

03081

10

2ej.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL CCH,
PROYECTO ACADEMICO DE LICENCIATURA, MAESTRIA Y DOCTORADO EN
INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA

ALGUNOS ASPECTOS DEL CONTROL DE LA ACTIVIDAD HIPOFISARIA

T E S I S

Que para obtener el grado de Doctor en Investigación Biomédica Básica
presenta

M en C Georgina Ponce Romero

CENTRO DE INVESTIGACION SOBRE INGENIERIA GENETICA Y BIOTECNOLOGIA,
Cuernavaca, Morelos

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

FEBRERO 1991.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 está 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.

INDICE

RESUMEN

ABSTRACT

ABREVIATURAS

PROLOGO

INTRODUCCION

- 1- Papel fisiológico del TRH
- 2- Distribución de TRH
- 3- Biosíntesis de TRH
 - 3.1- Regulación de la biosíntesis
- 4- Liberación de TRH
- 5- Degradación de TRH
 - 5.1- Regulación de la degradación
- 6- La hipófisis
 - 6.1- Control de la secreción de TSH y PRL
- 7- Mecanismo de acción de los factores hipotalámicos
 - 7.1- Los receptores involucrados
 - 7.2- Proteínas de acoplamiento
 - 7.3- Los sistemas efectores
 - 7.3.1- Producción de nucleótidos cíclicos
 - 7.3.2- Metabolismo de fosfolípidos
 - 7.3.3- Metilación de fosfolípidos
 - 7.3.4- Producción de ácido araquidónico
 - 7.3.4.1- Metabolismo del ácido araquidónico
 - 7.3.5- El calcio como mensajero intracelular
 - 7.3.6- Actividad eléctrica de canales
 - 7.4- Interacción entre las diferentes vías de transducción
 - 7.5- Mecanismos de transducción de la información y actividad celular
 - 7.5.1- Síntesis de TSH
 - 7.5.2- Síntesis de PRL
 - 7.5.3- El receptor de TRH

PLAN DE TRABAJO

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE LA PGA II "in vivo" e "in vitro"
OBJETIVOS

MATERIAL Y METODOS

RESULTADOS

DISCUSION

LA PRODUCCION DE ACIDO ARAQUIDONICO EN LA SECRECION DE PROLACTINA.
OBJETIVOS

RESULTADOS

DISCUSION

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

PUBLICACIONES

BIBLIOGRAFIA

APENDICE

RESUMEN

El hipotálamo regula y coordina la actividad de la glándula hipófisis mediante las secreciones que vierte en la sangre portal, las que al activar receptores hipofisarios afectan la actividad celular. El funcionamiento del sistema neuroendócrino depende en gran medida de la adecuada comunicación inter e intracelular. Es también de gran importancia, la retroalimentación que los productos finales de los diferentes ejes endócrinos ejercen sobre el hipotálamo y la hipófisis.

En este trabajo, estudiamos el efecto de las hormonas tiroideas sobre la degradación del TRH como un posible evento involucrado en la regulación de la actividad del péptido. De las enzimas que específicamente degradan al TRH la enzima membranal, piroglutamato aminopeptidasa II (PGA II) y la tiroliberinasas sérica se incrementan cuando existen niveles altos de hormonas tiroideas circulantes. Este es un efecto específico ya que se observa únicamente en el órgano blanco del TRH, la adenohipófisis.

Se estudió el efecto de las neurohormonas hipotalámicas involucradas en la secreción de tirotropina (TSH) o prolactina (PRL): TRH, angiotensina II (AII), y dopamina (DA) sobre la actividad enzimática en cultivos de células hipofisarias. El TRH y el agonista dopaminérgico bromocriptina (BC) disminuyeron la actividad de la PGA II; este efecto podría estar mediado por la cinasa C ya que de los mensajeros estudiados, solamente los tratamientos prolongados con ésteres de forbol disminuyeron la actividad enzimática. Por otro lado, el calcio y el ácido araquidónico incrementaron ligeramente la actividad de PGA II.

