y la retina, por mencionar algunos ejemplos de la amplia distribución del péptido (Patel, 1992). Inclusive, la somatostatina se ha encontrado en invertebrados como en el caracol *Helix aspersa* (Monnier y Bride, 1995), siendo otra muestra de la muy amplia distribución zoológica del péptido no sólo entre los vertebrados, sino entre muchos de los organismos a través de la escala evolutiva.

Características estructurales de las somatostatinas.

La somatostatina en su forma básica es un tetradecapéptido (14 aminoácidos) con una secuencia que incluye dos cisteínas unidas por un puente disulfuro (Figura 1a). Esta forma molecular es conocida como somatostatina 14 (SRIF-14 ó SS-14), obviamente debido al número de aminoácidos que contiene. Sin embargo, existe otra forma que incluye la secuencia de aminoácidos de la somatostatina 14, y presenta una extensión en su extremo

amino terminal con otros 14 aminoácidos. Esta forma molecular es denominada somatostatina 28 (SRIF-28 ó SS-28), en analogía con la primera (Figura 1b). Además de estos dos tipos moleculares descritos en mamíferos, en peces se han encontrado otras dos variantes de somatostatina, la llamada somatostatina 22 (SRIF-22 ó SS-22), la cual fue aislada a partir de una especie de bagre (género *Ictalurus*), que también contiene una secuencia de 14 aminoácido muy parecida a la molécula base de SRIF-14 en donde 7 de estos 14 aminoácidos son idénticos, y presenta una extensión de otros ocho aminoácidos hacia el extremo amino terminal (Figura 1c) (Andrew *et al.*, 1984), y la somatostatina 25 (SRIF-25 ó SS-25), forma molecular aislada a partir del salmón (*Oncorhynchus kisutch*), que al igual que el resto de las somatostatinas presenta incorporado en su porción carboxilo terminal, una secuencia de aminoácidos muy parecida en relación con las anteriores moléculas, y una extensión amino terminal de otros 11 aminoácidos (Figura 1d).

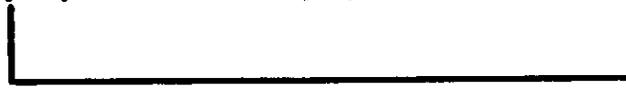
Estas dos últimas fueron aisladas a partir del páncreas endocrino de las especies correspondientes y la SRIF-25 parece guardar una mayor relación fisiológica con el metabolismo de la glucosa, pues cuando se inyectó a salmones juveniles, los resultados fueron la disminución de los niveles de insulina en la sangre, la utilización del glucógeno hepático y la activación de las vías lipolíticas (Plisetskaya *et al.*, 1986).

Efectos de la somatostatina en diversos sistemas.

La somatostatina desempeña fundamentalmente un papel inhibitor en todos los sistemas en los cuales se ha encontrado (Patel y Srikant, 1997). Así, en la hipófisis es el principal inhibitor de la secreción de la hormona de crecimiento en todos los grupos de vertebrados estudiados para tal efecto y en este mismo órgano de igual manera inhibe la secreción de las hormonas estimulante de la tiroides y estimulante de la glándulas suprarrenales; mientras que en el páncreas, es inhibitor de la secreción de insulina y de glucagon, además de inhibir la secreción de enzimas y bicarbonato; en el tracto gastrointestinal inhibe la secreción de gastrina, motilina, secretina, colecistocinina, péptido vasoactivo intestinal, neurotensina, ácido gástrico, pepsina. Inhibe también procesos como el flujo sanguíneo, la

A

Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys.



B

Ser-Ala-Asn-Ser-Asn-Pro-Ala-Met-Ala-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala*-Gly*-
Cys*-Lys*-Asn*-Phe*-Phe*-Trp*-Lys*-Thr*-Phe*-Thr*-Ser*-Cys*



C

Asp-Asn-Thr-Val-Thr-Ser-Lys-Pro-Leu-Asn-Cys*-Met-Asn*-Tyr-Phe*-Trp*-
Lys*-Ser-Arg-Thr*-Ala-Cys*



D

Ser-Val-Asp-Asn-Leu-Pro-Pro-Arg-Glu-Arg-Lys-Ala*-Gly*-Cys*-Lys*-Asn*-
Phe*-Tyr-Trp*-Lys*-Gly-Phe*-Thr*-Ser*-Cys*



Figura 1.- Estructura primaria de las diferentes formas de somatostatina.

A) Secuencia de la Somatostatina 14

B) Secuencia de la Somatostatina 28 (mamíferos)

C) Secuencia de la Somatostatina 22 (*Ichthialurus*)

D) Secuencia de la Somatostatina 25 (*Oncorhynchus kisutch*)

Los asteriscos (*) indican los aminoácidos idénticos en relación a la forma de somatostatina 14 incluidos en las secuencias de las otras formas de somatostatina.

motilidad intestinal, y la absorción de nutrientes y de iones; en el riñón también presenta función inhibitoria de la secreción de la renina y la absorción de agua, y en la tiroides inhibe la secreción de las hormonas tiroideas triyodotironina y tiroxina, mientras que, en regiones específicas del encéfalo como el hipotálamo es capaz de inhibir la secreción de la hormona liberadora de la hormona estimulante de la tiroides, la hormona liberadora de la hormona corticotrópica, norepinefrina y de la misma somatostatina (Tabla I) (Patel, 1992), y se propone que participa en la regulación de la secreción de la hormona de crecimiento a este nivel del sistema nervioso, en especial en el núcleo arcuatus, pues al menos en aproximadamente el 35 % de las neuronas que contienen hormona liberadora de hormona de crecimiento (GRF) en este núcleo, se detectó la unión de somatostatina (McCarthy *et al.*, 1992).

Todo ello demuestra que la somatostatina actúa de manera endocrina y paracrina.

Además del papel hormonal que se le atribuyó primeramente, su amplia distribución en el sistema nervioso central y su participación en la modulación de algunos procesos, le ha valido ser considerada como un neuromodulador.

Importancia clínica y terapéutica de la somatostatina y sus análogos.

La importancia clínica de la molécula se pone de manifiesto no sólo por su actividad sobre órganos endocrinos, sino también sobre el sistema nervioso central propiamente dicho, pues se halla ligada a algunos eventos como la actividad locomotora, procesos cognoscitivos y de comportamiento (Bruns *et al.*, 1995) además de algunas patologías del humano detectadas para dicho sistema, ejemplo de ello son: el incremento de somatostatina en el ganglio basal en la enfermedad de Huntington y sus bajas concentraciones asociadas a la corteza en la enfermedad de Alzheimer (Patel, 1992), así como otras anomalías; si bien se considera que la variación en las concentraciones del péptido son más una consecuencia que la causa misma del trastorno. Es así que, en términos generales, las principales funciones que se le asignan a la somatostatina son la inhibición de la secreción de hormonas y otros productos exócrinos, de la absorción de nutrientes y de la proliferación celular.

TABLA I.- FUNCIONES ATRIBUIDAS A LA SOMATOSTATINA EN DIFERENTES SISTEMAS.

SISTEMA	FUNCIÓN
NERVIOSO CENTRAL	Hiperquinesia, rigidez, efectos autonómicos, procesos cognocitivos, comportamiento.
HIPOTÁLAMO	Inhibición de la secreción de CRH, TRH, GHRH, NE.
HIPÓFISIS	Inhibición de la secreción de ACTH, TSH y GH.
PÁNCREAS	Inhibición de la secreción de insulina, glucagon, somatostatina, enzimas y bicarbonato.
TRACTO GASTROINTESTINAL	Inhibición de la secreción de gastrina, secretina, CCK, VIP, motilina, neurotensina, ácido gástrico, pepsina, reducción del flujo sanguíneo, reducción de la motilidad, reducción de la absorción de iones y nutrientes, disminución de la proliferación de las células de la mucosa.
RIÑÓN	Inhibición de la secreción de renina, y de la absorción de agua.
SUPRARRENALES	Inhibición de la secreción de aldosterona, y de catecolaminas.
TIROIDES	Inhibición de la secreción de T ₄ , T ₃ , y calcitonina.

ACTH, hormona adrenocorticotrópica; CCK, colecistocinina; VIP, péptido vasoactivo intestinal; CRH, hormona liberadora de la corticotropina; GH, hormona de crecimiento; GHRH, hormona liberadora de la hormona de crecimiento; NE, norepinefrina; T₃, triyodotironina; T₄, tiroxina; TRH, hormona liberadora de la hormona estimulante de la tiroides; TSH, hormona estimulante de la tiroides.

Otra posibilidad reciente para esta molécula, ha sido su aplicación con el objeto de controlar la división celular desmedida de algunos tipos de cánceres. Se han realizado experimentos en los cuales se administra algún tipo de análogo de la somatostatina (fundamentalmente el denominado con nombre comercial de octreótido), a pacientes con acromegalia y los resultados reportan una mejora sustantiva en la cantidad de hormona de crecimiento en la sangre y una concentración normal de factor de crecimiento insulinoide de tipo I (IGF-I), en proporciones que son del 90% y 70% respectivamente, y se ha comprobado que en el 50% de los pacientes que sufren de esta enfermedad, el tumor se reduce de tamaño, demostrándose con ello, la capacidad del análogo como inhibidor del crecimiento celular. Desafortunadamente, el tratamiento es extremadamente costoso (cerca de los \$ 8,000 USD por año) por lo cual no todos los pacientes pueden tener acceso a dicha terapia (Lamberts *et al.*, 1996).

Este tipo de tratamiento parece ser prometedor para algunos otros tipos de cánceres además del anteriormente señalado, tales como tumores del tipo de los vipomas y glucagonomas en los islotes pancreáticos. Este análogo presenta también ciertas posibilidades terapéuticas (indicación probable) en algunas enfermedades como son : varices esofágicas, fistulas entéricas o pancreáticas, diarrea secretoria, y diarrea relacionada con el SIDA, las cuales aún se encuentran bajo protocolos de investigación (Lamberts *et al.*, 1996).

De manera lamentable, otros tipos de cánceres o enfermedades que, en teoría, podrían haber sido susceptibles de ser tratados con análogos de somatostatina, cuando el tratamiento se ha aplicado a pacientes los resultados no fueron positivos y entre estas enfermedades tenemos algunos tumores neuroendocrinos y adenocarcinomas, el sangrado gastrointestinal, y la pancreatitis causada por endoscopia retrógrada (Lamberts *et al.*, 1996).

Parte activa de la molécula.

Para la somatostatina 14 y la mayoría de los análogos elaborados, todo parece indicar que la parte activa de la molécula la constituyen los aminoácidos 7 (fenilalanina), 8 (triptófano), 9 (lisina), y 10 (treonina), en especial la posición número 9 (lisina) en experimentos con receptores mutados parece ser la parte más importante para la interacción (Epelbaum, 1992; Patel y Srikant, 1997).

Estudios acerca de la somatostatina en peces.

Al igual que en el resto de los otros grupos de vertebrados, en peces se ha demostrado que la somatostatina es el inhibidor natural de la secreción de la hormona de crecimiento, ello en especies como el pez dorado *Carassius auratus* (Marchant *et al.*, 1987), y la trucha arco iris *Oncorhynchus keta* (Luo y McKeown, 1990, 1991). También se han observado fibras inmunorreactivas a somatostatina en algunas regiones del encéfalo, el encéfalo completo y la hipófisis de varias especies de teleósteos como el pez dorado (Oliverau *et al.*, 1984; Pickavance *et al.*, 1992), *Salmo irideus*, *Salmo fario*, *Salmo salar*, *Oncorhynchus keta*, *Mugil ramada*, *Mioxocephalus octodecimspinosus*, *Anguilla anguilla* (Oliverau *et al.*, 1984), y *Apteronotus leptorhynchus* (Sas, 1991). Cabe señalar que de entre estos estudios destaca el elaborado por Pickavance *et al.*, (1992), en el que se realiza una descripción completa de elementos inmunorreactivos a la somatostatina en el cerebro de pez dorado. En ese trabajo se establece la siguiente distribución de la somatostatina en el encéfalo de *Carassius auratus* :

-Cerebro anterior :

-Telencéfalo y Diencéfalo :

Área ventralis lateralis (VI)

Núcleo enteropeduncularis (NE)

Órgano vasculosum (OV)

Área dorsalis medialis (Dm)

Área dorsalis centralis (Dc)
Área dorsalis lateralis (Dl)
Núcleo preóptico periventricularis (NPP)
Área dorsalis dorsalis (Dd)
Área ventralis posterioris (Vp)
Núcleo preóptico (NPO)
Núcleo anterior periventricularis (NAPv)
Núcleo anterior tuberis (NAT)
Núcleo lateral tuberis pars lateralis (NLTI)
Núcleo lateral tuberis pars anterioris (NLTa)
Núcleo dorsolateralis talami (NDL)
Núcleo dorsolmedialis talami (NDM)
Núcleo preglomerulosus pars lateralis (NPGl)
Núcleo diffusus toris lateralis (NDTL)
Núcleo marginal parvocelular (PM)
Núcleo habernularis (NH)
Núcleo posterior periventricularis (NPPv)
Núcleo recusus lateralis (NRL)
Núcleo difusus lobi inferioris (NDLI)
Núcleo lateral tuberis posterioris (NLTp)
Núcleo ventromedialis talami (NVM)
Núcleo posteriors talami (NTP)

-Cerebro Medio :

Tectum óptico (OTec)
Toris semicircularis (TS)
Lemniscus lateralis (LL)

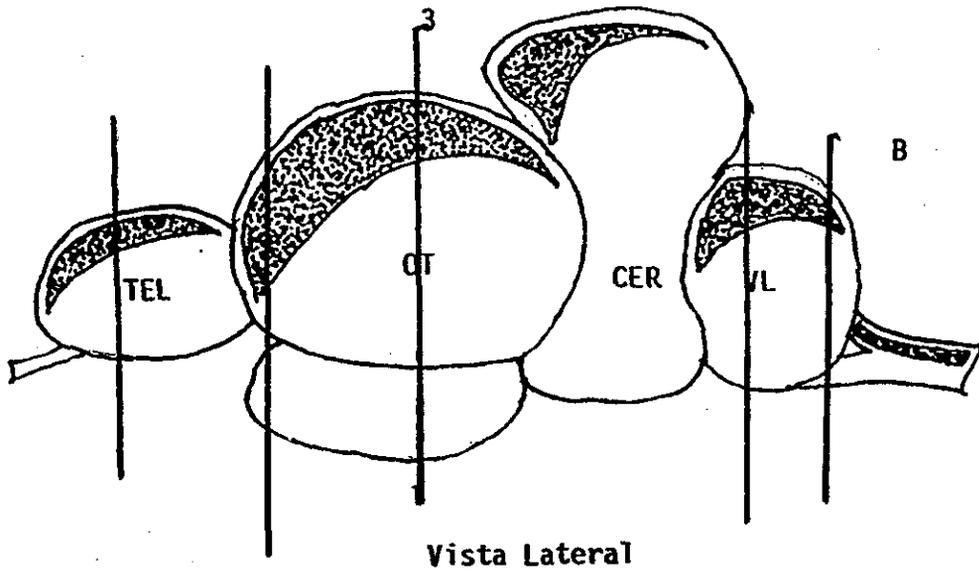
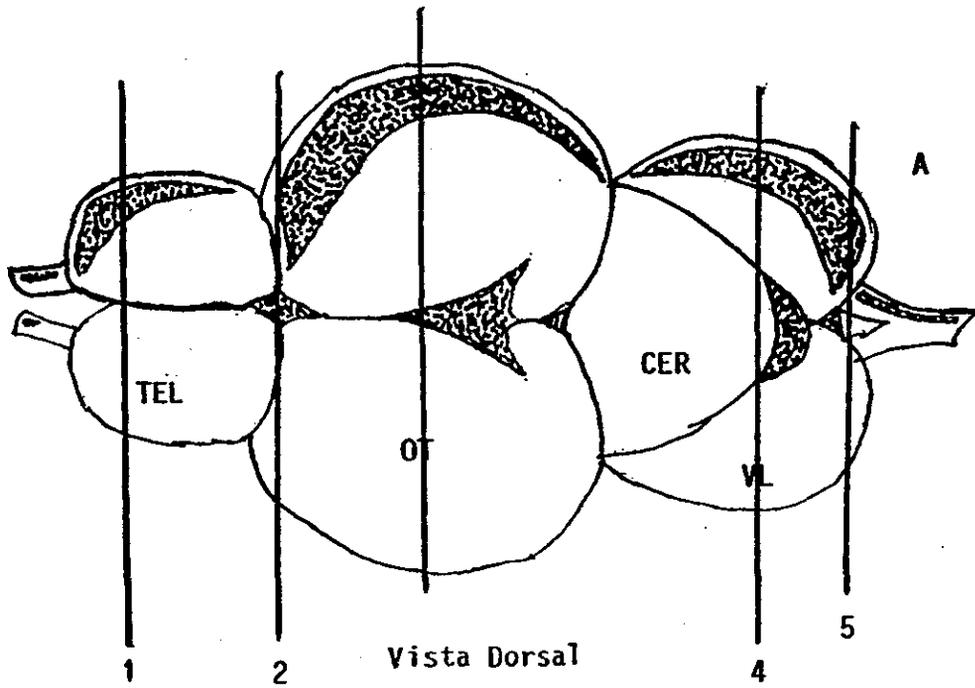
-Cerebro Posterior :

Cerebelo (C)

Núcleo gustatorio secundario	(SGN)
Núcleo reticularis superioris	(NRS)
Locus coeruleus	(LC)
Eminencia granularis	(EG)
Tracto gustatorio secundario	(ST)
Tracto trigémino	(DT)
Núcleo reticularis medialis	(NRM)
Lóbulo vago	(VL)
Núcleo reticularis lateralis	(NRI)
Lóbulo facial	(FL)
Nervio vago	(VN)
Complejo motor del vago lateral	(DMI)

Un esquema general del encéfalo del pez dorado en diferentes orientaciones y cortes transversales se muestra en las figuras 2A - 2G.

Las investigaciones anteriormente señaladas fundamentalmente reportan resultados referentes a la somatostatina 14, mientras que otros tipos de somatostatinas sólo se utilizaron en el trabajo de Merchant *et al.*, 1987, en el cual se demostró la ineficacia de la somatostatina 22 para inhibir la secreción de la hormona de crecimiento en sistemas de perfusión en hipófisis del pez dorado, y los trabajos de aislamiento de la somatostatina 22 (Andrew *et al.*, 1984) y somatostatina 25 (Plisetskaya *et al.*, 1986) mencionados anteriormente.



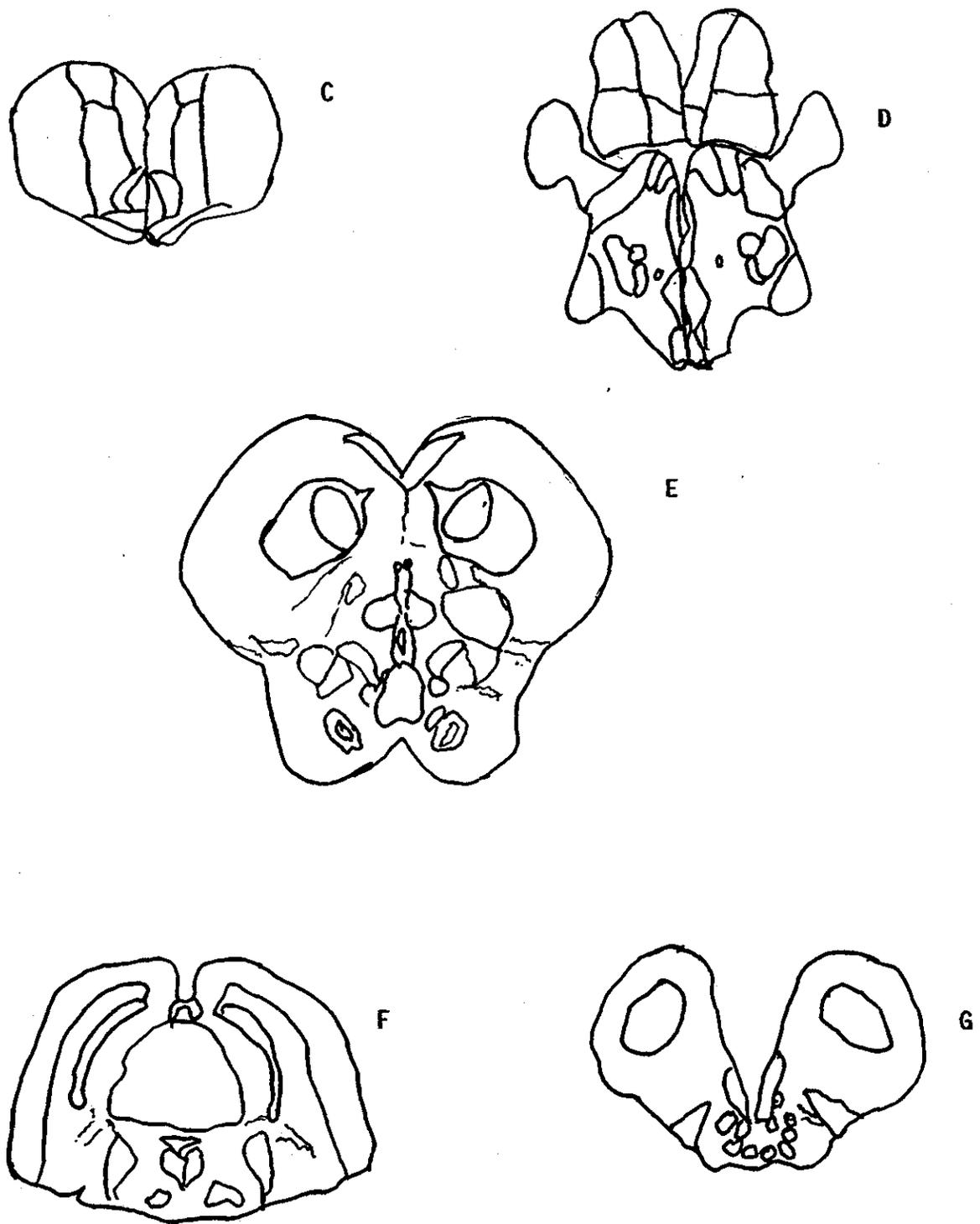


Figura 2.- Representación del encéfalo de Pez
 A) Vista dorsal, B) Vista lateral, C) Corte transversal a nivel 1
 D) Corte transversal a nivel 2, E) Corte transversal a nivel 3,
 F) Corte transversal a nivel 4, G) Corte transversal a nivel 5.