Diversos mensajeros intracelulares median la respuesta secretora de PRL a TRH, AII y DA. En la segunda parte de este trabajo se estudió el papel del ácido araquidónico en la secreción de la hormona. Se encontró un mecanismo generador de AA estimulable por TRH e inhibible por DA. La persistencia de estos efectos en condiciones de desensibilización de PKC y tratamiento con toxina pertussis sugiere la participación de la PLA_2 como responsable de la producción de AA. La respuesta inhibitoria de la DA sobre la secreción de PRL esta mediada por la actividad de PLC, flujos cálcicos y adenilato ciclasa (AC), sin embargo ninguno de ellos participa en el mecanismo inhibitorio de la liberación de AA.

ABSTRACT

The hypothalamus controls adeno-hypophyseal activity by secreting substances to the portal blood that activate hypophyseal receptors and cellular activity. An adequate inter and intracellular communication is required for the neuroendocrine system function. End products from the different endocrine axis exert feedback influence on the hypothalamus and the hypophysis. For example, thyroid hormones have multiple feedback effects on the hypothalamus-hypophysis-thyroid axis; some of which are on certain metabolic steps involved in thyrotropin releasing hormone (TRH) metabolism.

In this work we studied the effect of thyroid hormones on TRH degradation as a possible event involved in regulating this neuropeptide activity. Two specific TRH degrading enzymes, the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase II (PGA II) and serum thyroliberinase, increase their activity under high thyroid hormone levels. The response of PGA II is organ specific, only present in hypophysis, the target of TRH.

Hypothalamic effectors involved in thyrotropin (TSH) or prolactin (PRL) secretion such as TRH, angiotensin II (AII) and dopamine (DA) were studied on PGA II activity in pituitary cells cultures. TRH as well as dopamine decreased PGA II activity. This effect seems mediated by phosphokinase C (PKC) since, from all second messengers studied, phorbol esters were the only ones to inhibit PGA II. On the other hand, calcium or arachidonic acid showed a slight increase in enzyme activity.

Diverse intracellular messengers mediate PRL secretory response to TRH, A II or DA. The second part of this thesis concerns the role of arachidonic acid (AA) on prolactin secretion. TRH stimulates AA production and DA inhibits it. PKC desensitization or pertussis toxin treatment to the cells do not alter AA response suggesting the involvement of phospholipase A₂ in AA production. DA inhibition of PRL secretion is mediated by PLC, calcium fluxes or adenylate cyclase activity, but none of this is involved in AA production.

Abreviaturas y símbolos

AA	ácido araquidónico
aa	aminoácidos
AC	adenilato ciclase
AD	adenohipófisis
Bac	bacitracina
CPHNA	inhibidor de la PGA II
D1	diestro 1
D2	diestro 2
DA	dopamina
DG	diacilglicerol
DGL	diacilglicerol lipasa
DHP	dihidropiridinas
DNA	ácido desoxiribonucleico
DKP	dicetopiperacina
FSH	hormona folículo estimulante
GC	guanilato ciclase
GH	hormona de crecimiento
GHRH	hormona liberadora de GH
IPs	fosfatos de inositol
LH	hormona luteinizante
LHRH	hormona liberadora de gonadotropinas (FSH y LH)
MGL	monoacilglicerol lipasa
OVLT	órgano vasculoso de la lámina terminalis
PA	ácido fosfatídico
PC	fosfatidilcolina
PDMK	piroglutamil diazometil cetona inhibidor de la PGA I
PE	fosfatidiletanolamina
PGA I	piroglutamato aminopeptidasa soluble
PGAI	piroglutamato amino peptidasa membranar
PL	fosfolípidos
PLA2	fosfolipasa A2
PLC	fosfolipasa C
PLD	fosfolipasa D
POMC	proopiomelanocortina
PPCE	prolilendopeptidasa
PRL	prolactina
PS	fosfatidilserina
PTX o IAP	Toxina pertussis
RKB	solución Ringer Krebs bicarbonatos
RNA	ácido ribonucleico
SRIF	hormona inhibidora de la liberación de GH
TSH	tirotropina
TRH	hormona liberadora de tirotropina
VIP	péptido intestinal vasoactivo
VSCC	canales de calcio sensibles a voltaje
ZPP	Z-Pro-Prolinal inhibidor de la PPCE