RECEPTORES A SOMATOSTATINA.

Generalidades.

El estudio de los receptores a somatostatina es importante en la comprensión de los mecanismos a través de los que actúa el péptido.

La mayoría de los estudios de los receptores a diferentes sustancias involucran el uso de moléculas (ligando) que al adherirse al receptor permitan la identificación y/o caracterización del complejo ligando-receptor. Tradicionalmente se han empleado como ligandos neurotransmisores, hormonas nativas o análogos de éstas, a las cuales se les puede incorporar una marca radioactiva, sea con emisión de radiaciones β como en el caso de moléculas marcadas con tritio, o, más frecuentemente para el caso de hormonas, con yodo radioactivo (yodo 125, ^{125}I) que emite radiaciones γ . Posteriormente la radioactividad es medida de alguna manera, como número de cuentas por minuto que se registra en algún contador de centelleo de rayos gamma, o por la magnitud de velamiento que se tiene al exponer una película fotográfica especial a las preparaciones que contienen la radioactividad, la que es posteriormente interpretada o cuantificadas a través de métodos como la densitometría.

Entre los atributos que son importantes estudiar de un receptor se encuentran: sus características bioquímicas, la vías de transducción de señales que utiliza para llevar a cabo su efecto en la célula blanco, la distribución del receptor en el órgano en que se presente, las características intrínsecas de la molécula, por mencionar sólo algunas.

Mencionaremos algunos de los aspectos relacionados con cada uno de los apartados anteriores.

Entre los aspectos que se describen en la caracterización bioquímica de un receptor están su sensibilidad a la temperatura, lo que permite distinguir bajo que temperatura se facilitan los estudios subsiguientes, pues si bien en muchas ocasiones la temperatura a la cual trabaja de manera natural el receptor, puede ser más rápida, ello cuenta con la desventaja

de no permitir al investigador el tiempo necesario para establecer procedimientos experimentales que le posibiliten la obtención de datos.

Otros factores importantes a investigar son la acción del pH y los iones, ya que ambos son capaces de alterar la afinidad del receptor por su ligando a través de varios mecanismos como pueden ser la modificación de los grupos químicos de los aminoácidos o carbohidratos que participan directamente en el reconocimiento.

La concentración dada de proteínas por unidad de volumen del tejido donador que contiene al receptor es también extremadamente importante, pues a partir de ella se establece la constante de afinidad en el equilibrio del mismo por su ligando (K_a), que se desprende de la ley de acción de masas, y la cual se define en un estado de equilibrio como la constante de formación del complejo ligando-receptor (k_1) dividida entre la constante de disociación del complejo receptor (k_2)

$$K_a = k_1 / k_2 \quad \text{ó} \quad (LR)^a / (L)^b (R)^c$$

Donde $(LR)^a$ es la concentración del complejo ligando-receptor y $(L)^b (R)^c$ representan la concentración de ligando libre y receptor libre, respectivamente (Bennet y Yamamura, 1985).

La saturabilidad es también un criterio importante en la identificación de receptores, pues es frecuente que la radioactividad o cualquier sustancia se unan a cualquier tipo de molécula, principio expresado por Bennet y Yamamura (1985) "Todo se une a todo", pero de existir una relación ligando receptor, se debe tener un límite de ligando unido de acuerdo a una proporción de receptor/ proteína/ volumen del tejido donador. La cinética de desplazamiento de acuerdo al aumento de concentraciones de hormona fría, los experimentos de especificidad del receptor respecto al ligando y la tasa de disociación del complejo ligando-receptor son algunos de los criterios importantes para establecer la presencia de receptores y sus características.

Vías de transducción de señales. - Entre los mecanismos que más interesa investigar se encuentran la vías que el receptor una vez activado por el ligando utiliza para inducir la respuesta de la células blanco, y en general, estas vías se encuentran asociadas a sistemas

de los denominados segundos mensajeros como el adenosin monofosfato cíclico (cAMP), variaciones en la concentración de calcio intracelular (Ca^{++}), metabolitos productos del ácido araquidónico (AA), por señalar sólo algunos ejemplos. El conocimiento de estos mecanismos ayuda a comprender mejor el curso de acción que sigue el ligando con la potencialidad de uso terapéutico *a posteriori*.

Distribución.- Un importante factor es el conocer la distribución de las células o regiones de los órganos en los cuales se localizan los receptores, pues con ello se posibilita la integración de la fisiología de la zona o células en cuestión. Técnicas como la autorradiografía, o en algunos casos como la inmunodetección por componentes fluorescentes o por microesferas de oro auxilian en ello.

Tradicionalmente, una vez que se han llevado a cabo investigaciones del corte de las anteriormente descritas, es usual abordar la descripción misma de la molécula receptora, o si las hubiere de los subtipos de receptores a una sustancia. Así, secuencias de aminoácidos, conformación, dominios transmembranales, extremos amino y carboxilo terminal de la molécula, la posible presencia de sustancias de otra naturaleza química (ej. carbohidratos o lípidos) asociadas a la parte proteínica, sitio de reconocimiento, sitio activo, etc., son algunas de las muchas características que se pueden investigar del receptor. Evidentemente, las técnicas de biología molecular son las que se utilizan fundamentalmente en esta parte del estudio de los receptores.

El receptor a somatostatina.- Con base en estudios de unión de radioligandos, análogos que incluyen al aminoácido tirosina en su estructura (Tyr⁰-SRIF-14, Tyr¹-SRIF-14, Tyr¹¹-SRIF-14) ya que al carecer la somatostatina 14 de este aminoácido en su forma nativa, no es posible la incorporación de yodo radioactivo (¹²⁵I), fue sugerida la existencia de un receptor en las membranas de los grupos celularesafines a somatostatina. El receptor exhibía características como la alta afinidad, habiéndose demostrado que la inclusión de tirosina o la sustitución del primer o del decimoprimer aminoácido por la tirosina no afecta de manera sustantiva las capacidades de la somatostatina (Patel y Reichlin, 1978; Epelbaum *et al.*, 1982).

Con el desarrollo de otro tipo de análogos (sustancias que simulan los efectos de un compuesto), en especial con el SMS 201-995, elaborado por los laboratorios Sandoz, dos

subtipos de receptores denominados *sstr1* y *sstr2*, fue demostrada en la corteza cerebral de la rata, ello a través de desplazamiento bifásico de ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$)-SRIF-14 por parte del SMS 201-995 en diferentes intervalos de concentración. El receptor con afinidad nanomolar (1×10^{-9}) al SMS 201-995 fue denominado *sstr1*, mientras que el receptor con afinidad micromolar (1×10^{-6}) a esta misma sustancia se nombró *sstr2* (Reubi, 1984). Posteriores observaciones con otros análogos de cadena corta, tales como el MK678 y el RC 160 confirmaron lo antes mencionado (Tran *et al.*, 1985).

Hasta fecha reciente se ha logrado desarrollar alguna sustancia que rivaliza con la acción de la somatostatina, dichas sustancias son conocidas como antagonistas.

SUBTIPOS DE RECEPTORES A SOMATOSTATINA.

Durante los pasados ocho años se han detectado cinco subtipos de receptores a somatostatina en los mamíferos. Todos ellos presentan siete dominios transmembranales, el extremo amino terminal en el espacio extracelular, mientras que su extremo carboxilo terminal se presenta en el interior de la célula (Figura 3). Si bien todos los subtipos del receptor pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G, los cinco subtipos se han agrupado en dos subfamilias, una que asocia a los receptores *sstr1* y *sstr4*, con 71% de similitud entre ellos, mientras que en la otra subfamilia se presentan los receptores *sstr2*, *sstr3* y *sstr5*, con una similitud que va entre el 65% al 75% (Figura 4 y Tabla II). Esta agrupación se da con base en similitudes estructurales y propiedades de unión a los ligandos de los diferentes subtipos de receptores (Bruns *et al.*, 1995; Viollet *et al.*, 1995). Secuencias de aminoácidos son particularmente altas en los dominios 2, 3, 5 y 7, llegando hasta un porcentaje de similitud de 90% para los subtipos *sstr2/sstr3/sstr5* y de alrededor de 80% por los subtipos *sstr1/sstr4* (Hoyer *et al.*, 1994).

El número de aminoácidos (aa) registrado para cada uno de los receptores es de 391 para *sstr1* (Figura 3a), 369 para *sstr2* (Figura 3b), 428 para *sstr3* (Figura 3d), 384 para *sstr4* (Figura 3e) y 363 para *sstr5* (Figura 3f), en organismos como la rata, presentándose ligeras variaciones en el caso de los receptores para el humano. Se encuentra también en el ratón, un proceso de corte y empalme alternativo el cual, genera receptores *sstr2A* y

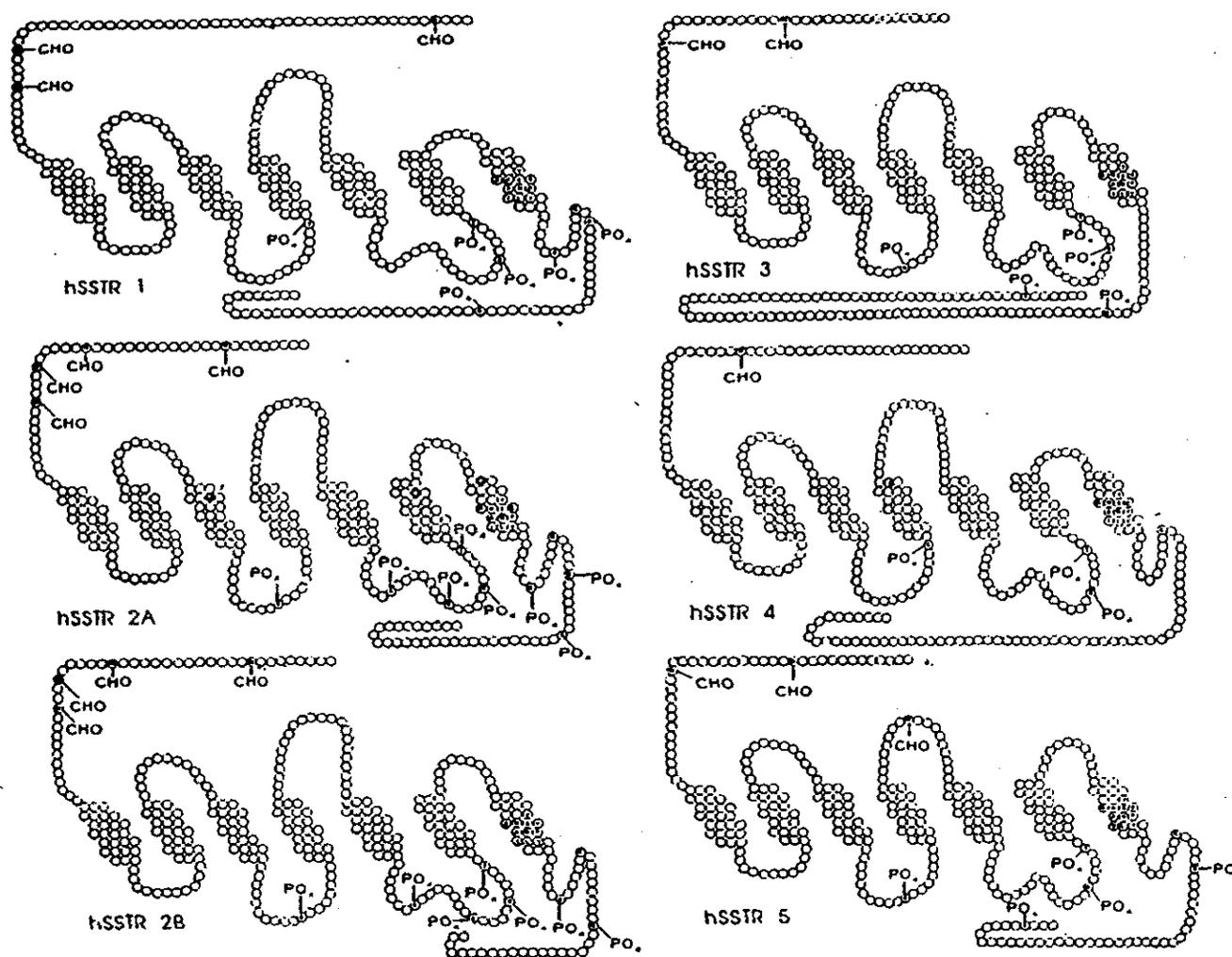


Figura 3.-Representación esquemática de los subtipos 1-5 del receptor a somatostatina en humano. a) subtipo 1 (hsstr1); b) subtipo 2A (hsstr2A); c) subtipo 2B (hsstr2B); d) subtipo 3 (hsstr3); e) subtipo 4 (hsstr4); f) subtipo 5 (hsstr5). CHO- representa los sitios potenciales de unión a carbohidratos (unión tipo -N). PO₄- son sitios de fosforilación potencial. La secuencia YANSCAN PI/VLY corresponde a una secuencia altamente conservada en la región transmembranal 7, que está presente en todos los miembros de esta familia de receptores.

TABLA II.- SIMILITUD EN PORCENTAJE ENTRE SUBTIPOS DE RECEPTORES A SOMATOSTATINA EN HUMANOS.

Receptor	Receptor				
	sstr1	sstr2	sstr3	sstr4	sstr5
sstr1	---	59%	62%	71%	55%
sstr2		---	65%	57%	65%
sstr3			---	56%	75%
sstr4				---	56%
sstr5					---

(Tomado de Viollet *et al.*, 1995)

TABLA III.- UBICACIÓN CROMOSÓMICA DE LOS GENES QUE CODIFICAN PARA CADA UNO DE LOS SUBTIPOS DE LOS RECEPTORES A SOMATOSTATINA.

SUBTIPO DE RECEPTOR	UBICACIÓN CROMOSÓMICA
sstr1	14q13
sstr2	17q24
sstr3	22q13.1
sstr4	20p11.2
sstr5	16

(Tomado de Viollet *et al.*, 1995)

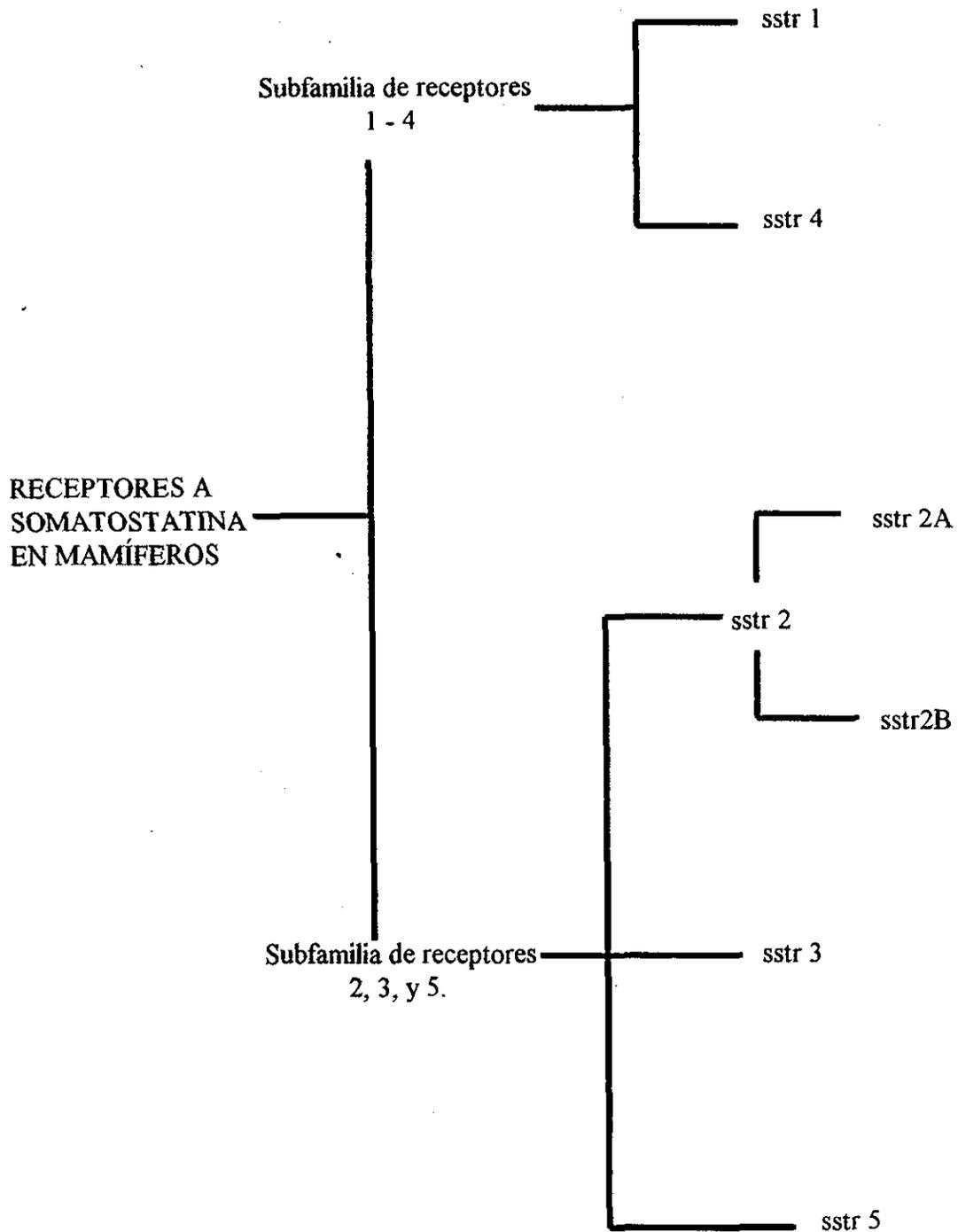


Figura 4.- Subfamilias de receptores a somatostatina. (fuente Bruns *et al.*, 1995)

sstr2B que representan a formas sin corte y con corte y empalme respectivamente del receptor en cuestión, codificando para proteínas de 369 y 346 aa de longitud (Figura 3c), representando los 23 aa adicionales, un agrandamiento de la proteína en su extremo carboxilo terminal (Bell *et al.*, 1995).

En humanos la localización de los genes que codifican para cada uno de los subtipos es la siguiente : sstr 1, 14q13; sstr 2, 17q24; sstr 3, 22q13.1; sstr 4, 20p11.2 y sstr 5 en el cromosoma 16 (Tabla III). Todos los genes para los receptores a somatostatina carecen de intrones en la región que codifica para la proteína (Viollet *et al.*, 1995).

Aminoácidos de naturaleza ácida, en especial el ácido aspártico, pero no el ácido glutámico, en posiciones como la 122 para el subtipo 2 y 124 para el subtipo 3 de receptores, parecen jugar un papel determinante en el sitio activo, y al parecer intervienen en el reconocimiento o interacción con la lisina de la somatostatina 14, pues mutaciones puntuales de estos aminoácidos disminuyen la afinidad de estos subtipos de receptor por la somatostatina 14 (Strnad y Hadcock, 1995; Nehring *et al.*, 1995). Una situación similar se da en el caso del subtipo de receptor 5 el cual es el único que tiene mayor afinidad por la somatostatina 28 sobre la somatostatina 14. Cuando el receptor es clonado y expresado en células ováricas de hámster, un cambio del aminoácido 265, que es normalmente fenilalanina por tirosina, aumenta la afinidad a la somatostatina 14 sobre la somatostatina 28 (Ozenberger y Hadcock, 1995).

SISTEMAS DE TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES USADOS POR LA SOMATOSTATINA.