nivel de significancia estadística

*	$p < 0.05$
**	$p < 0.02$
***	$p < 0.01$
****	$p < 0.001$

PROLOGO

En organismos multicelulares existe una organización celular cuyo funcionamiento depende de una adecuada comunicación intercelular. En mamíferos esta comunicación es realizada por diferentes órganos y sistemas entre los cuales el más complejo es el sistema neuroendócrino; éste decodifica las señales internas y externas cuya resultante participa en el proceso homeostático del organismo. El hipotálamo constituye la vía final común a la que convergen y a partir de la cual se inician las señales nerviosas y hormonales que controlan el funcionamiento de la glándula hipófisis, la que a su vez, controla parte del sistema endócrino. Por todas las funciones que el hipotálamo realiza se le ha denominado transductor neuroendócrino.

La comunicación intercelular se lleva a cabo por medio de señales químicas que causan diferentes efectos en cada tipo celular. Estos eventos pueden ser desde cambios en la polaridad de la célula, hasta complejos procesos metabólicos como la activación enzimática, síntesis de proteínas, etc. La recepción de dichas señales, dependiendo de su naturaleza hidrofóbica o hidrofílica, requieren de receptores intracelulares o membranales (respectivamente) que son responsables de la decodificación y transmisión del mensaje al interior de la célula, realizando así la comunicación intracelular.

Los diversos tipos de comunicación intercelular pueden ser clasificados de acuerdo al tipo de relación que se establece entre las células: en la comunicación endócrina, los tejidos sintetizan y vierten a la circulación sus productos para que alcancen otros tejidos; en la comunicación parácrina, las células producen mensajeros que afectan la actividad de células vecinas, mientras que en la comunicación autócrina, la célula produce mensajeros que afectan su propia actividad.

La comunicación intracelular implica cambios en la actividad de los mensajeros intracelulares entre los que se encuentran el sistema adenilato ciclasa, las fosfolipasas, las cinasas dependientes de Ca^{2+} , el mismo calcio, la transmetilación de fosfolípidos, y la producción de ácido araquidónico.

El presente trabajo versa sobre un péptido hipotalámico, el TRH (hormona liberadora de tirotropina) que al interactuar con su receptor hipofisario afecta la síntesis y liberación de tirotropina así como de prolactina. El trabajo experimental está dividido en dos partes: la primera, realizada en el laboratorio de neuroendocrinología molecular del CIIGB, analiza una de las etapas del metabolismo del TRH, la degradación y como ésta, puede ser regulada por las hormonas tiroideas o bien por mensajeros intracelulares involucrados en la secreción hipofisaria; la segunda parte, realizada en la unidad 159 del INSERM Paris, consiste en el estudio de algunos factores intracelulares involucrados en la liberación de prolactina.

En la introducción se hará una revisión de la literatura conerniente al metabolismo del TRH y a la liberación de tirotropina y prolactina, extendiendose en lo que se conoce acerca de los mecanismos de comunicación intracelular. Para facilitar la lectura, la parte de metodología resultados y discusión será dividida en dos capítulos, separados de acuerdo a las partes mencionadas y se hará una discusión general.

INTRODUCCION

La actividad de un organismo es variada y sumamente compleja, entre sus diversas funciones, debe responder a cambios en el medio ambiente y a las situaciones que ponen en peligro su integridad (a través de la defensa, la huida, etc.). En respuesta a algún estímulo, el sistema a través de múltiples acciones, trata de alcanzar el estado de equilibrio en un proceso conocido como homeostásis.

Desde el punto de vista neuroendócrino, el sistema nervioso central interviene en el proceso homeostático del organismo a través de la regulación de las hormonas de la adenohipófisis. Al hipotálamo llegan señales nerviosas y hormonales cuya integración se refleja en la actividad de las neuronas hipotalámicas; éstas, sintetizan y liberan neurohormonas que alcanzan la adenohipófisis y modifican la secreción de hormonas, entre las que se encuentran: la tirotropina (TSH), la hormona luteinizante (LH), la hormona folículo estimulante (FSH), la prolactina (PRL), la hormona de crecimiento (GH) y péptidos derivados de la proopiomelanocortina (POMC).