Se han descrito también cinco mecanismos por los cuales estos receptores ejercen su efecto en la célula a la cual se unen (Fig. 5). Estos mecanismos son : receptores que acoplados a proteínas G inhibitoras (Gi) afectan el sistema de adenilil ciclasa disminuyendo con ello la cantidad de cAMP en el medio intracelular, con lo cual, sistemas como los elementos de respuesta a cAMP (CRE) o la fracción reguladora de enzimas como la proteincinasa A (PKA) resultan afectados. Otro mecanismo descrito es, que también a través de proteínas Gi, los receptores aumentan el ingreso de iones potasio

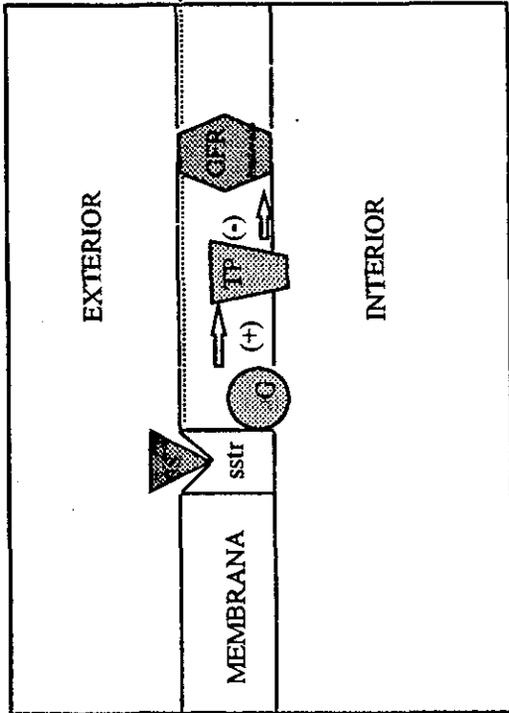
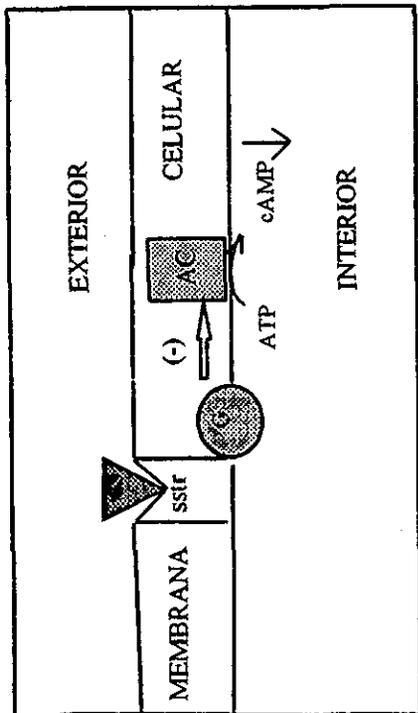
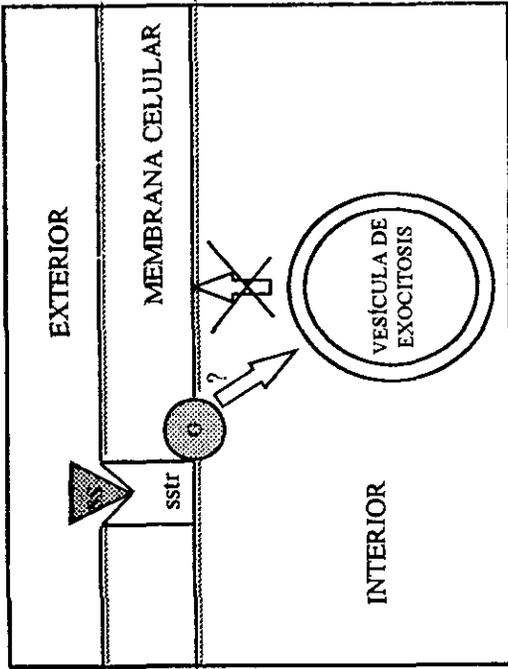
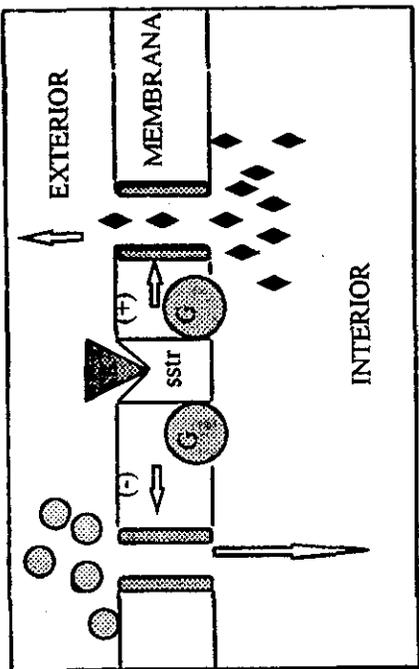


Figura 5. - Representación esquemática de los mecanismo de transducción de señales y amplificación que se postula utilizan los receptores a somatostatina en las diferentes células de mamífero. SS, somatostatina; sstr, receptor a somatostatina; G, proteína G inhibidora; AC, adenilil ciclasa; ATP, adenosin trifosfato; cAMP, adenosin monofosfato cíclico; TP, tirosinofosfata; GFR, receptor a factor de crecimiento; (-) efecto inhibitorio; (+) efecto estimulatorio. ● iones calcio; ◆ iones potasio.

(K⁺), y de una manera similar se postula la inhibición de canales de calcio, con lo que disminuyen los niveles de este ión en el interior de la célula. Un efecto directo de esta disminución en los niveles de calcio intracelular es la inhibición de la secreción de hormonas (ejemplo de ello podrían ser la inhibición de la secreción de hormona de crecimiento). Otros receptores se han descrito como acoplados a vesículas para exocitosis y receptores asociados a tirosín fosfatasa, si bien no están aún especificados las rutas que se siguen para tales efectos (Epelbaum, 1992).

EXPRESIÓN DE LOS SUBTIPOS DE RECEPTOR.

La adenohipófisis muestra la expresión de mRNA de los cinco subtipos de receptores en el mismo linaje de células. Así, células tirotropas, gonadotropas secretoras de FSH o de LH, adenocorticotrópicas, lactotropas y somatotropas, expresan al mismo tiempo diferentes proporciones de todos los subtipos de receptores (O'Carroll y Krempels, 1995). Queda por investigar cual es el papel funcional de este tipo de expresión múltiple, aunque se sugiere que dicho patrón de expresión puede ser utilizado por la célula para regular distintos procesos a través de subtipos específicos de receptores (Bell *et al.*, 1995; Bruns *et al.*, 1995; O'Carroll y Krempels, 1995).

A nivel histórico, entre los principales trabajos sobre receptores a somatostatina están : la caracterización del receptor en membranas extraídas del encéfalo de la rata (Patel y Reichling, 1978; Srikant y Patel, 1981; Epelbaum, *et al.*, 1982; Leroux, *et al.*, 1985; Sato, *et al.*, 1989; Epelbaum *et al.*, 1989; Raynor y Reisent, 1989), distribución de los receptores a través del cerebro en distintas especies (Bennet-Clark *et al.*, 1980, Leroux y Pelletier, 1984; Tran *et al.*, 1984; Reubi, 1984, Gulya *et al.*, 1985; Reubi y Maurer, 1985; Uhl *et al.*, 1985; Leroux *et al.*, 1985; Pelletier *et al.*, 1986; Epelbaum *et al.*, 1989), caracterización de subtipos de receptores a somatostatina (Bruns *et al.*, 1995) y biología molecular de los receptores a somatostatina (Bell *et al.*, 1995).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Es conveniente hacer hincapié que sólo recientemente se ha realizado un mapa de la distribución de la somatostatina en todo el encéfalo de algún pez, (Pickavance *et al.*, 1992). Es importante determinar las características y si la presencia del receptor es similar a la reportada con respecto al péptido. Ello nos posibilitará a futuro, entender el complejo juego de interacciones que se dan en el encéfalo del pez para realizar algunas de sus funciones.

Hasta el momento no existen reportes disponibles acerca de receptores a somatostatina-14 en peces.

OBJETIVOS

- Caracterizar cinéticamente el receptor somatostatina del encéfalo de pez dorado (*Carassius auratus*).
- Establecer la distribución de receptores a somatostatina 14 en el encéfalo del pez dorado (*Carassius auratus*).

METODOLOGÍA

Los experimentos para el presente trabajo se realizaron en dos sitios.

a) Para la caracterización cinética del receptor a somatostatina los experimentos se llevaron a cabo en el Laboratorio del Dr. Richard E. Peter, en la Facultad de Ciencias de la Universidad de Alberta, Edmonton, Canada.

b) El estudio de la distribución de receptores a somatostatina en el encéfalo del pez dorado *Carassius auratus* se realizaron en los laboratorios de Histología y Farmacología de la ENEP Iztacala UNAM y el laboratorio del Dr. Jesús Calderón Tinoco y de la Dra. Martha Romano del Cinvestav Unidad Zacatenco

Animales usados para el experimento.

Para la caracterización del receptor, machos y hembras de pez dorado (*Carassius auratus*) en sus variedades común o cometa, fueron compradas a Grassyforks Fishieries (Martinville, IN) u Ozark Fishieries Inc. (MO). Los peces fueron mantenidos en acuarios de 1800 litros de capacidad a $17^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ con aereación continua, bajo condiciones simuladas de fotoperíodo de Edmonton, Canada (rangos de 13-11 a 18-6 horas de luz-oscuridad respectivamente, de acuerdo a los meses de primavera-verano).

Para los experimentos de distribución del receptor en el encéfalo de peces dorado, los especímenes fueron comprados a piscifactorias locales y fueron mantenidos en tanques de aproximadamente 1200 litros de capacidad, a una temperatura constante de $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ y un fotoperíodo artificial (13-11, luz-oscuridad) correspondiente al fotoperíodo natural de la ciudad de México. Ambos grupos de peces fueron alimentados diariamente con alimento comercial balanceado. Los organismos fueron mantenidos así por al menos 2 semanas previas al experimento.

Procedimientos experimentales

Para los experimentos de caracterización cinética del receptor a somatostatina se utilizó el análogo ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$)-SS-14 comprado a Amersham INC. (Londres) con una actividad específica de 2000 Ci / mM.

La metodología aplicada se basó en la descrita por Habibi *et al.*, (1987) con ligeras modificaciones.

Se anestesiaron varios ejemplares de *Carassius auratus* por medio de inmersión en agua con tricaina metanosulfonato (MS 222, Syndel Lab., Canada) a una concentración de 0.05%. Cuando cesó el movimiento opercular, los peces fueron sacrificados por medio de un corte de la médula espinal. Se recolectaron los encéfalos de machos y hembras de pez dorado y se lavaron en amortiguador Tris (50 mM) a un pH 7.2, con adición de 10 mM de cloruro de calcio, 0.5% (p:v) de albúmina sérica de bovino (BSA) y bacitracina. Los cerebros fueron homogeneizados con un vástago de teflón y posteriormente centrifugados a 600 g por cinco minutos a 4°C. El sobrenadante fue recuperado y centrifugado nuevamente a 16000 g por 35 minutos a 4°C. La pastilla resultante fue suavemente resuspendida en el mismo amortiguador. Se tomaron alícuotas de la suspensión para la cuantificación de proteínas por el método de Bradford (Bradford, 1976). Se usaron preparaciones frescas de membranas en todos los experimentos.

Caracterización cinética del receptor a somatostatina.

Se colocaron 100 μl de suspensión de membranas en tubos de microfuga a los cuales se les agregó 150 μl de rastreador ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$)-SS-14. Después de transcurrido el tiempo de incubación, la mezcla fue centrifugada a 16000g durante 5 minutos, seguidas de la aspiración del sobrenadante con el objeto de detener la reacción. Las pastillas intactas fueron lavadas en dos ocasiones con 500 μl del amortiguador, y las bases de los tubos que

contenían la pastilla, fueron cortadas y transferidas a tubos de borosilicato donde se midió la radioactividad que contenían por medio de un contador de rayos gamma (ICN con 75% de eficiencia).

Los primeros experimentos que se realizaron fueron para determinar la influencia de la temperatura sobre la unión del ligando receptor, para lo cual se procedió a incubar la mezcla a 22°C y 4°C con el propósito de determinar la temperatura óptima de incubación, la cual sería utilizada en experimentos posteriores.

En experimentos de saturación, se demuestra que dada una concentración total de proteínas en el medio de incubación, sólo una pequeña proporción corresponde a los receptores del ligando de interés, por lo que, se tiene que alcanzar una saturación del sistema y, no importando que la concentración de ligando continúe aumentándose, la cantidad de ligando adherido al receptor debe permanecer constante. En esta clase de experimentos, se incubaron membranas de encéfalo con concentraciones crecientes de (¹²⁵I-Tyr¹¹)-SRIF-14.

Para la definición de la constante de afinidad, fue necesario incubar a las membranas con diversas concentraciones crecientes de SRIF-14, a una concentración fija de (¹²⁵I-Tyr¹¹)-SRIF-14, con la idea de que el desplazamiento de radioligando sea gradual por parte de la somatostatina 14. Estos experimentos se realizaron incubando membranas con diferentes concentraciones (1×10^{-12} M a 1×10^{-5} M) de SRIF-14.

Dado que el complejo entre el receptor y su ligando tiene que poseer un cierto grado de estabilidad, el cual aumenta en relación con la afinidad, la disociación del complejo hormona-receptor no debe presentarse de inmediato, sino que el complejo tiene que permanecer estable por algún tiempo. En los experimentos de disociación, las membranas fueron incubadas con aproximadamente 40,000 cpm de (¹²⁵I-Tyr¹¹)-SRIF-14 por una hora, después de lo cual se les agregó 1×10^{-6} M de SRIF-14 al amortiguador de incubación y la reacción fue detenida a diferentes tiempos.

Debido a la existencia de otras formas de somatostatina se realizaron experimentos de competencia entre ellas; así, se incubaron membranas de encéfalo con radioligando (¹²⁵I-Tyr¹¹)-SRIF-14 en presencia de concentraciones crecientes (1×10^{-12} M a 1×10^{-5} M) del

análogo (Tyr¹¹)-SRIF-14, SRIF-14, SRIF-25 y SRIF-28, con el objeto de conocer si el receptor tenía una mayor afinidad por alguna de las sustancias mencionadas.

Una de las más importantes características de un receptor es demostrar el poseer especificidad a un ligando en particular. Es por ello que experimentos de especificidad fueron realizados incubando membranas en presencia del radioligando (¹²⁵I-Tyr¹¹)-SRIF-14 y de 1×10^{-9} M ó 1×10^{-6} M de sustancias sin ningún tipo de relación estructural con la somatostatina 14. Estas moléculas fueron : Sustancia P (SP), Colecistocinina 8 sulfato (CCK-8), péptido vasoactivo intestinal (VIP) y metionina-encefalina (met-enc), todas ellas, presente en el encéfalo de pez dorado y en el resto de los vertebrados.

Se realizaron incubaciones paralelas en cada uno de los experimentos para la determinación de unión no específica.

En todos los experimentos, la unión específica fue calculada como la diferencia de entre la unión total y la unión no específica.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado y en cada uno de los experimentos se contó con tres réplicas, excepto en las curvas de desplazamiento de las cuales se realizaron 6 experimentos.

Los análisis de los datos fueron realizados por medio del programa LIGAND para análisis Scatchard y del programa ALLFIT (regresión no lineal de mínimos cuadrados) para el análisis de curvas y la determinación de ED₅₀. (50% de dosis efectiva).

Las gráficas fueron realizadas con el programa Cricket graph (Comp. Ass 1991) y los datos ajustados en forma polinomial por dicho programa.

Un diagrama que muestra la metodología general seguida en estos experimentos se muestra en la Figura 6.

Distribución del receptor en el encéfalo del pez dorado.

Para este objetivo la hormona fue marcada en el laboratorio.

La yodación del análogo (Tyr¹¹)-SS-14 se realizó de acuerdo a la metodología descrita por Merchant T. (1987).

A 5 µg del análogo disuelto en 10 µl de ácido clorhídrico 0.01N se le agregó 1 mCi de yodo 125 disuelto en 50 µl de amortiguador de fosfatos 0.5 M (pH 7.4), y

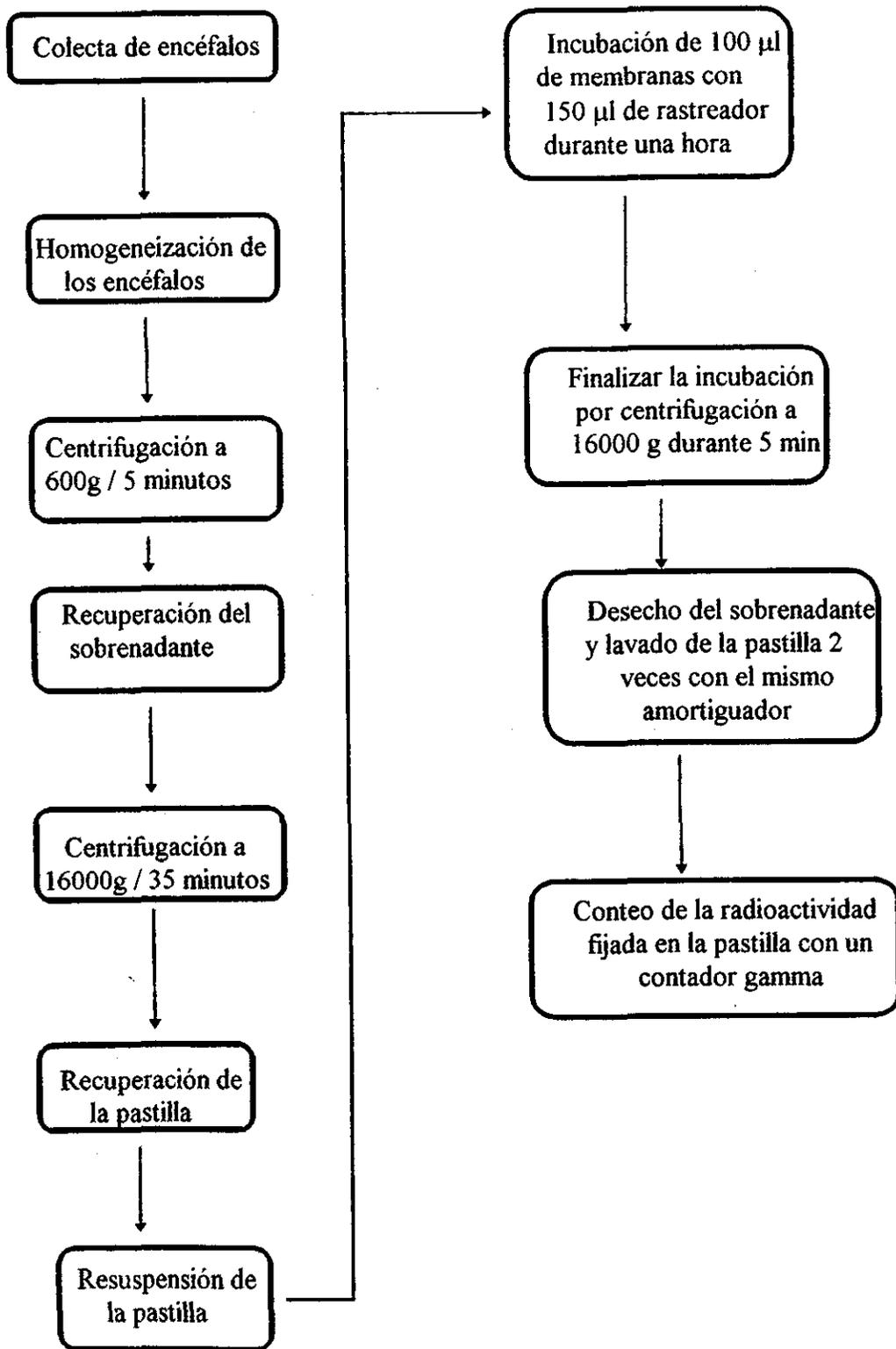


Figura 6.- Diagrama que ilustra la metodología seguida en los experimentos para la caracterización cinética del receptor de somatostatina.

posteriormente 10 µg de cloramina T diluida en 10 µl de agua bidestilada y desionizada. La mezcla se incubó por 30 segundos con agitación suave y la reacción se detuvo por dilución al adicionar 500 µl de albúmina sérica de bovino (BSA) al 10 % disuelta en amortiguador de fosfatos 0.05 M (pH 7.4). El conjunto de la solución fue transferido a una columna de 26 cm de longitud por 1 cm de diámetro que contenía Sephadex G-25 fino, y la columna se eluyó con ácido acético 0.1N con 0.2% de BSA.

Tres picos radioactivos se observan durante el proceso cromatográfico, de los cuales el primero corresponde a BSA que incorpora marca, el segundo es yodo inorgánico y en el tercer pico se concentra la somatostatina marcada (Figura 7).

Para la determinación de la distribución de receptores a SS-14 se realizó la siguiente metodología: Ejemplares de *Carassius auratus* fueron anestesiados por inmersión en agua que contenía MS 222 (Sigma Chem. MO) a una concentración de 0.05%. Cuando cesó el movimiento opercular, los peces fueron sacrificados por medio de un corte de la médula espinal. Los encéfalos de pez dorado fueron disecados e incluidos en Tissue-tek (Miles INC) a -20°C, permaneciendo a esta temperatura hasta el momento del corte. La obtención de los encéfalos no duró más de dos minutos. Los cerebros se cortaron por medio de un microtomo de congelación IEC y se adhirieron a portaobjetos previamente vestidos con gelatina-cromo. Los cortes fueron seriados, de 16 µm de grosor de acuerdo a las metodologías reportadas por Peter R.E. y su grupo (Himick y Peter, 1994) para el estudio de otros neuropéptidos. Los cortes fueron mantenidos a 4°C por una noche y posteriormente desecados durante 30 minutos. Los cortes fueron sometidos a una preincubación de 10 minutos en amortiguador Tris (10 mM) a pH 7.2 al que se adicionó albúmina sérica y bacitracina. La incubación se llevó a cabo en el mismo amortiguador suplementado con [¹²⁵I-Tyr¹¹]-SS-14 (actividad específica 1000 Ci/mM) alrededor de 15000 cpm. Cortes adyacentes fueron sometidos a la misma mezcla de incubación más una concentración 1 x10⁻⁶ M de SS-14. La incubación fue de una hora a temperatura ambiente. Después de ese tiempo se decantó la solución de incubación y se practicaron tres lavados, dos de ellos en el mismo amortiguador y el último en agua bidestilada y desionizada. Los cortes se secaron toda la noche a 4°C y posteriormente se utilizaron para ser expuestos a película hyper β-max de Amersham por 8-10 días. Las películas fueron reveladas por

Yodación de (Tyr11)-SRIF-14.

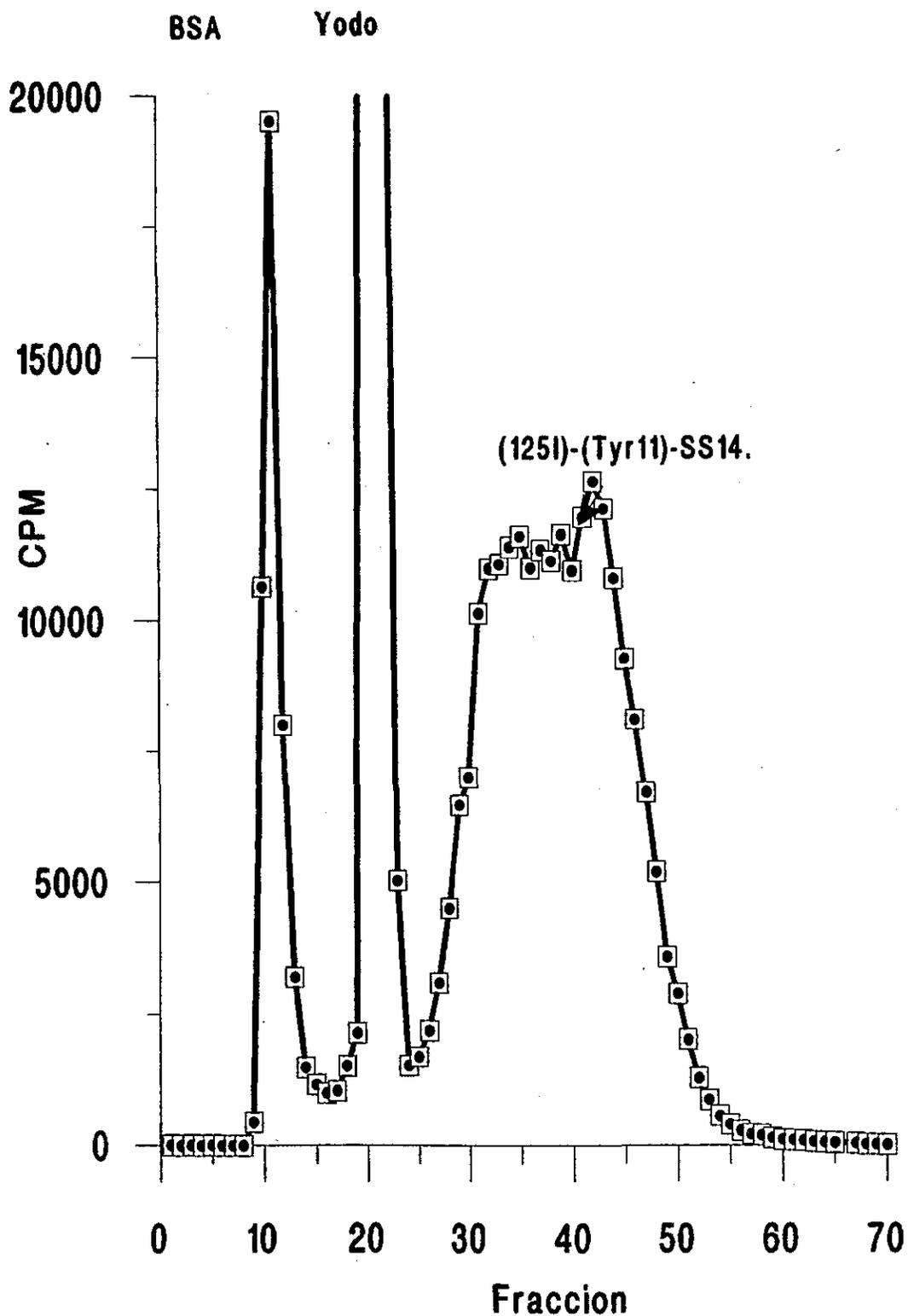


Figura 7.- Perfil de yodación de (11Tyr)-SRIF-14. El primer pico corresponde a BSA marcada. El segundo pico es yodo inorgánico. El último pico es el análogo marcado.

medio de revelador D-19 o GBX de Kodak y fijadas con fijador rápido. Los cortes se tiñeron con cresil violeta y las imágenes obtenidas en la autorradiografía se compararon con las correspondientes de los cortes.

Un diagrama acerca de estos experimentos se ilustra en la Figura 8.

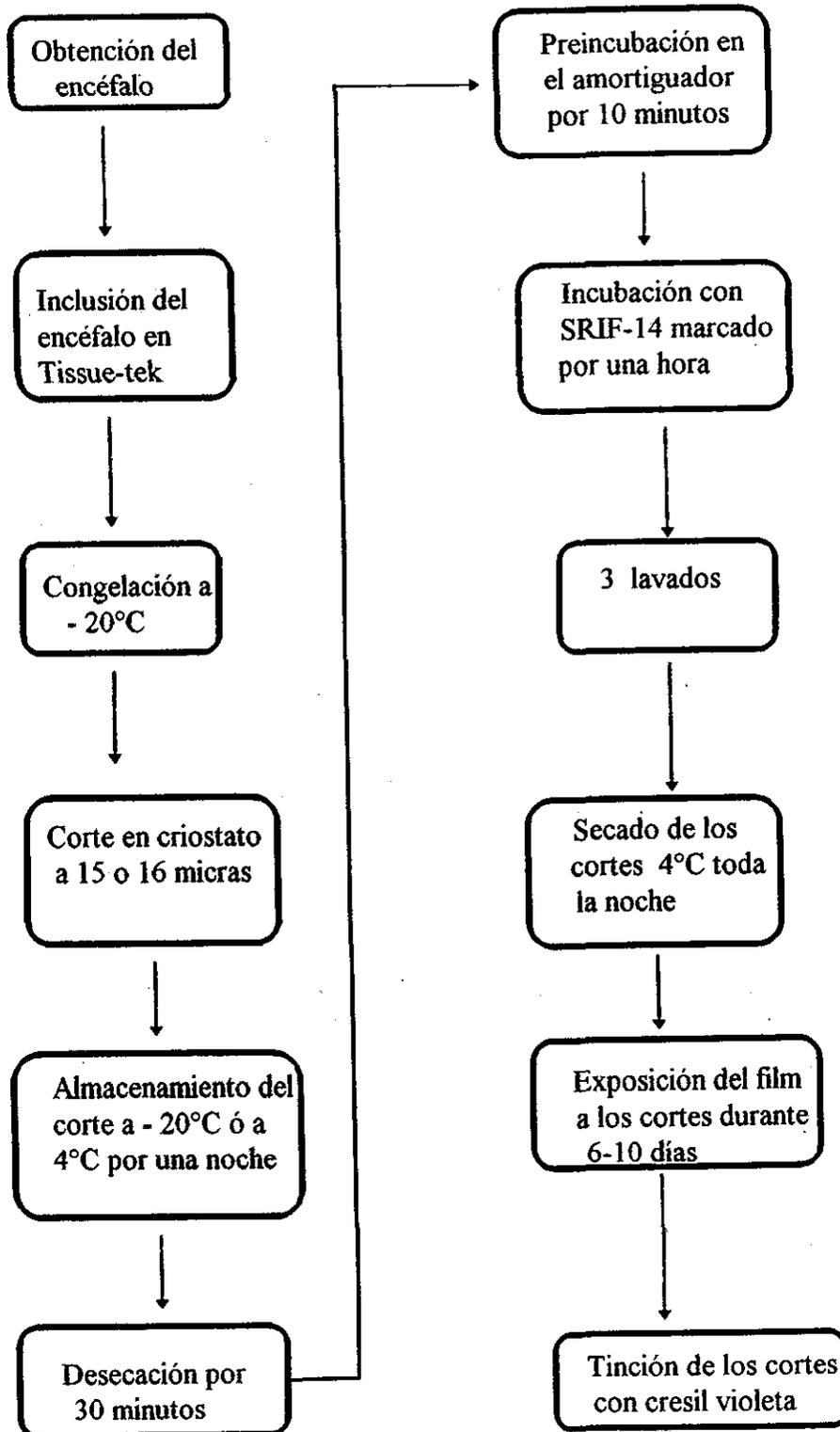


Figura 8.- Diagrama que ilustra la metodología seguida para la determinación de la distribución de los receptores a somatostatina 14 en el encéfalo del pez dorado.

RESULTADOS.

Caracterización cinética del receptor

La dependencia del tiempo y la temperatura fue evidente en la unión de ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$)-SRIF-14 durante la incubación en preparaciones de membranas de encéfalo a 4°C y 22°C, para un período total de 120 y 100 minutos respectivamente (Figura 9). Estos experimentos fueron realizados durante los meses de abril y mayo. El máximo de unión específica fue alcanzado a los 60 minutos de incubación (6.0 %) a 22°C (Figura 10), y tanto la unión total (UT) como la unión no específica (UNE) fueron estables por los siguientes 60 minutos, resultado una estabilidad en la unión específica (UE).

Todos los experimentos subsiguientes fueron realizados a temperatura ambiente (22°C) y 60 minutos de incubación, ya que el decremento de la temperatura a 4°C reduce significativamente tanto la unión total como la unión no-específica.

El receptor a somatostatina 14 es altamente susceptible a cambios de pH presentando una unión específica mayor a pH fisiológico (7.2) que incluso a rango de pH muy cercanos como el de 7.5 ó 7.0 (Figura 11).

En los experimentos en los cuales se incubaron membranas de encéfalo con concentraciones crecientes de ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$)-SRIF-14 (de 1 a 160 pM) en presencia o ausencia de 1×10^{-6} M de SRIF-14, se encontró un saturabilidad de la unión a una concentración de 63 pM/l (Figura 12). La K_a fue determinada en $1.3 \pm 0.12 \times 10^{-10}$ M. Estos experimentos fueron realizados en los meses de junio y julio. Las curvas de saturación fueron procesadas con el programa ALLFIT para mínimos cuadrados y la ED_{50} fue calculada en $1.42 \pm 0.26 \times 10^{-10}$ M.

La adición de SRIF-14 a concentraciones tan grandes como 1×10^{-6} M ó 1×10^{-5} M, resultaron en un desplazamiento del 55% de la marca de ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$)-SRIF-14. Dichas curvas de desplazamiento se muestran en la Figura 13.

Por medio del programa LIGAND para análisis de Scatchard (Munson y Rodbard 1980) cada uno de los seis experimentos realizados fue analizado con los modelos para un

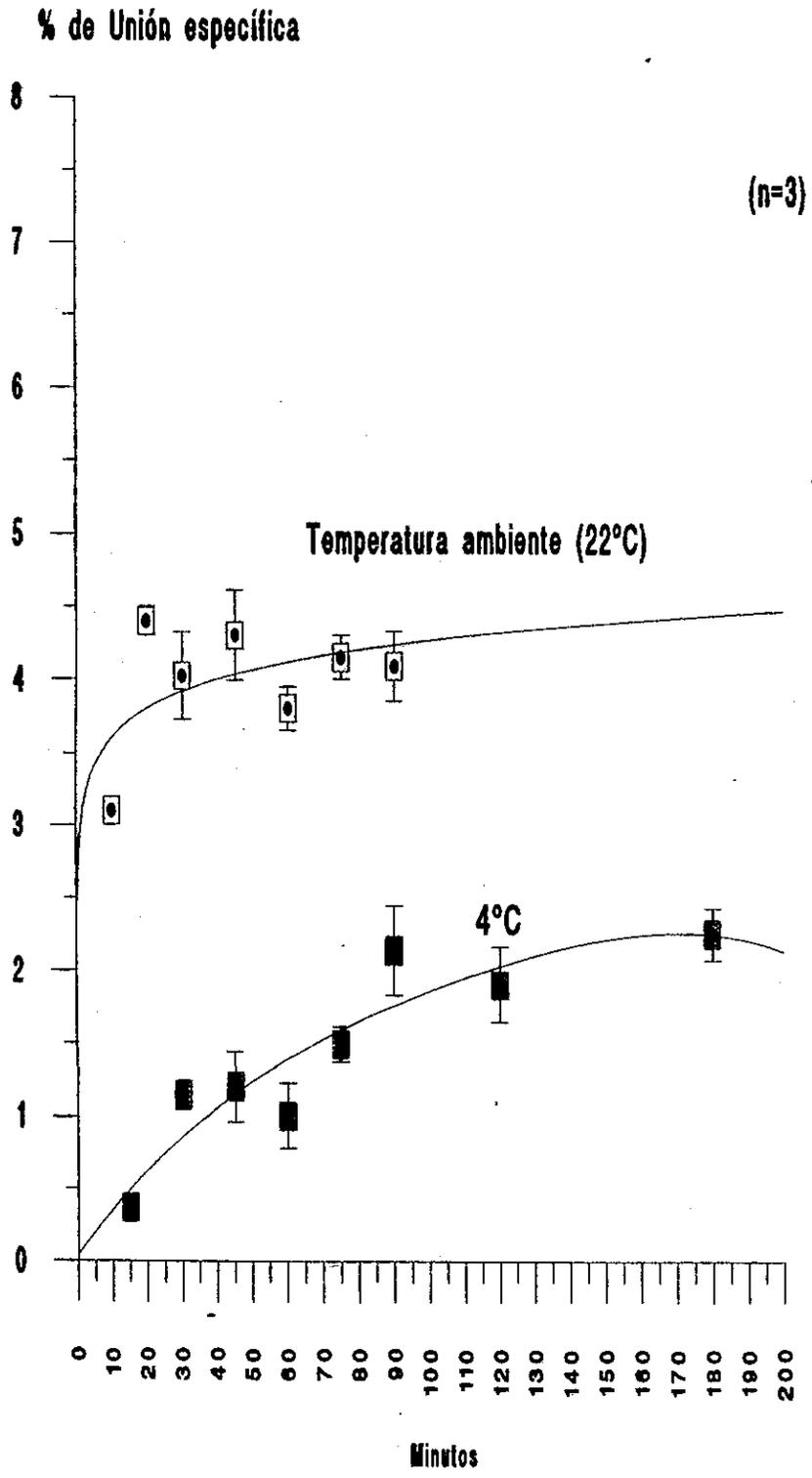


Figura 9.- Efecto de la temperatura sobre la unión específica. 100 microlitros de membranas fueron incubados paralelamente con el rastreador durante diferentes tiempos a las temperaturas señaladas, la reacción fue detenida y la unión específica calculada.

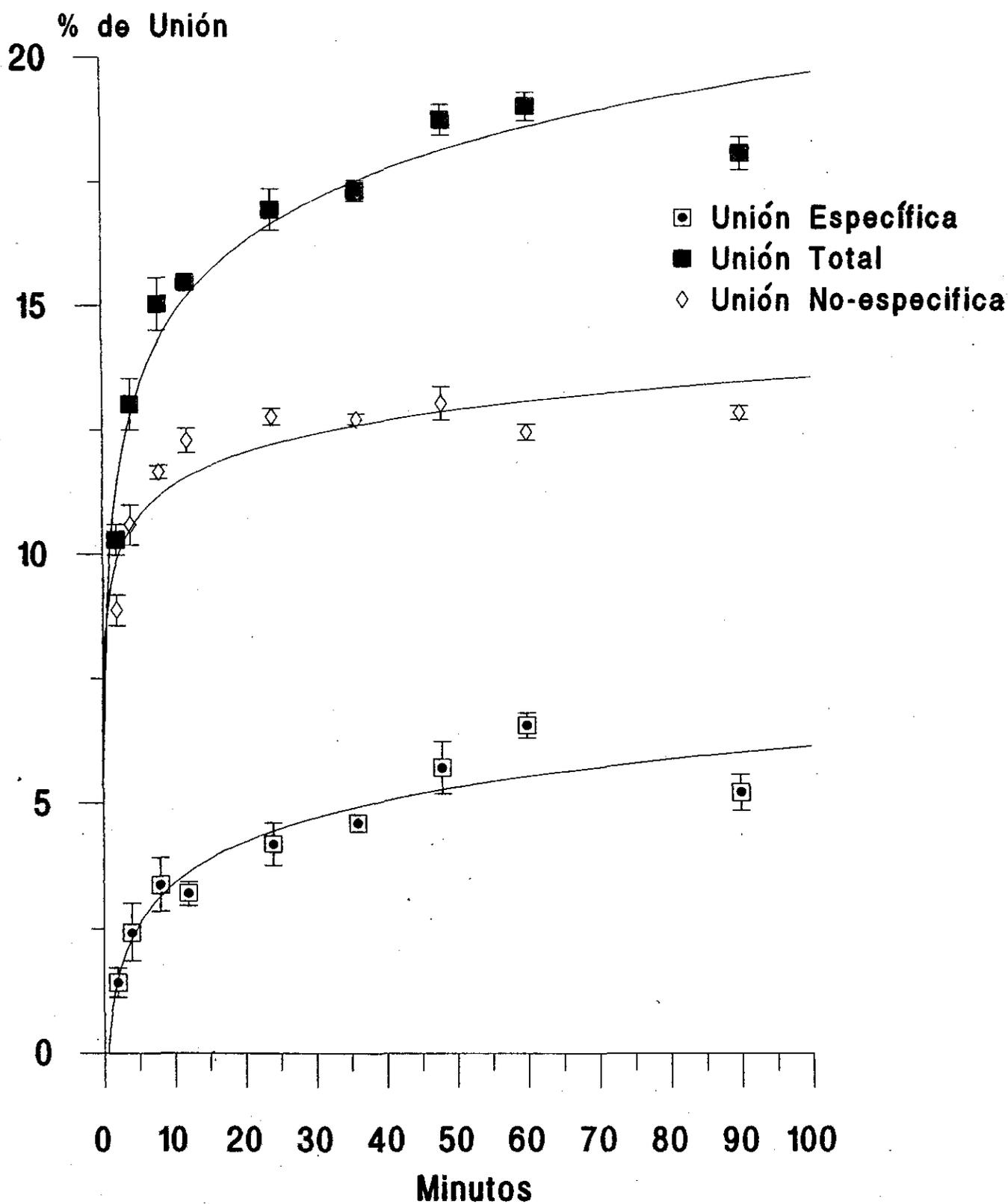


Figura 10.- Efecto del tiempo en la unión de (125I-Tyr-11)-SRIF-14 a los receptores (n=3). El experimento se realizó a temperatura ambiente

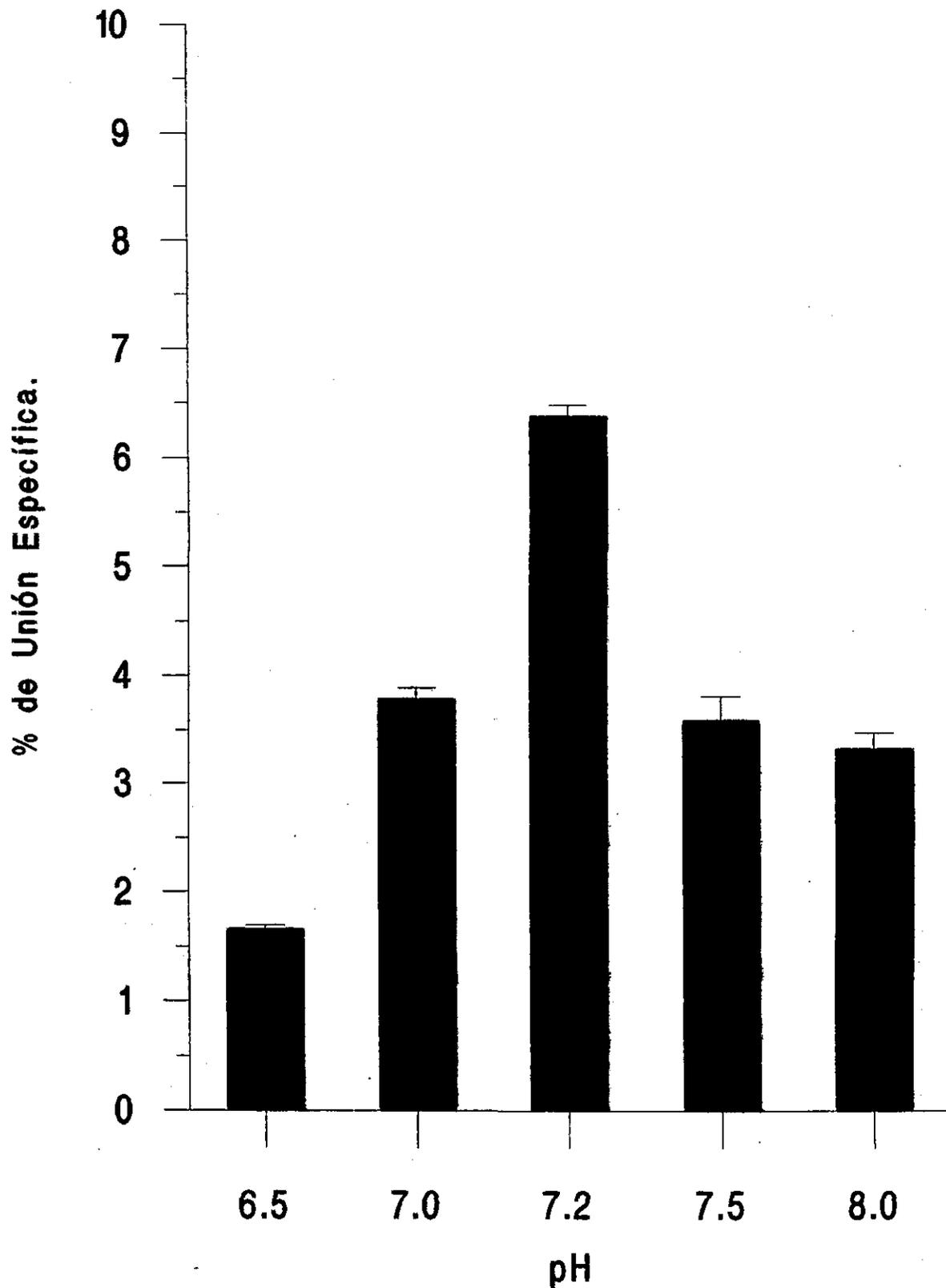


Figura 11.- Efecto del pH sobre la unión específica de (125I-Tyr11)-SRIF-14 a los receptores. (n=3).