El sistema portal hipofisario conecta el sinusoides de la adenohipófisis (AD) con el plexo capilar en la eminencia media donde se encuentran gran cantidad de terminales nerviosas que contienen diversos factores de liberación (hormona liberadora de tirotropina -TRH-, hormona liberadora de LH y FSH -LHRH-, hormona liberadora de GH -GHRH-, etc.). Este sistema de irrigación permite que los factores de liberación alcancen la adenohipófisis sin ser diluidos en la sangre periférica. Se conocen los reguladores hipotalámicos de varias hormonas hipofisarias, algunas poseen reguladores comunes y en otros casos aún se desconocen.

Las secreciones hipofisarias tienen órganos blanco, por ejemplo, para la LH y FSH la gónada; la TSH, la glándula tiroideas; ACTH, la adrenal y PRL, la glándula mamaria; la GH en cambio, no tiene un órgano blanco único sino que ejerce sus efectos a diferentes niveles en el organismo.

La mayoría de los factores de liberación (o hipofisiotrópicos) son péptidos que dentro de las neuronas hipotalámicas son producidos mediante síntesis ribosomal en el soma neuronal, transportados y almacenados en la terminal nerviosa para ser liberados por algún estímulo. Una vez liberados, viajan en el sistema portal-hipofisario y alcanzan su célula blanco; la especificidad del mensaje radica en la posesión del receptor que reconocerá a la neurohormona. La interacción de la neurohormona con su receptor membranal, provoca cambios metabólicos en la célula alterando la concentración de iones, mensajeros intracelulares o la actividad de enzimas relacionadas con los procesos de síntesis y/o secreción. La terminación del mensaje ocurre (en general) por la acción de peptidasas que específica o inespecíficamente degradan a la neurohormona.

Las hormonas de los órganos blanco, cuya liberación es controlada por las secreciones hipofisarias (estrógenos, hormonas tiroideas), ejercen a su vez un efecto de retroalimentación, tanto a nivel hipofisario como hipotalámico. Este efecto puede observarse sobre los procesos sintéticos y/o secretores, como sucede en el caso de las hormonas tiroideas en el eje hipotálamo-hipófisis-tiroideas (retroalimentación de largo alcance). También es posible que las mismas secreciones hipofisarias retroalimenten directamente la producción y/o secreción de sus factores liberadores a nivel hipotalámico (retroalimentación de corto alcance).

¿Qué es lo que regula la actividad de la neurona peptidérgica productora de una neurohormona en particular?. Por un lado las aferencias nerviosas que estimulan o inhiben su síntesis y/o liberación, por otro, los mecanismos de degradación que disminuyen su concentración. Las diferentes etapas involucradas en el metabolismo de los neuropéptidos pudieran representar puntos de regulación. A continuación se analizarán más detalladamente estos procesos para uno de los péptidos hipotalámicos, que es el objeto de esta tesis, el TRH.

1- Papel fisiológico del TRH

El TRH se encuentra en alta concentración en la sangre portal y es el estímulo más potente en la secreción de tiotropina (TSH). El tripéptido que se libera de las terminaciones nerviosas de la eminencia media en respuesta a un estímulo, es conducido por los vasos portales y estimula la síntesis y secreción de TSH y de prolactina (PRL) en la hipófisis; la TSH liberada alcanza la tiroides donde estimula la secreción de hormonas tiroideas, mientras que la PRL ejerce sus acciones sobre el proceso de la lactancia (crecimiento y diferenciación de la glándula mamaria, iniciación de la secreción de leche y mantenimiento de la lactancia).

La PRL a diferencia de otras hormonas periféricas, esta involucrada en gran variedad de acciones como: la reproducción, interacción con las hormonas esteroidales, la regulación del balance hídrico y electrolítico, el crecimiento y desarrollo. Tiene efectos sobre las estructuras del ectodermo, el metabolismo y el sistema inmune (Lamberts y col. 1990).

2- Distribución de TRH

La localización del TRH ha sido estudiada principalmente utilizando técnicas de inmunohistoquímica. El TRH se encuentra ampliamente distribuido en el cerebro y en órganos periféricos; en el hipotálamo, es la eminencia media la zona donde existe el mayor número de terminales del péptido. Se encuentra también en cerebro anterior, tallo cerebral y en el diencefalo posterior (Browntein y col. 1974, Winokur y Utiger 1974, Kizer y col. 1976). Fibras y terminales TRHérgicas se encuentran en eminencia media, área preóptica (en el órgano vasculoso de la lámina terminalis, OVL), amígdala, septo lateral, tallo cerebral inferior, neurohipófisis (Lechan y Jackson 1982, Palkovits 1984, Harkness y Brownfield 1985), asta ventral y dorsal de la médula espinal (Palkovits 1984, Harkness y Brownfield 1985). Somas TRHérgicas se han observado en el hipotálamo anterior, en los núcleos hipotalámicos paraventricular, ventromedial, supraquiasmático y supraóptico; en la médula oblongada, área preóptica, bulbo olfatorio, amígdala, sustancia gris, corteza cerebral y médula espinal (Hokfelt y col. 1978, Lechan y Jackson 1982, Johansson y col. 1983, Palkovits 1984, Lechan y col. 1985, Harkness y Brownfield 1985).

Utilizando la técnica de hibridación "in situ" y la sonda Pro-TRH DNAC para hibridizar el Pro-ARNm se ha obtenido información concerniente a la localización de la zona que delimita a la neurona TRHérgica: El núcleo paraventricular (PVN) contiene un gran número de células positivas distribuidas en una configuración triangular en los límites dorsales del tercer ventrículo; la región parvocelular media parece contener mayor número de células positivas que la región parvocelular anterior (Lee y

col. 1989), zona en la que Nishiyama y col. 1985 han observado cambios morfológicos estudiando animales hipotiroides.

En cuanto a la distribución subcelular, se sabe que un alto porcentaje de TRH tanto hipotalámico como extrahipotalámico se encuentra localizado en vesículas sinápticas dentro de la terminal nerviosa (Barnea y col. 1976, Winokur y col. 1977, Johansson y col. 1983).

La distribución del TRH en zonas no relacionadas con su actividad hipofisiotrófica y su localización principalmente en las terminaciones nerviosas ha llevado a proponer que el péptido no solo actúa como hormona cuyo órgano blanco es la adenohipófisis, sino también como neurotransmisor.

3- Biosíntesis de TRH

El TRH es sintetizado a través de un precursor proteico de 225 aminoácidos (aa) cuya secuencia ha sido deducida de la secuencia nucleotídica del DNAC (29.2 kDa). Esta proteína tiene una secuencia líder característica de proteínas secretadas y cinco copias de la secuencia del precursor de TRH, Gln-His-Pro-Gly, flanqueado por pares de aminoácidos básicos (Lechan y col. 1986). La unidad de transcripción del TRH contiene 2.6 Kb, incluye tres exones interrumpidos por dos intrones: el exon uno codifica para la región 5' no traducida del RNAm, el exon dos, la secuencia señal y la mayoría del péptido amino-terminal y el exon tres, el resto de la porción amino-terminal, las cinco copias de TRH y la región carboxi-terminal del péptido. En la región 5' del gen de TRH se encuentran presentes la región promotora y reguladora. La secuencia consenso TATA se encuentra a 28 bases del sitio de iniciación o sitio cap; la secuencia entre -196 y -203 pb (pares de bases) del sitio cap es idéntica a la región consenso propuesta para la unión del receptor de glucocorticoides. La región rica en GC de -111 a -120 pb contiene el hexanucleótido GGGCGG característico de la región de unión del factor de transcripción Sp-1 (que junto con la proteína fos activa genes tras la activación de la PKC) (Curran y Franza 1988). Finalmente existe una secuencia de 10 pb en el lado 5' terminal del gen de TRH (y en el gen de TSH subunidad beta), cuyas cinco primeras bases son homólogas con una porción del receptor a T3 de placenta, c-erb A; en base a estas observaciones es posible que esta secuencia este involucrada en la regulación de estos genes por hormonas tiroideas (Lee y col. 1989).