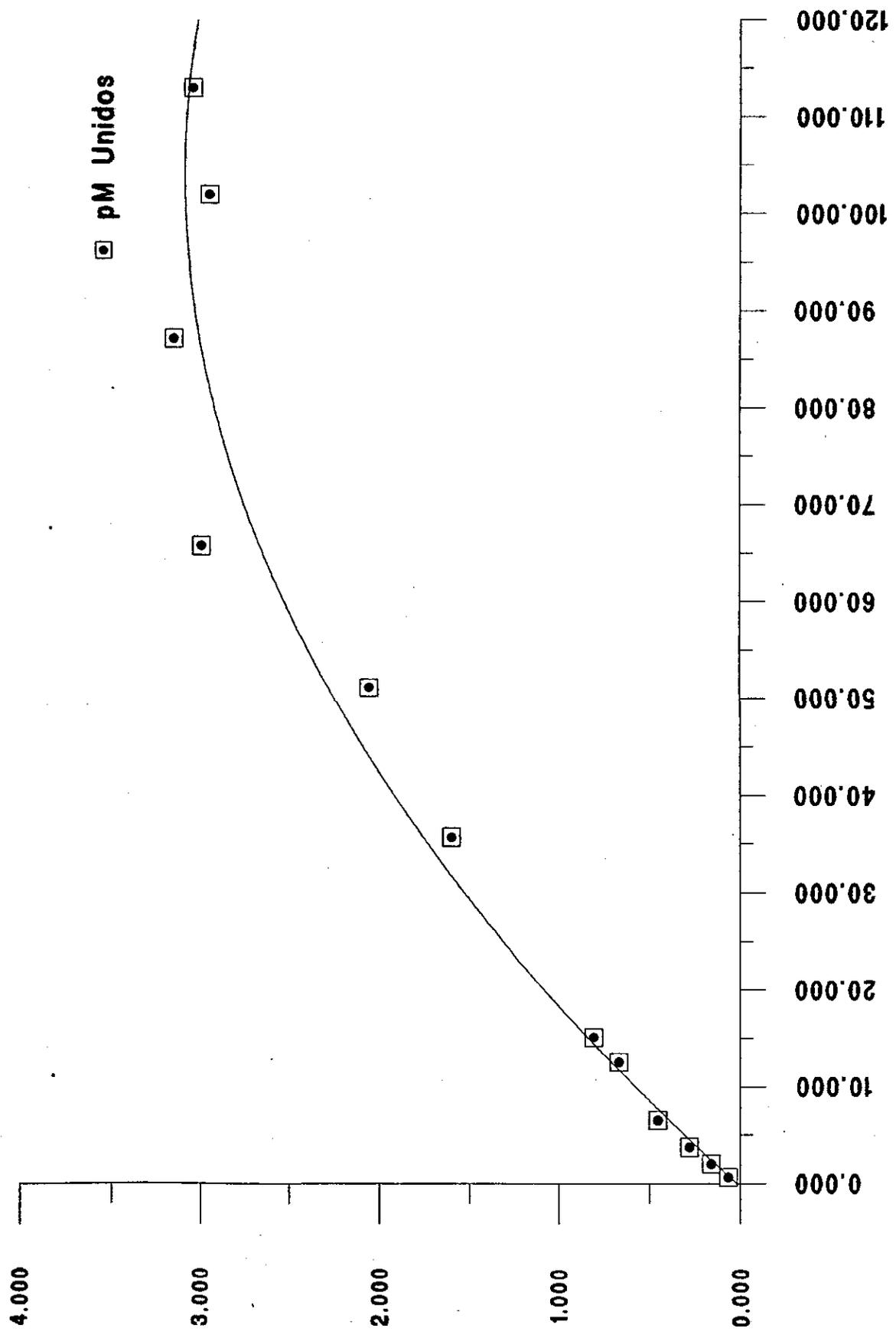


Figura 12.- Curva de saturación del receptor a SS-14. La saturación se encuentra a 63 pM/L. (n=3)

% de Desplazamiento

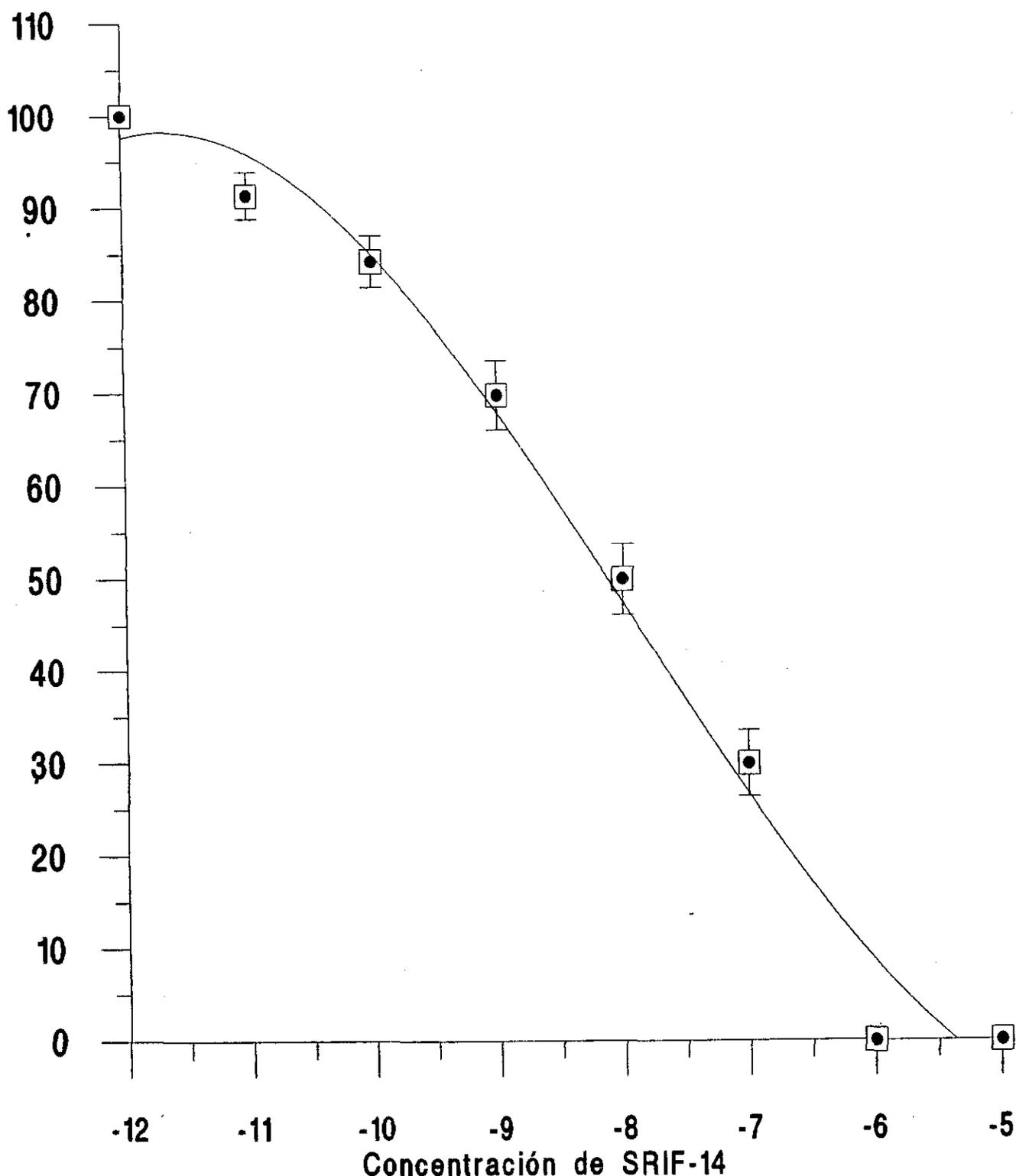


Figura 13.- Curva de desplazamiento de (125I-Tyr11)-SRIF-14 a diferentes concentraciones de SRIF-14. El desplazamiento está dado en porcentajes considerando el desplazamiento máximo a concentraciones de 1 y 10 micromoles

$$y = 123.45017 + 71.76167x + 11.74352x^2 + 0.49528x^3 \quad r^2 = 0.98775$$

receptor o dos receptores. Los resultados obtenidos de estos análisis sugieren que el modelo de un solo receptor de alta afinidad es satisfactorio en cinco de las seis curvas analizadas ($p > 0.05$) cuando fue comparado con el modelo de dos receptores.

Los experimentos en los cuales se registró la tasa de disociación, mostraron una baja tasa de disociación para el receptor en cuestión (Figura 14). En dichos experimentos las reacciones fueron detenidas a 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 y 90 minutos después de 1×10^{-6} M de SRIF-14. La curva consiste de un solo componente de disociación lenta, por lo que los datos sugieren nuevamente un sólo sitio de unión con características de alta afinidad.

Los experimentos en los cuales se aplicaron concentraciones crecientes (1×10^{-12} M a 1×10^{-5} M) de diferentes somatostatinas (SRIF-25, SRIF-28) o del mismo análogo sin marca radioactiva, fueron similares a los desplazamientos de SRIF-14. Los IC_{50} fueron de 7.55×10^{-9} para SRIF-25 y 9.06×10^{-9} para SRIF-28 (Figura 15).

Los resultados de especificidad para SP, VIP, CCK-8 y met-enc, mostraron una reactividad cruzada menor al 10% a concentraciones tan altas como 1×10^{-6} M (Figura 16).

Todo lo anterior parece indicar que, al igual que en mamíferos, con este análogo se puede identificar un sólo tipo de receptor de alta afinidad.

Distribución del receptor a somatostatina en el encéfalo del pez dorado.

Los resultados obtenidos con las incubaciones de cortes de encéfalos de hembras y machos de pez dorado no parecen tener diferente patrón de distribución de los receptores.

En general, en la mayoría de los cortes obtenidos desde las regiones anteriores del encéfalo que comprenden la zona correspondiente a +3.0 del mapa del cerebro anterior realizado por Peter y Gill (1975), hasta las zonas de cerebro posterior reportadas por Prasada Rao, *et al.*, (1987) y Pickavance, *et al.*, (1992), presentan una mayor marca radioactiva comparadas con los controles correspondientes, indicando con ello, la gran cantidad de receptores a somatostatina 14 o un péptido similar a somatostatina 14.

Dicha marca corresponde fundamentalmente a fibras (tanto axónicas como dendríticas).

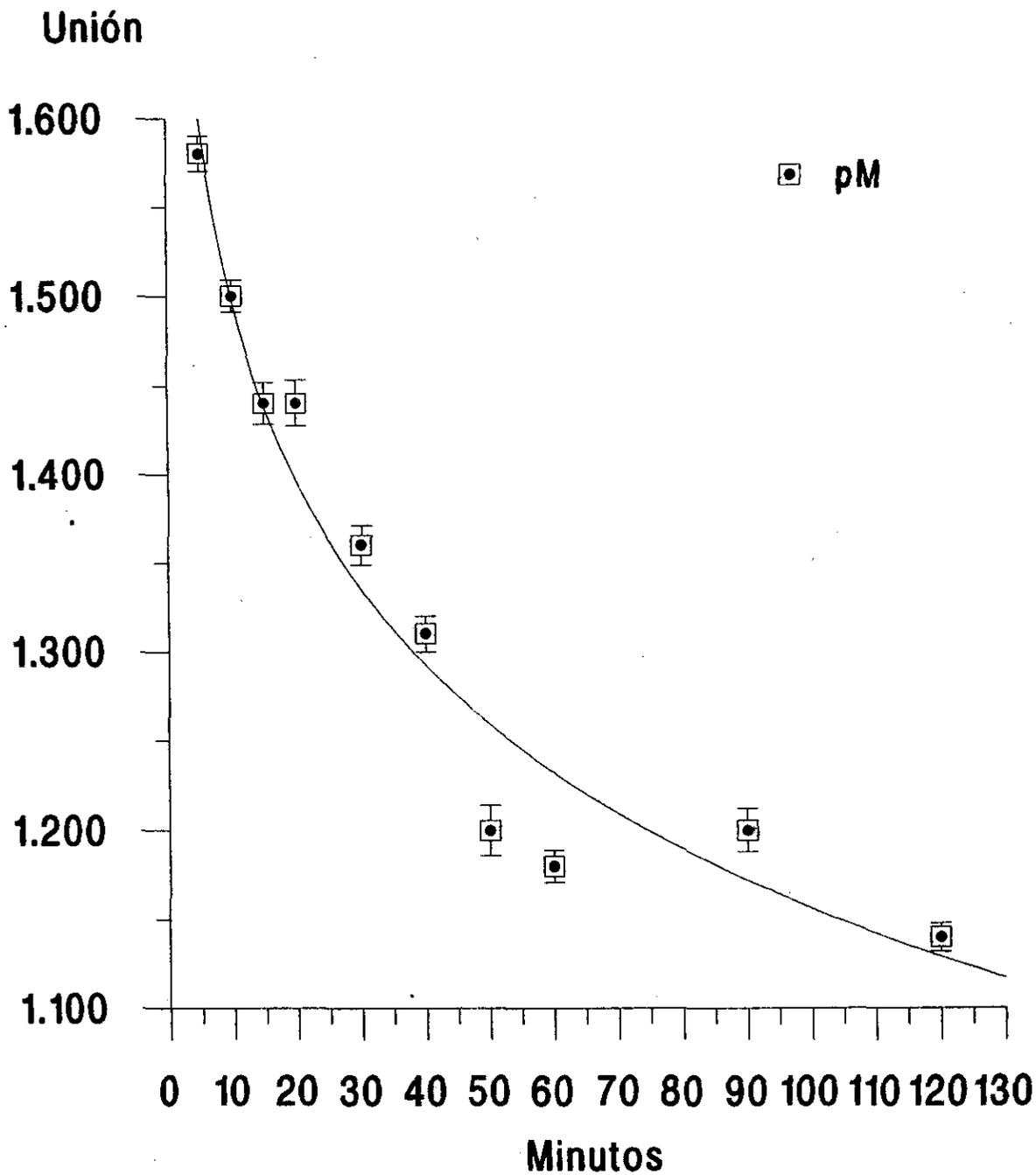


Figura 14.- Tasa de disociación de los receptores a somatostatina 14. (n=3)

$$y = 1.83955 - 0.34170 * \log(x) \quad r^2 = 0.94970$$

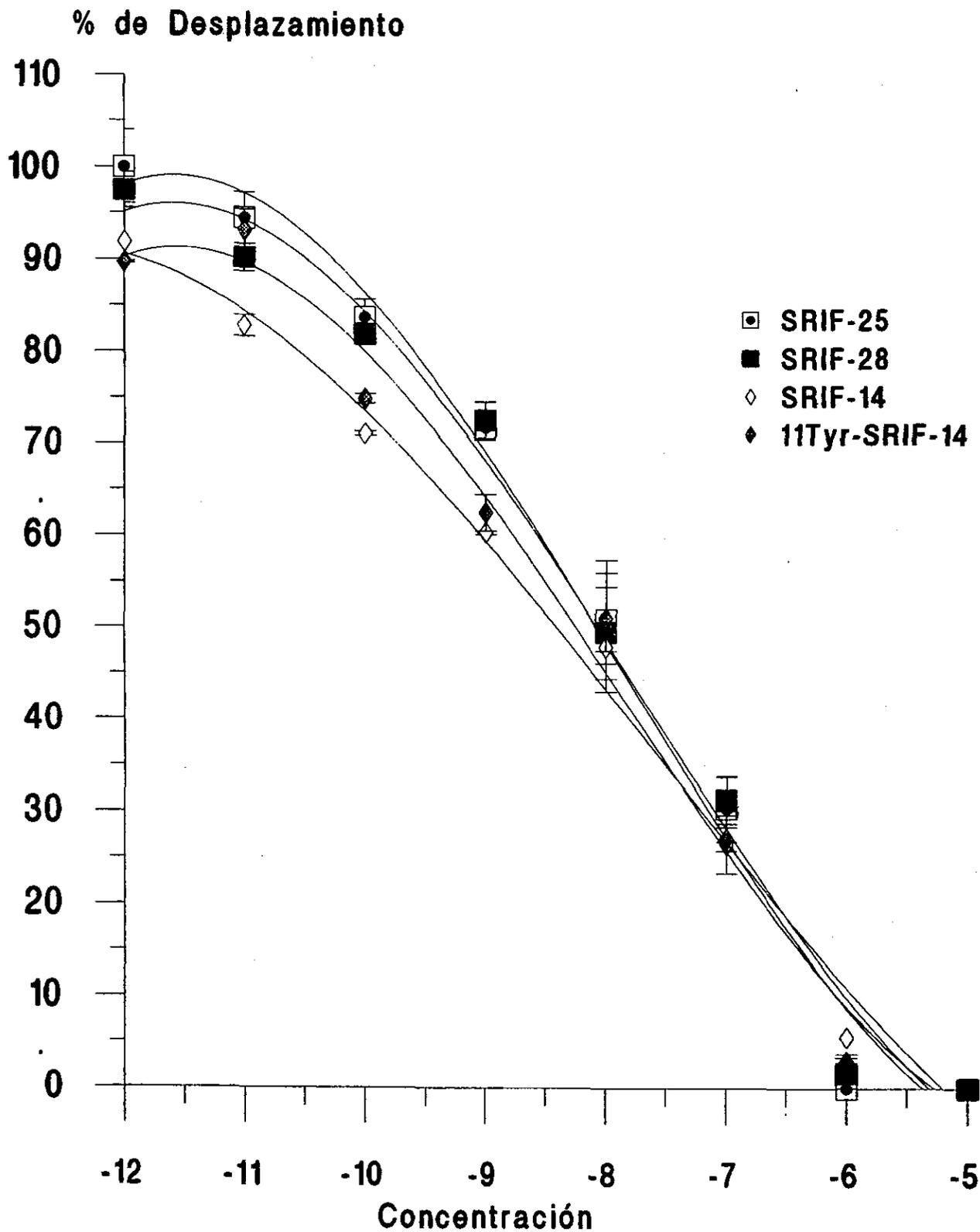


Figura 15.- Curva de competencia entre los distintos tipos de somatostatina. Nótese que tanto SRIF-25 como SRIF-28 muestran una menor afinidad por el receptor en relación a SRIF-14 y el análogo