El precursor del TRH es procesado postraduccionalmente en las secuencias dibásicas (lys-arg, arg-arg) reconocidas por enzimas del tipo quimotripsina (convertasas) y por carboxipeptidasas que cortan los aminoácidos básicos, generando la secuencia Gln-His-Pro-Gli que por la acción de una enzima, forma un heterociclo en la molécula del Gln (Mains y col. 1990); el lado carboxilo terminal de la prolina, es amidado por la peptidil glicina monooxigenasa alfa-amidante (PAM) utilizando el grupo amino de la glicina (Eipper y col. 1985). Estas reacciones conducen a la obtención del péptido maduro (TRH). Existen otras formas de procesamiento que producen péptidos cuya función biológica es aún desconocida (Cockle y Smyth 1988).

La biosíntesis del TRH comprende varias etapas, hasta este momento las evidencias sugieren que la transcripción del gen así como el procesamiento del precursor estarían sujetas a regulación.

3.1- Regulación de la biosíntesis de TRH

La cantidad del péptido en la terminal nerviosa es el resultado de diferentes eventos metabólicos (síntesis, transporte y procesamiento del precursor, liberación y degradación), de tal suerte que la determinación de la cantidad del péptido maduro no refleja únicamente la actividad sintética de la célula. Por esta razón, el estudio de la retroalimentación de las hormonas tiroideas sobre la biosíntesis, evaluado por la cuantificación del péptido en el hipotálamo ha dado resultados contradictorios (Childs y col. 1981, Mori y Yamada 1987, Kardon y col. 1977).

Cuantificando RNAm del precursor de TRH mediante la técnica de hibridización "in situ", fué posible obtener resultados más reproducibles: en animales hipotiroideos, la concentración de ProTRH-RNAm se incrementa al doble en la región que circunscribe al núcleo paraventricular y este evento no parece estar mediado por el aumento en los niveles de TSH ya que también se observa en animales hipofisectomizados. El incremento en ProTRH-RNAm se observa en la zona de las neuronas del núcleo parvocelular medio y no se observa en otra región del hipotálamo, lo que sugiere que las hormonas tiroideas ejercen una retroalimentación negativa sobre las neuronas TRHérgicas tuberoinfundibulares del núcleo paraventricular (Segerson y col. 1987).

El ciclo circadiano observado en la secreción de TSH (Jordan y col. 1980), sugirió la posibilidad de que su hormona liberadora (TRH) se secrete también de manera cíclica. El estudio de la regulación de la tasa biosintética del péptido durante la ontogenia y el ciclo circadiano sugiere que el nivel de péptido (TRH) está determinado principalmente por el nivel de su RNAm por regulación a nivel transcripcional (o estabilidad del RNAm). Por la coincidencia en los niveles de RNAm a TRH, de TRH en hipotálamo así como de TSH en sangre durante el ciclo luz-obscuridad y el desarrollo postnatal se propone que la síntesis y la liberación son procesos acoplados (Covarruvias y col. 1988 y en preparación).

Durante la lactancia y el ciclo estral (en el día del proestro) se observan patrones de secreción de PRL y se ha propuesto al TRH como responsable de este efecto. El análisis del RNAm de TRH en estas condiciones fisiológicas ponen en evidencia la existencia de elementos de regulación de la actividad sintética de la célula productora del péptido. Durante el ciclo estral, el nivel de mensajero es más alto durante el diestro 2 (D2), mientras que el contenido del péptido en sangre portal es mayor en la tarde del proestro que precede al incremento de PRL en ese mismo día del ciclo estral (Fink y col. 1982, Uribe y col. sometido). Durante la preñez y la lactancia la mayor cantidad de mensajero se encuentra al final de la preñez e inicio de la lactancia y disminuye hacia el quinto día para después permanecer constante mientras que, el contenido de péptido en el hipotálamo medio basal disminuye el primer día de lactancia y se recupera a lo largo de la misma para volver a caer al momento del destete (Uribe y col. sometido).