% de Desplazamiento

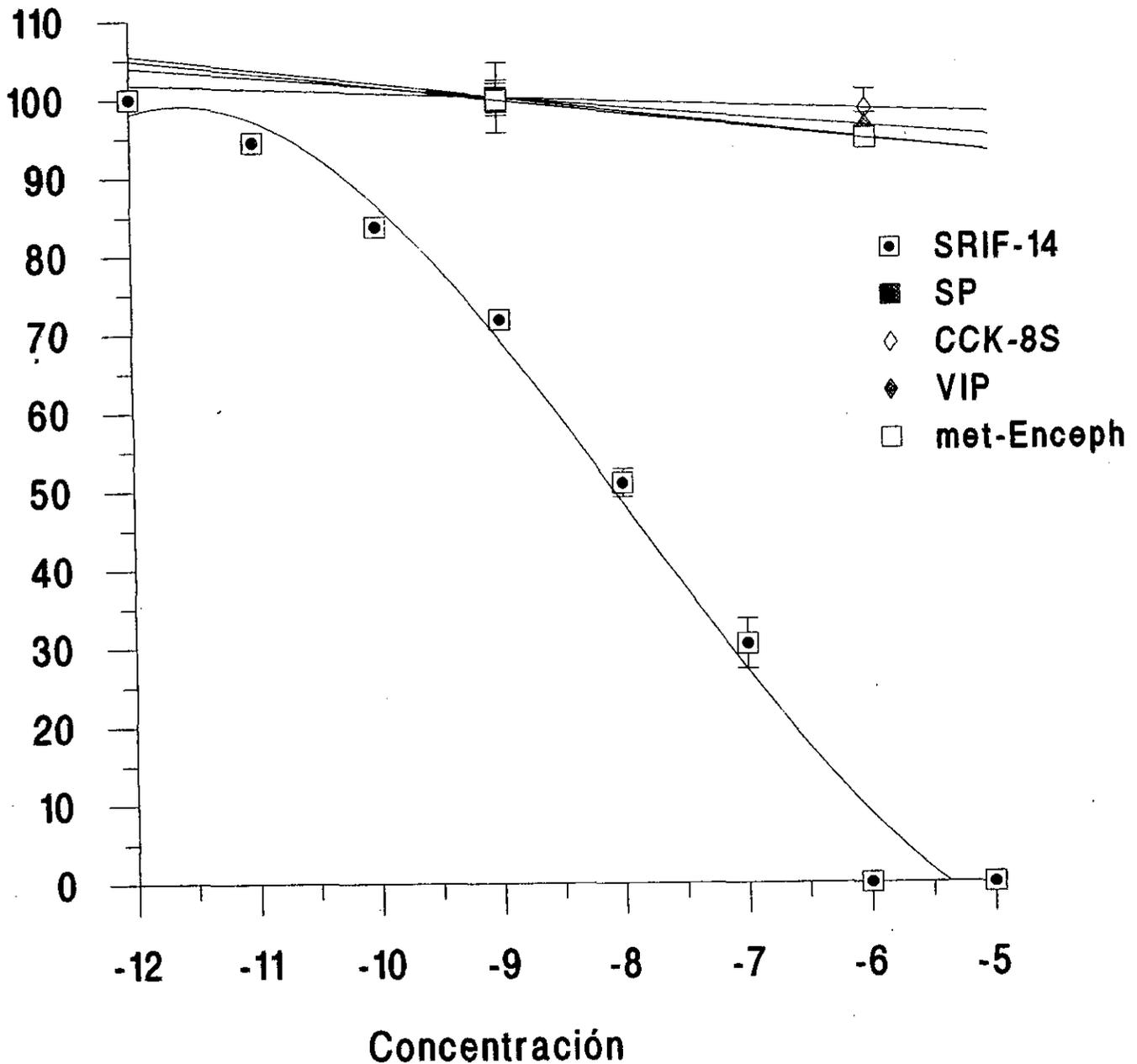


Figura 16.- Especificidad del receptor a somatostatina 14 respecto a otros péptidos. Como puede observarse aun a concentraciones tan altas como 1 micromol, el desplazamiento no es mayor a un 10%. (n=3).

Respecto a los núcleos que en el encéfalo de pez dorado presentan una mayor marca radiográfica con respecto a los cortes control se encuentran los siguientes:

De la zona de +3.0 a +1.7 :

Área dorsal del telencéfalo pars lateralis

Área dorsal del telencéfalo pars dorsalis

Área dorsal del telencéfalo pars medialis

Área dorsal del telencéfalo pars centralis

Área ventral del telencéfalo pars dorsalis

Área ventral del telencéfalo pars lateralis

Área ventral del telencéfalo pars ventralis

Área ventral del telencéfalo pars postcommisuralis (Vp)

Núcleo preóptico periventricularis (NPP)

Núcleo preóptico (NPO)

Núcleo anterioris periventricularis (NAPv)

Tracto óptico (OT)

Núcleo lateral tuberis pars posterioris (NLTp)

Núcleo preglomerulosus pars lateralis (NPGl)

Núcleo dorsomedialis del tálamo (NDM)

De la zona de +0.5 a +0.1

Núcleo dorsomedialis del tálamo (NDM)

Núcleo ventromedial del Tálamo (NVM)

Tectum óptico (OTec)

Tracto óptico (OT)

Núcleo lateral tuberis pars inferioris (NLTI)

Núcleo dorsalis del Tálamo (NDL)

Núcleo lateral geniculatus (NLG)

Núcleo difusus tori lateralis (NDTI)

Núcleo difusus lobi inferioris (NDLI)

Núcleo recessus lateralis (NRL)

En general lóbulo inferior del hipotálamo.

De la zona 0.0 a -0.4

Tectum óptico (Otec)

Núcleo pretectalis (NP)

Núcleo glomeruloso (NG)

Núcleo difusus tori lateralis (NDTI)

Núcleo posterior del tálamo (NTP)

Núcleo dorsomedial del tálamo (NDM)

Núcleo ventromedial del tálamo (NVM)

Cerebelo (C)

Núcleo glomeruloso (NG)

Núcleo cerebeloso del hipotálamo (NCH)

Cerebro medio y cerebro posterior.

Haz mesencéfalo cerebeloso

Una región de la Eminencia granular (EG)

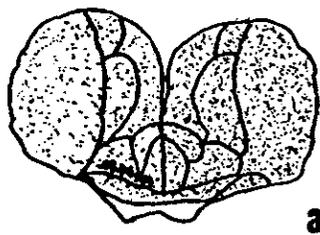
Lóbulo facial (FL)

Corteza del lóbulo vago

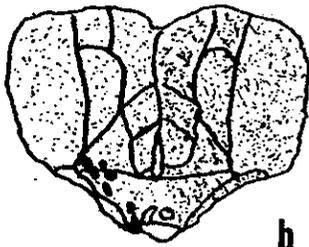
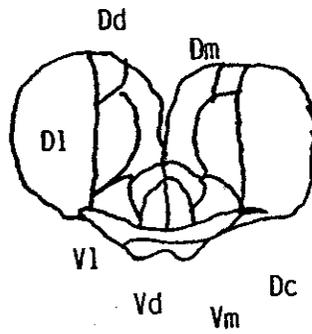
En las figuras 17, 18, 19, 20 y 21 se representan esquemas de las diferentes áreas del encéfalo que muestran las zonas donde se registró presencia de receptores a somatostatina 14, mientras que en la figura 22 algunos cortes de diferentes regiones del encéfalo muestran las diferencias entre la unión específica y otro donde se observa la unión no específica.

GLOSARIO

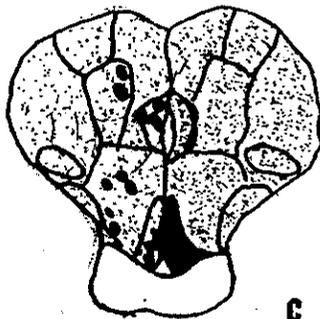
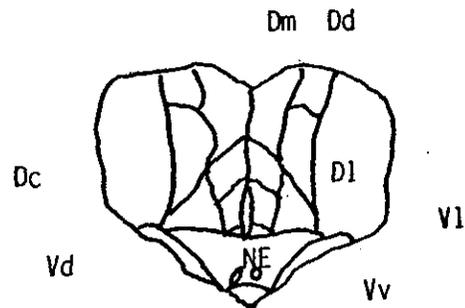
Área dorsal del telencéfalo pars centralis (Dc)	Núcleo marginal parvocelular (PM)
Área dorsal del telencéfalo pars dorsalis (Dd)	Núcleo motor del lóbulo vago (NMVL)
Área dorsal del telencéfalo pars lateralis (Dl)	Núcleo posterior periventricularis (NPPv)
Área dorsal del telencéfalo pars medialis (Dm)	Núcleo posterior talami (NTP)
Área ventral del telencéfalo pars dorsalis (Vd)	Núcleo posterior tuberis (NPT)
Área ventral del telencéfalo pars lateralis (Vl)	Núcleo Preglomerulosus pars lateralis (NPGl)
Área ventral del telencéfalo pars ventralis (Vv)	Núcleo preóptico (NPO)
Área ventral del telencéfalo pars posterioris (Vp)	Núcleo preóptico periventricularis (NPP)
Cerebelo (C)	Núcleo pretectalis (NP)
Complejo motor del vago lateral (DMI)	Núcleo recessus lateralis (NRL)
Eminencia granularis (EG)	Núcleo reticularis lateralis (NRI)
Fascículo longitudinal medial (FLM)	Núcleo reticularis medialis (NRM)
Haz mesencéfalo cerebeloso (HMC)	Núcleo reticularis superioris (NRS)
Lemniscus lateralis (LL)	Núcleo ventromedialis talami (NVM)
Lóbulo facial (FL)	Órgano vasculosum (OV)
Lóbulo vago (VL)	Tectum óptico (OTec)
Locus coeruleus (LC)	Tegmento del cerebro medio (MT)
Nervio vago (VN)	Toris semicircularis (TS)
Núcleo anterior periventricularis (NAPv)	Tracto gustatorio secundario (ST)
Núcleo anterior tuberis (NAT)	Tracto óptico (OT)
Núcleo cerebeloso del hipotálamo (NCH)	Tracto trigémino (DT)
Núcleo difusus lobi inferioris (NDLI)	
Núcleo difusus toris inferioris (NDTI)	
Núcleo difusus toris lateralis (NDTL)	
Núcleo dorsolateralis talami (NDL)	
Núcleo dorsolmedialis talami (NDM)	
Núcleo enteropeduncularis (NE)	
Núcleo glomeruloso (NG)	
Núcleo gustatorio secundario (SGN)	
Núcleo habernularis (NH)	
Núcleo lateral tuberis pars anterioris (NLTa)	
Núcleo lateral tuberis pars inferioris (NLTi)	
Núcleo lateral tuberis pars lateralis (NLTI)	
Núcleo lateral tuberis posterioris (NLTp)	



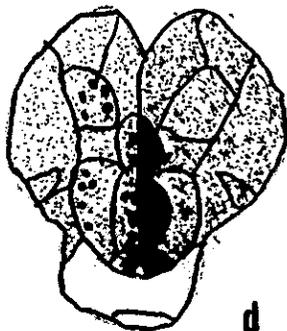
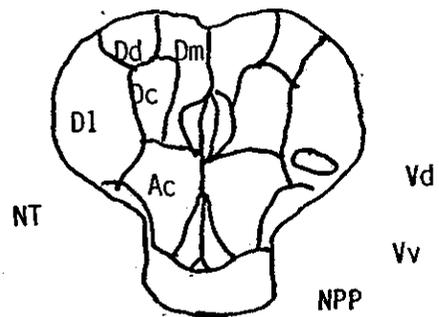
a



b



c



d

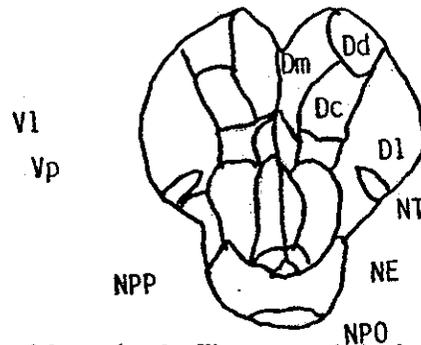


Figura 17.- Corte transversal del encéfalo anterior del pez dorado. El esquema de la derecha indica las zonas anatómicas del cerebro y el esquema de la izquierda representa la distribución de somatostatina (según Pickavance *et al.*, 1992), en la parte izquierda del encéfalo y en la derecha la distribución del receptor a somatostatina. Distancia entre cortes : A-B : 300 μ m, B-C : 300 μ m, C-D : 200 μ m.

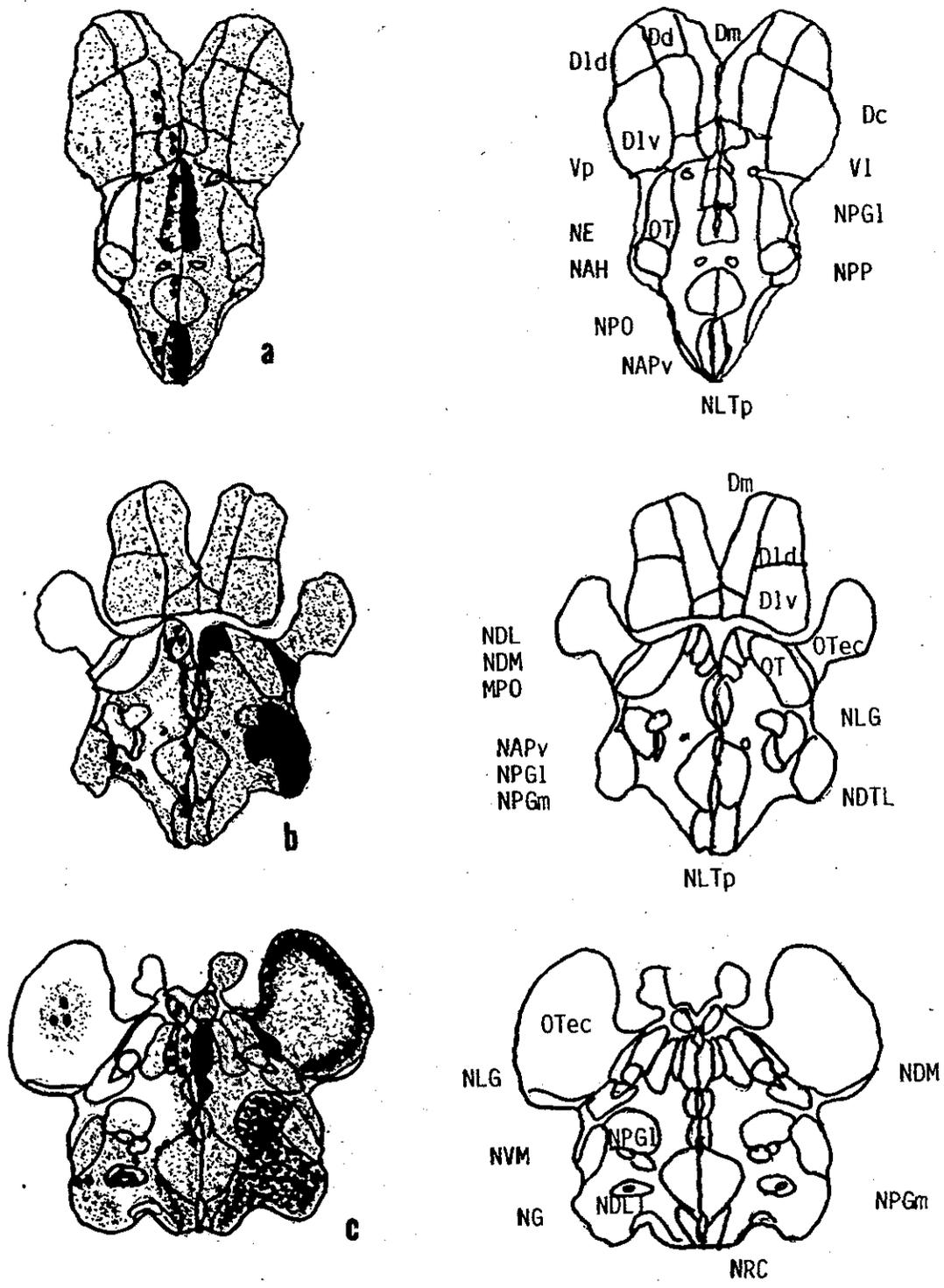


Figura 18.- Corte transversal del encéfalo anterior y medio del pez dorado. El esquema de la derecha indica las zonas anatómicas del cerebro y el esquema de la izquierda representa la distribución de somatostatina (según Pickavance *et al.*, 1992), en la parte izquierda del encéfalo y en la derecha la distribución del receptor a somatostatina. Distancia entre cortes : A-B : 200 μ m, B-C : 200 μ m.

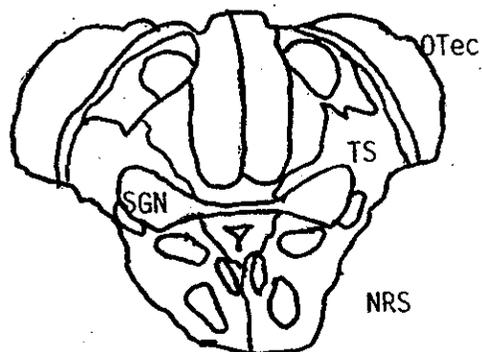
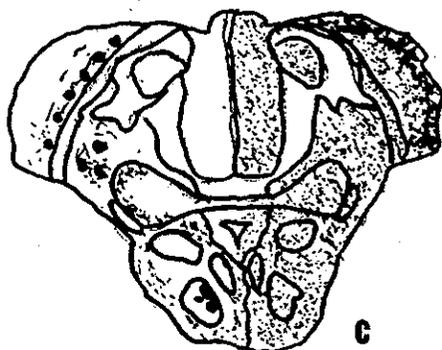
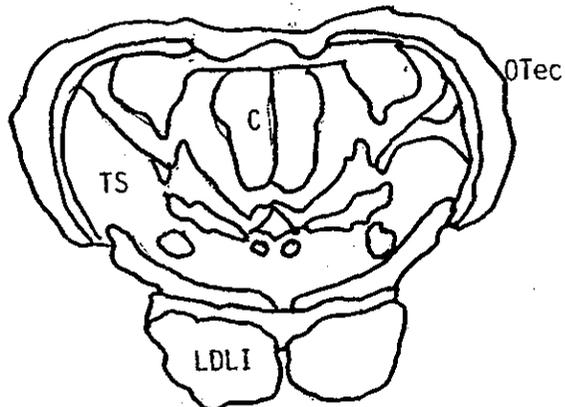
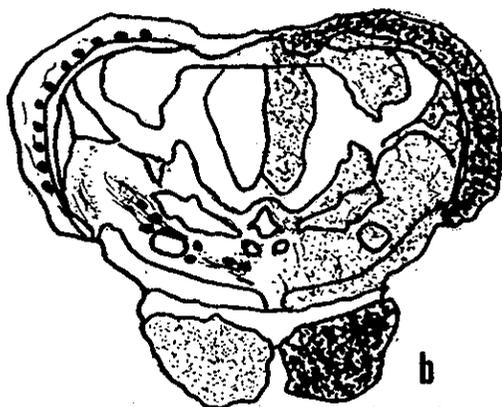
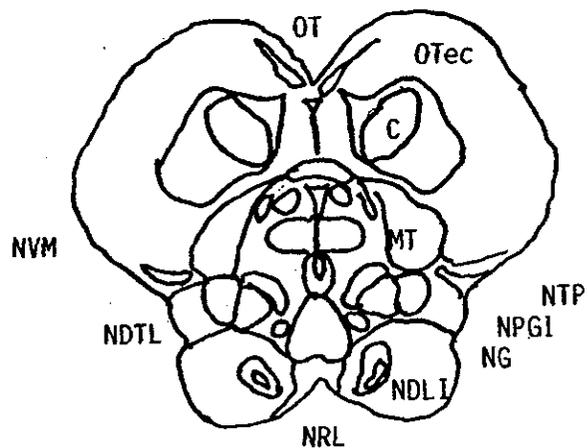
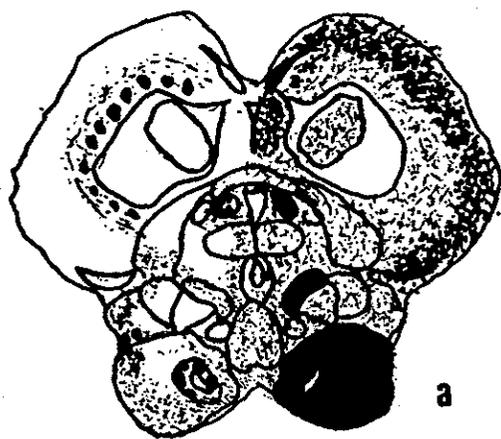


Figura 19.- Corte transversal del encéfalo anterior, medio y posterior del pez dorado. El esquema de la derecha indica las zonas anatómicas del cerebro y el esquema de la izquierda representa la distribución de somatostatina (según Pickavance *et al.*, 1992), en la parte izquierda del encéfalo y en la derecha la distribución del receptor a somatostatina. Distancia entre cortes : A-B : 1000 μ m, B-C : 350 μ m.

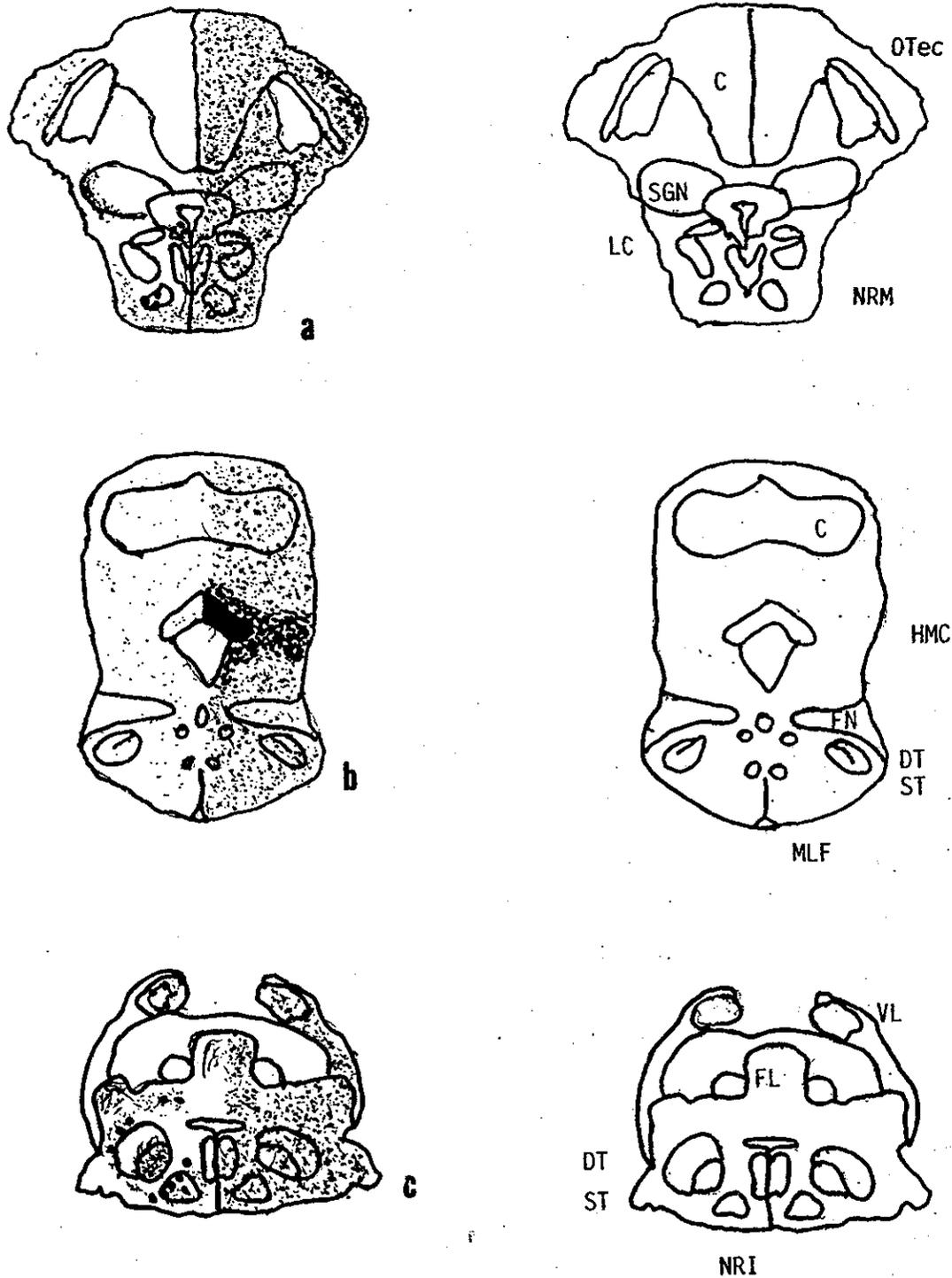


Figura 20.- Corte transversal del encéfalo medio y posterior del pez dorado. El esquema de la derecha indica las zonas anatómicas del cerebro y el esquema de la izquierda representa la distribución de somatostatina (según Pickavance *et al.*, 1992), en la parte izquierda del encéfalo y en la derecha la distribución del receptor a somatostatina. Distancia entre cortes : A-B : 380 μm , B-C : 840 μm .

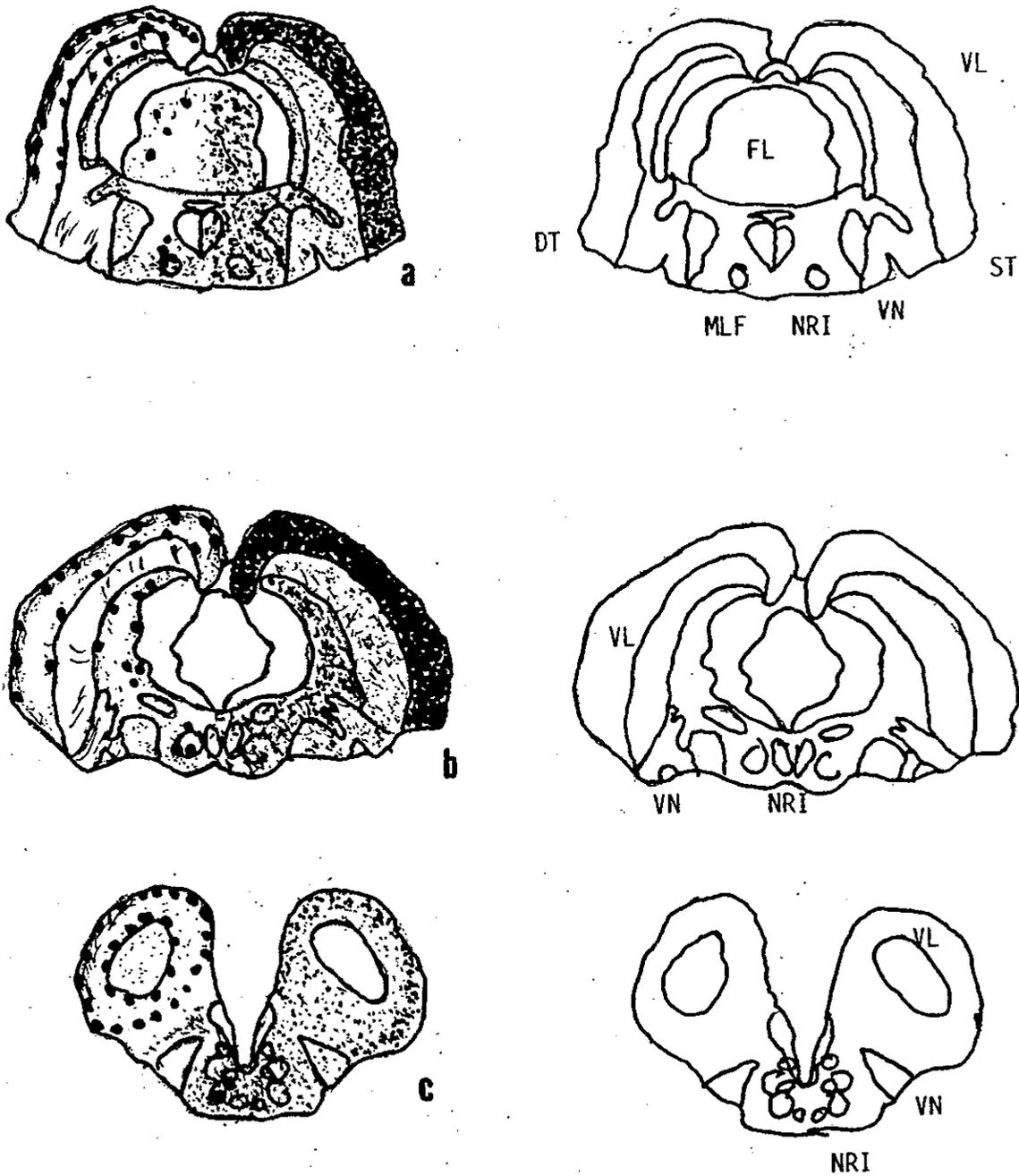


Figura 21.- Corte transversal del encéfalo posterior del pez dorado. El esquema de la derecha indica las zonas anatómicas del cerebro y el esquema de la izquierda representa la distribución de somatostatina (según Pickavance *et al.*, 1992), en la parte izquierda del encéfalo y en la derecha la distribución del receptor a somatostatina. Distancia entre cortes : A-B : 700 μ m, B-C : 700 μ m.

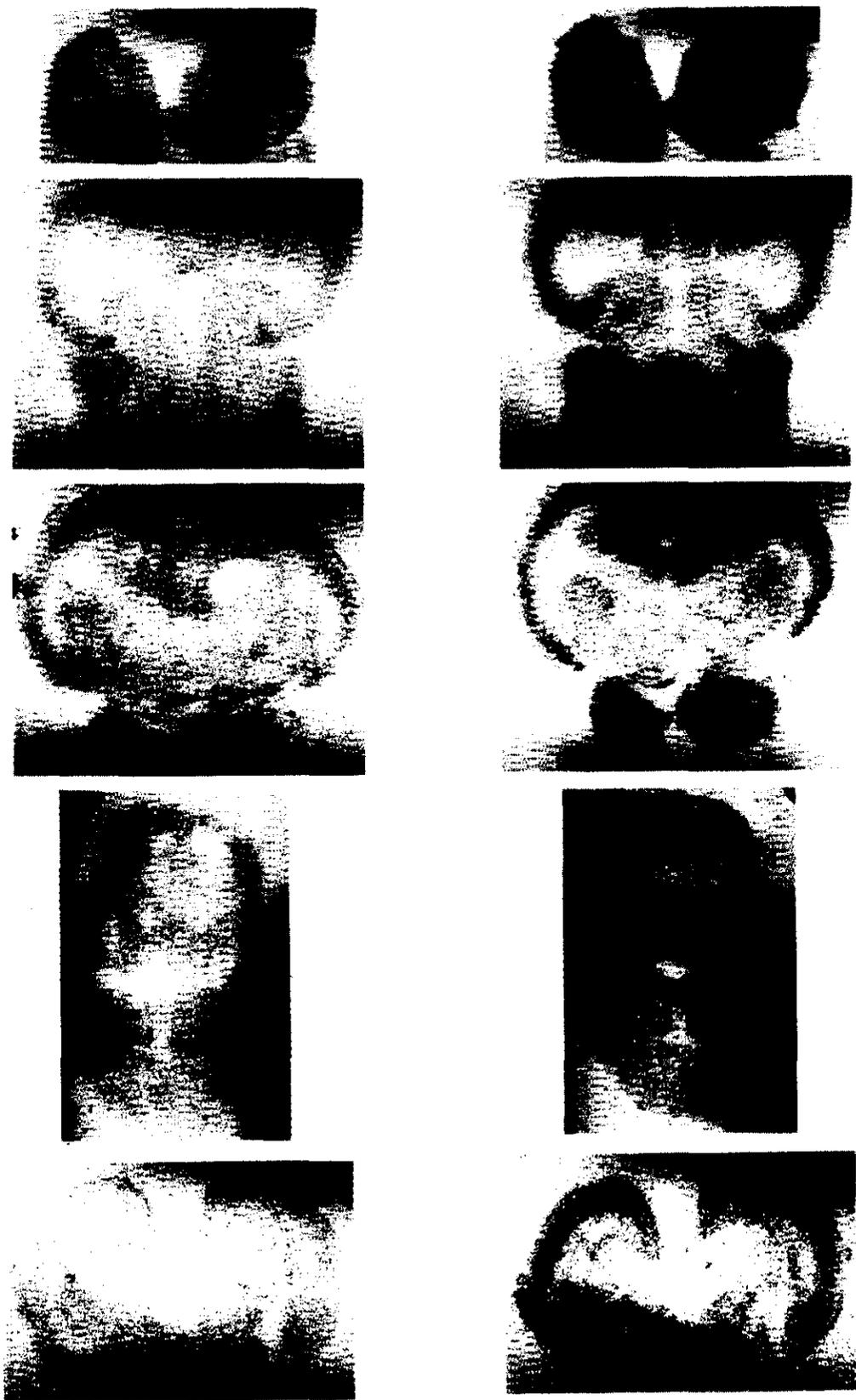


Figura 22.- Cortes testigo expuestos a análogo radioactivo y a un micromol de somatostatina sin marca (columna de la izquierda) y cortes experimentales expuestos al análogo radioactivo (Columna de la derecha). Las zonas donde se aprecia mayor oscuridad en los cortes experimentales corresponden a los sitios donde se tiene mayor presencia del receptor a somatostatina. Distancias aproximada entre cortes: A-B 1600 micrómetros; B-C 600 micrómetros; C-D 2000 micrómetros; D-E 1800 micrómetros.

DISCUSIÓN

La caracterización de receptores a neuropéptidos en cerebro de vertebrados no mamíferos está aún en fase incipiente. Los resultados de esta tesis brindan la primera caracterización de receptores a somatostatina en el cerebro de algún tipo de pez.

En el cerebro de pez dorado demostramos la existencia de receptores a somatostatina por medio del uso del análogo [$^{125}\text{I-Tyr}^{11}$]-SRIF-14. Nuestros datos sugieren que, al igual que en los otros vertebrados para los cuales se ha investigado la influencia de la temperatura sobre la unión de la somatostatina a sus receptores, existe una marcada susceptibilidad a este factor (Laquerriere *et al.*, 1989; Sato *et al.*, 1989). Si bien la unión específica fue de alrededor de sólo 5% a temperatura ambiente, fue más del doble que la obtenida a 4°C. Es importante mencionar, que debido al alto contenido de grasas presentes en el cerebro del pez dorado, la unión inespecífica es muy alta, razón por la cual, la unión específica se ve disminuida considerablemente en relación con otros sistemas como son, por ejemplo, mamíferos (Himick, 1995, comunicación personal).

Otro factor que demostró tener una fuerte influencia sobre el grado de unión específica en la interacción receptores-ligando fue el pH. De los 5 puntos de pH probados, el pH de 7.2 que es el de rango fisiológico, fue el que presentó el mejor porcentaje de unión específica (6.3%). Variaciones leves de pH de 0.2 (pH 7.0) ó 0.3 (pH 7.5) unidades disminuyen sensiblemente el porcentaje de unión específica (alrededor de 3.5%), y a valores de pH más básicos (pH 8.0) dicha unión no parece resultar con una mayor afectación que la observada para el pH de 7.0 y de 7.5. Sin embargo, a pH de carácter ligeramente ácido (pH 6.5), sólo 0.7 unidades por debajo del pH óptimo, la unión específica se ve sumamente afectada disminuyendo hasta el 1.5%.

En la literatura está bien documentada la gran sensibilidad de los receptores a somatostatina con respecto a los cambios de pH, cuando se emplea el mismo tipo de análogo (Sato *et al.*, 1989), en el cual se demostró la dependencia de la unión en relación con este factor. Para otro análogo (($^{125}\text{I-Tyr}^1$)-SRIF-14) de la somatostatina quedó

también en claro que el pH juega un papel importante en la unión a su receptor (Epelbaum *et al.*, 1989).

Esta marcada susceptibilidad al pH podría tener una relación importante con los residuos de ácido aspártico de la posición 122 en el dominio transmembranal 3 para el subtipo 2 y la posición 124 del subtipo 3 (Strnad y Hadcock, 1995; Nehring *et al.*, 1995), y lisina (posición 9) de la somatostatina, pues los mencionados residuos en sistemas de mamíferos parecen interactuar como lo indican experimentos con mutaciones puntuales en los que se sustituyeron los aminoácidos mencionados en los subtipos de receptor (Strnad y Hadcock, 1995; Nehring *et al.*, 1995), y de estar presente un sistema muy similar de receptores en el encéfalo del pez dorado, modificaciones en el pH podrían afectar directamente el estado de disociación de los aminoácidos participantes, explicando el porque en ambos grupos de vertebrados la sensibilidad al pH es tan marcada.

La K_a es similar a la obtenida por otros autores para membranas de cerebro de rata (Sato *et al.*, 1989; Srikant y Patel, 1981), de humanos (Reubi *et al.*, 1985), y de rana (Laquerriere *et al.*, 1989) para todas las cuales cuando se utiliza este análogo, se encuentra una K_a de rango nanomolar.

Cuando se graficó la tasa de disociación en forma logarítmica, se ratificó, la idea de un receptor de alta afinidad al observarse una disociación lenta, característica de receptores que poseen una afinidad de orden nanomolar por su ligando (Habibi *et al.*, 1987a).

Cuando se analizan todos estos resultados, se sugiere la presencia de un solo tipo de receptor de afinidad nM. Se han descrito resultados similares para este análogo, en especial en mamíferos (Srikant y Patel, 1981; Sato *et al.*, 1989), si bien, el uso de otros análogos a somatostatina 14 mostró posteriormente la existencia de más de un subtipo de receptor en mamíferos (Reubi 1984; Tran *et al.*, 1985)

El receptor encontrado en el cerebro del pez dorado no mostró ninguna diferencia importante entre el reconocimiento a diferentes tipos de somatostatinas, pues ni la somatostatina 28, ni la somatostatina 25 presentaron diferentes curvas en el desplazamiento cuando fueron comparadas con las curvas generadas por el análogo de somatostatina 14. Ello está nuevamente de acuerdo con los datos reportados por otros autores para los receptores en mamíferos (Srikant y Patel, 1981; Leroux *et al.*, 1985) en

los que se señala que, sólo los receptores a somatostatina en el páncreas presentan una mayor afinidad a somatostatina 28 que a somatostatina 14, mientras que, en el resto de los sistemas estudiados, para tal efecto, los receptores a somatostatina presentan una mayor afinidad por el SRIF-14 (Ozenberger y Hadcock, 1995). Ello concuerda con los datos obtenidos en nuestro trabajo, pues tanto la somatostatina 25, como la somatostatina 28 presentan una afinidad ligeramente inferior que la demostrada para el análogo utilizado. Con relación a los experimentos de especificidad, nuestros resultados nuevamente son altamente concordantes con los reportados para otros autores en mamíferos (Ogama *et al.*, 1977; Srikant y Patel, 1981; Epelbaum *et al.*, 1982; Raynor y Reisine, 1989), quedando de manifiesto que el receptor analizado no presenta interacción con otras familias de péptidos.

En relación a la distribución de los receptores a somatostatina en el encéfalo de pez dorado presenta algunas concordancias y algunas discordancias con respecto a la distribución reportada para el péptido por el único reporte disponible para todo el encéfalo en esta especie (Pickavance *et al.*, 1992).

En general, una mayor marca radioactiva fue registrada a lo largo de todo el encéfalo cuando los cortes experimentales fueron comparados contra los cortes control correspondientes, ello parece sugerir la utilización de somatostatina como neuromodulador a lo largo de todo el encéfalo, para las diferentes funciones que este órgano controla.

La presencia de receptores a nivel de las diferentes áreas telencefálicas como son ventralis dorsalis, ventralis lateralis, dorsal dorsalis, dorsal ventralis, dorsal mediales y dorsal lateralis es consistente con la distribución que se ha reportado para el péptido Pickavance *et al.* (1992). Sin embargo, no fue posible distinguir una mayor marca radioactiva en neuronas ubicadas en el área ventralis lateralis que evidenciarán mayor acúmulo de receptores en esa zona, como lo reportó Pickavance *et al.*, (1992), en la distribución del péptido.

Ello podría ser explicado por la diferente época en la cual se realizaron los trabajos, pues si bien en nuestro estudio se rastrearon tanto hembras como machos en diferentes estaciones (las cuales no corresponden a etapas de recrudescencia, madurez y regresión

sexual), en el trabajo reportado por Pickavance *et al.*, (1992) no se especifica si se utilizaron uno o ambos sexos, ni la época del año en la cual se realizó el trabajo, por lo que esta misma explicación podría ser tomada en cuenta para entender la discrepancia entre la distribución del péptido y su receptor a través de todo el cerebro, debido a que ambas moléculas son sistemas dinámicos que pueden estar bajo condiciones especiales en algún momento determinado del año, así como el ser influidos por múltiples factores como las hormonas sexuales, por mencionar tan sólo un ejemplo.

Esta idea parece tomar fuerza ya que en la descripción del encéfalo anterior para la detección de la somatostatina en peces jóvenes (3-4 g de peso corporal) de esta especie, se reporta que, en general, en toda el área del telencéfalo inclusive en los bulbos olfatorios se localizan fibras inmunorreactivas a somatostatina (Oliverau *et al.*, 1984) lo mismo que en peces de mayor talla en la misma especie (Kah *et al.*, 1982), sin hacer énfasis en las neuronas encontradas en el área ventral lateralis, lo que contrasta con los datos reportados por Pickavance *et al.*, (1992), quien sólo localizó al péptido en el área anteriormente mencionada, presumiblemente en organismos adultos.

En las zonas de sobreposición en los cortes que abarcan el telencéfalo y diencefalo son notables la presencia de receptores en los núcleos como el núcleo enteropeduncularis, núcleo preóptico, núcleo preóptico periventricularis, núcleo lateral tuberis pars inferioris, núcleo dorsal del tálamo, núcleo posterior periventricularis, núcleo posterior del tálamo, núcleo dorsomedial del tálamo, núcleo ventromedial del tálamo, en los cuales existe una colocalización de la somatostatina y su receptor.

Una de las estructuras más desarrolladas en el encéfalo de peces es el techo óptico. Cuando esta parte anatómica del encéfalo de peces es comparada con su homóloga en cualquier otro cerebro de vertebrado, el techo óptico de teleósteos muestra claramente la importancia que ha cobrado en estos organismos. Además de la función general de coordinación visual, otras funciones han sido atribuidas a dicha estructura en peces. Entre ellas encontramos la correlación con otras vías exteroceptivas, donde después del análisis de la información se emite una respuesta. Es por ello que no resulta sorprendente que en el techo óptico se registre una abundancia de receptores a somatostatina, presentando una estrecha correlación con la presencia del péptido, aunque la inmunorreactividad a la

somatostatina se presentó más bien hacia las regiones internas del techo óptico, la presencia de los receptores fue localizada en toda esta zona, lo que parece sugerir que las neuronas que producen la somatostatina en las capas interiores la liberan a todo lo ancho del techo donde otro grupo de neuronas o fibras presentan los receptores a somatostatina. Otra posible explicación es la carencia de datos acerca de la época del año en la cual se determinó la presencia de somatostatina, y que ello se este reflejando esta aparente discrepancia en la ubicación entre el péptido y su receptor.

Una zona en la cual no se reportó la presencia de somatostatina en los estudios realizados por Pickavance *et al.*, (1992) y que en nuestro trabajo mostró una importante presencia de receptores a SRIF, fue el haz mesencéfalo-cerebeloso. Dado que este haz es una vía de impulsos entre el techo óptico y el cerebelo (Sarnat y Netsky, 1976), es probable que se utilice esta ruta como un auxiliar en el control de movimientos corporales, una vez que la información procedente del exterior fue procesada en el techo óptico, se envíe al cerebelo encargado de coordinar los movimientos corporales que resulten más adecuados para el organismo de acuerdo a los factores externos, como pudieran ser: la presencia de alimento, la presencia de predadores o alguna otra amenaza. Sin embargo, será necesario el realizar nuevos experimentos que demuestren una clara influencia en esta zona, para establecer el papel que tiene la somatostatina a este nivel.

Tanto en los lóbulos facial y vago la presencia de receptores quedó plenamente identificada. En el lóbulo facial se presentó una distribución homogénea a través del lóbulo, tanto en sentido dorsal-ventral como en el sentido céfalo-caudal.

En el caso de los lóbulos vagos, las autorradiografías mostraron que en la parte sensitiva a lo largo de todos los estratos (I-XII) y en la zona motora en los estratos (XII-XVI), se tiene una marcada presencia de receptores. Dichos hallazgos concuerdan con la presencia reportada para la somatostatina por Pickavance *et al.*, (1992), e indiscutiblemente existe una marcada influencia de esta neurohormona en el sentido del gusto, tanto a nivel palatino como a niveles de branquias y papilas gustativas ubicadas en la piel, pues es bien sabido que entre los vertebrados, es en los teleósteos donde se presenta la mayor sensibilidad al sentido del gusto y es en dicha zona del encéfalo donde se controla esta sensación.

La amplia distribución de los receptores a somatostatina a través del encéfalo de pez dorado parece sugerir que la somatostatina es un neuropéptido ampliamente utilizado en el sistema nervioso central de esta especie y, posiblemente, de la mayoría de la especies de teleósteos, lo que brinda la oportunidad de plantear una amplia gama de experimentos en relación con el papel específico que tiene el péptido en la regulación de las diferentes funciones para las áreas en las cuales se encuentra su receptor, además de la posibilidad de investigar los mecanismos de los cuales se vale el receptor para ejercer su efecto en cada uno de los sistemas neuronales en los que participa, tales como: los diferentes núcleos del cerebro anterior, en el techo óptico, el haz mesencéfalo-cerebeloso, el lóbulo facial y el lóbulo vago, por mencionar sólo algunos ejemplos.

Parece claro también, que al haber encontrado características cinéticas del receptor similares a las reportadas para el receptor a somatostatina de mamíferos a través del uso del mismo análogo ($^{125}\text{I-Tyr}^{11}$)-SRIF-14, se presenta la oportunidad de investigar si, al igual que en mamíferos, se encuentran más subtipos de receptores a somatostatina, y, de ser así, determinar su distribución por medio de hibridación *in situ* en el encéfalo, además de tratar de establecer los factores que regulan su aparición como podrían ser la presencia o ausencia de esteroides sexuales en el medio.

CONCLUSIONES

-En el presente trabajo establecimos la existencia de un receptor a somatostatina 14 en el encéfalo de pez dorado.

- La distribución del receptor en el encéfalo del pez dorado en relación con la distribución reportada para la somatostatina en el mismo órgano de este pez es fundamentalmente similar, si bien existen algunas regiones en donde no existe correlación entre la distribución del péptido con su receptor.

REFERENCIAS

- Andrews, P. C., Pubols, M.N., Hermodson, M.A., Sheares, B.T., y Dixon, J.E., (1984b) Structure of the 22-residue somatostatin from catfish. An O-glycosylated peptide having multiple forms. *J. Biol. Chem.* 259 : 13267-13272.
- Bennett-Clarke, C., Romagnano, M. A., y Joseph, S. A., (1980) Distribution of somatostatin in the rat brain : telencephalon and diencephalon. *Brain Res.* 188 : 473-486.
- Bennet, J.P. y Yamamura, H.I., (1985) Neurotransmitter, hormone, or drug receptor binding methods. En : *Neurotransmitters receptor Binding.* New York. Raven Press. pp 61-91.
- Bell, G.I., Yasuda, K., Kong, H., Law, S.F., Raynor, K. y Reisine, T., (1995) Molecular biology of somatostatin receptors. En : *Somatostatin and its receptors.* Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 190) p 65-88.
- Bernstein, J.J., 1970. Anatomy and physiology of the central nervous system. Chapter 1. En : *Fish Physiology Vol. IV.* Hoar, W.S. and Randall D.J. editors. Academic Press. New York. 1-90.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-254.
- Brazeau, P., Vale, W., Burgus, R., Ling, N., Butcher, M., Rivier, J., y Guillemin, R., (1973) A hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of pituitary growth hormone. *Science* 179 : 77-79.
- Breder, C. D., Yamada, Y., Yasud, K., Seino, S., Saper C. B., y Bell, G. I., (1992) Differential expression of somatostatin receptor subtypes in brain. *J. Neurosci.* 12 : 3920-3934.
- Bruno, J.F., Xu, Y., Song, J., y Berelowitz, M., (1993) Tissue distribution of somatostatin receptor subtype messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinol* 133 : 2561-2567.
- Bruno, J. F., Xu, Y., Song, J., y Berelowitz, M., (1992) Molecular cloning and functional expression of a brain-specific somatostatin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89 : 11151-11155.
- Bruns, Ch., Weckbecker, G., Raulf, H.L., y Hoyer, D., (1995) Characterization of somatostatin receptor subtypes. En: *Somatostatin and its receptors.* Wiley, Chichester (Ciba Foundation Symposium 190) p89-110.

Degtiar, V. E., Witting, B., Schultz, G., y Kalkbrenner, F., (1996) A specific G α heterodimer couples somatostatin receptors to voltage-gated calcium channels in RINm5F cells. FEBS letters 380 : 137-141.

Dournaud, P., Gu, Y. Z., Schonbrunn, A., Mazella, J., Tannebaum, G. S., y Beaudet, A., (1996) Localization of the somatostatin receptor SST2A in rat brain using a specific anti-peptide antibody. J. Neurosci. 16 : 4468-4478.

Dubois, M. P., Billard, R., Breton, B. y Peter, R. E., (1979) Comparative distribution of somatostatin, LHRH, neurophysin, and β -endorphin in the rainbow trout : An immunocytological study. Gen. Comp. Endocrinol. 37 : 220-232.

Epelbaum, J.; (1992) Somatostatin receptors in the central nervous system. En : Basic and clinical aspects of neuroscience Vol. 4 : Somatostatin. Chapter 2. Springer Sandoz, Bassel, Switzerland. pgs 12-21.

Epelbaum, J., Agid, F., Agid, Y., Beaudet, A., Bertrand, P., Enjalbert, A., Heidet, V., Kordon, C., Krantic, S., Léonard, J. F., Musset, F., Moyses, E., Peillon, F., Slama, A., y Videau, C., (1989) Somatostatin receptors in brain and pituitary. Horm. Res. 31 : 145-150.

Epelbaum, J., Tapia Arancibia, L., Kordon, C., y Enjalbert, A., (1982) Characterization, regional distribution, and subcellular distribution of 125I-Tyr1-somatostatin binding sites in the rat brain. J. Neurochem. 38 : 1515-1523.

Gonzalez, B. J., Leroux, P., Bodenant, C., Laquerriere, A., Coy, D. H., y Vaundry, H., (1989). Ontogeny of somatostatin receptors in the rat brain : biochemical and autoradiographic study. Neuroscience 29 : 629-644.

Fitzpatrick, V. D. y Vandlen, R. L., (1994) Agonist selectivity determinants in somatostatin receptors subtypes I and II. J. Biol Chem. 269 : 24621-24626.

Gulya, K., Wamsley, J. K., Gehlert, D., Pelton, J. T., Duckles, S. P., Hruby, V. J., y Yamamura, H. I., (1985) Light microscopic autoradiographic localization of somatostatin receptors in the rat brain. J. Pharmacol. Exp. Ther. 235 : 254-258.

Habibi, H.R., Peter, R.E., Sokolowska, M., Rivier, J.E., y Vale, W.W., (1987) Characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding to pituitary Receptors in goldfish (*Carassius auratus*). Biol. Reprod. 36 : 844-853.

Kah, O., Chambolle, P., Dubourg, P., y Dubois, M. P., (1982) Localisation immunocytochimique de la somatostatine dans le cerveau antérieur et l'hypophyse de dex téléostéens, le cyprin (*Carassius auratus*) et *Gambusia* sp. C. R. Acad. Sc. Paris t. 294 (III) : 519-524.

- Himick, B. A. y Peter, R.E., (1994) CCK/gastrin-like immunoreactivity in brain and gut, and CCK suppression of feeding in goldfish. *Am. J. Physiol.* 267 : R841- R851.
- Hoyer, D., Bell, G. I., Berelowitz, M., Epelbaum, J., Feniuk, W., Humphrey, P. P. A. , O'Carroll, A-M., Patel, Y. C., Schonbrunn, A., Taylor, J. E., y Reisine, T., (1995) Classification and nomenclature of somatostatin receptors. *TIPS* 16 : 86-88.
- Hoyer, D., Lübbert, H., y Bruns, C., (1994) Molecular pharmacology of somatostatin receptors. *Arch. Pharmacol.* 350 : 441-453.
- Krisch, B., (1978) Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of somatostatin-immunoreactive elements in the rat brain. *Cell Tissue Res.* 195 : 499-513.
- Lamberts, S. W. J., Van der Lely, A. J., y de Herder, W. W., (1996) Drug therapy : octreotide. *N. Engl. J. Med.* 334 : 246-254.
- Laquerriere, A., Leroux, P., Gonzalez, B. J., Bodenant, C., Benoit, R., y Vaudry, H., (1989) Distribution of somatostatin receptors in the brain of the frog *Rana ridibunda* : Correlation with the localization of somatostatin-containing neurons. *J. Comp. Neur.* 280 : 451-467.
- Leroux, P., Bodenant, C., Bologna, E., Gonzalez, B., y Vaudry, H., (1995) Transient expression of somatostatin receptors in the brain during development. En *Somatostatin and its receptors*, Wiley, (Ciba Foundation Symposium 190). 127-141.
- Leroux, P., Quirion, R., y Pelletier, G., (1985) Localization and characterization of brain somatostatin receptors as studied with somatostatin-14 and somatostatin-28 receptor radioautography. *Brain Res.* 347 : 74-84.
- Leroux, P. y Pelletier, G., (1984) Radioautographic localization of somatostatin-14 and somatostatin-28 binding sites in the rat brain. *Peptides* 5 : 503-506.
- Luo, D. y 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.
- Luo, D., McKeown, B.A., Rivier, J., y 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.
- Marchant, T.A., Dulka, J.G., y Peter, R.E., (1989) Relationship between serum growth hormone levels and the brain and pituitary content of immunoreactive somatostatin in the goldfish, *Carassius auratus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* 73 : 458-468.

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

McCarthy, G. F., Beaudet, A., y Tannenbaum, G. S., (1992) Colocalization of somatostatin receptors and growth hormone-releasing factor immureactivity in neurons of the rat arcuate nucleus. Neuroendocrinol. 56 : 18-24.

Monnier, Z. y Bride, M., (1995) In vitro effects on methione-encephalin, somatostatin, and insulin on cultered gonadal cells of the snail *Helix aspersa*. Experientia 51 : 824-830.

Morita, Y. y Finger, T. E., (1987) Topographic representation of the sensory and motor of the vagus nerve in the medulla of goldfish, *Carassius auratus*. J. Comp. Neurol. 264 : 231-249.

Morita, Y. y Finger, T. E., (1985) Topographic and laminar organization of the vagal gustatory system in the goldfish, *Carassius auratus*. J. Comp. Neurol. 238 : 187-201.

Nehring, R. B., Meyerhof, W., y Richter, D., ((1995) Aspartic acid residue 124 in the third transmembrane domain of somatostatin receptor subtype 3 is essential for somatostatin-14 binding. DNA. Cell Biol. 14 : 939-944.

O'Carroll, A. M. y Krempels, K., (1995) Widespread distribution of somatostatin receptor messenger ribonucleic acids in rat pituitary. Endocrinol. 136 : 5224-5227

Ogawa, N., Thompson, T., Friesen, H. G., Martin, J. B., y Brazeau, P., (1977) Propieties of soluble-binding protein. Biochem J. 165 : 269-277.

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

Oliverau, M., Ollevier, F., Vandesande, F., y Verdonck, W., (1984) Immunocytochemical identification of CRF-like and SRIF-like peptides in the brain and the pituitary of cyprinid fish. Cell Tissue Res. 237 : 379-382.

Ozenberger, B. A. y Hadcocok, J. R., (1995) A single substitution in somatostatin receptor Subtype 5 increases affinity for somatostatin-14. Mol. Pharmacol. 47 : 82-87.

Painson, J.C. y Tannenbaum G.S., (1991) Sexual dimorphism of somatostatin and growth hormone releasing factor signal in the control of pulsatile growth hormone secretion in the rat. Endocrinol. 128 (6) : 2858-2866.

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

Patel, Y. C., Greenwood, M. T., Warszynska, A., Panetta, R., y Srikant, C. B., (1994) All five cloned human somatostatin receptors (hSSTR1-5) are functionally coupled to adenylyl cyclase. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 198 : 605-612.

Patel, Y., (1992) General aspects of the biology and function of somatostatin. En : *Basic and clinical aspects of neuroscience Vol. 4 :Somatostatin. Chapter 1.* Springer Sandoz, Bassel, Switzerland. pags 1-15.

Patel, Y. C. y Reichlin, S., (1978) Somatostatin in hypothalamus, extrahypotalamic brain, and peripheral tissues of the rat. *Endocrinol.* 102 (2) : 523-530.

Pelletier, G., Leroux, P., y Morel, G., (1986) Localization of somatostatin receptors. *Methods in Enzimology* 124 : 607-617.

Peter, R. E. y Chang. J. P., (1997) Growth hormone secretion in fish. XIII International congress of comparative endocrinology. 915-9191. Japan.

Peter, R. E. y Marchant, T. A., (1995) The endocrinology of growth in carp and related species. *Aquaculture* 129 : 299-321.

Peter, R. E. y Gill, V. E., (1975) A stereotaxic atlas and technique for forebrain nuclei of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neur.* 159 : 69-102.

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

Plisetskaya, E. M., Pollock, H. G., Rouse, J. B., Hamilton, J. W., Kimmel, J. R., Andrews, P. C., y Gorbman, A., (1986) Characterization of Coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) islet somatostatins. *Gen. Comp. Endocrinol.* 63 : 252-263.

Puebla, L. y Arilla, E., (1996) Glycine increases the number of somatostatin receptor and somatostatin mediated inhibition of the adenylate cyclase system in the rat hippocampus. *J. Neurosci. Res.* 43 : 346-354.

Rao, P. P. D., Jadhao, A. G., y Sharma, S.C., (1987) Descending Projection neurons to the spinal cord of the goldfish, *Carassius auratus*. *J. Comp. Neurol.* 265 : 96-108.

Raulf, F., Pérez, J., Hoyer, D., y Bruns, C., (1994) Differential expression of five somatostatin receptor subtypes, SSTR1-SSTR5, in the CNS and peripheral tissue. *Digestion* 55 : 46-53.

Raynor, K. y Reisine, T., (1989) Analogs of somatostatin selectively label distinct subtypes of somatostatin receptors in rat brain. *J Pharmacol. Exp. Ther* 251 : 510-517.

Reubi, J. C. y Maurer, R., (1985) Autoradiographic mapping of somatostatin receptors in the rat central nervous system and pituitary. *Neuroscience* 15 (4) : 1183-1193.

Reubi, J. C., (1984) Evidence for two somatostatin-14 receptors types in rat brain cortex. *Neurosci. lett.* 49 : 259-263.

Sarnat, H. B., y Netsky, M. G., (1976). Evolución del sistema nervioso. H. Blume Ediciones. Madrid. 408 p.

Sas, E. y Maler L., (1991) Somatostatin-like immunoreactivity in the brain of an electric fish (*Apteronotus leptorhynchus*) identified with monoclonal antibodies. *J. Chem. Neuroanat.* 4 : 155-186.

Sakamoto, C., Nagao, M., Matozaki, T., Nishizaki, H., Konda, Y., y Baba, S., (1988) Somatostatin receptors on rat cerebrocortical membranes. *J. Biol. Chem.* : 263 : 14441-14445.

Sato, H., Ota, Z., y Ogawa, N., (1989) Biochemical and pharmacological characterization of somatostatin receptors in brain rat. *Res. Comm. Chem. Pathol. Pharmacol.* 66 (2) : 203-218

Schoeffter, P., Pérez, J., Langenegger, D., Schüpbach, E., Bobirnac, I., Lübbert, H., Bruns, C., y Hoyer, D., (1995) Characterization and distribution of somatostatin SS-1 and SRIF-1 binding sites in rat brain. Identity with SSTR-2 receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 289 : 163-173.

Srikant, C. B. y Patel, Y.C., (1981) Somatostatin receptors : identification and characterization in rat brain membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 78 (6) 3930-3934.

Strnad, J., y Hadcock, J. R., (1995) Identification of a critical aspartate residue in transmembrane domain three necessary for the binding of somatostatin to the somatostatin receptor SSTR2. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 216 : 913-921.

Thoss, V. S., Pérez, J., Duc, D., y Hoyer, D., (1995) Embryonic and postnatal mRNA distribution of five somatostatin receptor subtypes in the rat brain. *Neuropharmacol.* 34 : 1673-1688.

Todisco, A., Seva, C., Takeuchi, Y., Dickinson, C. J., y Yamada, T., (1995) Somatostatin inhibits AP-1 function via multiple protein phosphatases. *Am. J. Physiol.* 269 : G160-G166.

Tran, V.T., Beal, M.F., y Martin, J.B., (1985) Two types of somatostatin receptors differentiated by cyclic somatostatin analogs. *Science* 228 : 492-495.

Tran, V. T., Uhl, G. R., Perry, D. C., Manning, D. C., Vale, W. W., Parrin, M. H., Rivier, J. E., Martin, J. B., y Snyder, S. H., (1984) Autoradiographic localization of somatostatin receptors in rat brain. *Eur J. Pharmacol.* 101 : 307-309.

Trudeau, V.L., Lin, H.R., y Peter R.E., (1991) Testosterone potentiates the serum gonadotropin response to gonadotropin-releasing hormone in the common carp (*Cyprinus carpio*) and Chinese loach (*Paramisgurnus dabryanus*). *Can. J. Zool.* 69 : 2480-2484.

Uhl, G. R., Tran, V., Snyder, S. H., y Martin, J. B., (1985) Somatostatin receptors : Distribution in rat central nervous system and human frontal cortex. *J. Comp. Neur.* 240 : 288-304.

Vigh-Teichmann, I., Vigh, B., Korf, H. W. y Oksche, A., (1983) CSF-contacting and other somatostatin-immunoreactive neurons in the brains of *Anguilla anguilla*, *Phoxinus phoxinus*, and *Salmo gairdneri* (Teleostei). *Cell Tissue Res.* 233 : 319-334.

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

Yasuda, K., Rens-Domiano, S., Breder, C. D., Law, S. F., Saper, C. B., Reisine, T., y Bell, G. I., (1992) Cloning of a novel somatostatin receptor, SSTR3, coupled to adenylylcyclase. *J. Biol. Chem.* 267 : 20422-20428.