Estos resultados sugieren que no solo la transcripción del gen de TRH o la estabilidad de su RNAm esta sujeto a regulación, posiblemente también el procesamiento. Además, la neurona TRHérgica responde a cambios hormonales ligados con la función hipofisaria (liberación de prolactina)

4- Liberación de TRH

El TRH, así como otros péptidos hipofisiotróficos que alcanzan la adenohipófisis, se libera de las terminales localizadas en la eminencia media a la sangre portal donde viaja hasta la adenohipófisis y afecta la actividad de las células blanco.

El TRH se libera de las terminaciones nerviosas hipotalámicas por un mecanismo dependiente de calcio en respuesta a un estímulo despolarizante (Joseph-Bravo y col. 1979, Maeda y Frohman 1980, Warlberg 1982, Méndez y col. 1987) y de fragmentos de hipotálamo, por histamina vía su receptor H2 (Charli y col. 1978, Joseph-Bravo y col. 1979, Bennet 1981). Las neuronas noradrenérgicas ejercen una influencia estimulante sobre la secreción de TSH aparentemente incrementando la síntesis y/o liberación de TRH hipotalámico. No es claro el mecanismo por el cual la noradrenalina estimula la secreción de TRH-TSH pero dado que las terminales aferentes hipotalámicas no forman verdaderas sinapsis con las neuronas, es posible que la noradrenalina actúe como neuromodulador de la actividad de otros compuestos sobre las neuronas TRHérgicas (Nishiyama y col. 1985). La liberación del TRH es inhibida probablemente por la DA in vitro (Joseph-Bravo y col. 1979) e in vivo (Tuomisto y col. 1985), por el SRIF (Hirooka y col. 1978) y por los péptidos opiáceos (Jordan y col. 1986).

La DA inhibe la secreción basal y estimulada por TRH de TSH (Foord y col. 1986) así como el incremento en TSH provocado por tiroidectomía; la bromocriptina, un análogo dopaminérgico, inhibe el incremento provocado por el frío. Estas observaciones apoyan la proposición de la DA como un inhibidor de la secreción de TRH y/o de la liberación de TSH a nivel hipofisario (Simpkins y col. 1982).

La DA inhibe la secreción de PRL basal y estimulada por TRH (MacLeod y col. 1974, Fagin y col. 1982); péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Enjalbert y col. 1980); angiotensina II (AII) (Enjalbert y col. 1986); y neurotensina (NT) (Memo y col. 1986).

Aunque se conoce el efecto de las hormonas tiroideas sobre el nivel de RNAm de TRH, no se sabe si ellas afectan la liberación del péptido. En condiciones de estrés por frío, se produce un incremento en el nivel de TRH, TSH y hormonas tiroideas, evento en el que se propone la participación catecolaminérgica (Arancibia y col. 1983).

El análisis de los neurotransmisores que controlan la liberación del TRH es sumamente complejo, ya que ésta depende del modelo y la preparación utilizada. Quizá cada neurotransmisor es capaz de liberar diferente cantidad de péptido alcanzando pozas diferentes cuya disponibilidad en TRH sea determinado por eventos como por ejemplo el estado tiroideo. Otra posibilidad es que dependiendo del estímulo (estrés por frío, ciclo circadiano, ciclo estral) la vía neuronal y por lo tanto el neurotransmisor involucrado responsable de la liberación varía (Kordon y col. 1976)

5- Degradación del TRH

El mensaje que una molécula-señal lleva de un lugar a otro, es recibido y la información procesada de acuerdo a las características del receptor; en este momento la secuencia de eventos metabólicos continúa y

la molécula señal termina su acción.

Los neurotransmisores clásicos, tienen mecanismos para terminar con su actividad, tales como la difusión, la recaptura y la degradación enzimática. Esta última parece ser el proceso responsable de la inactivación del TRH.

En la hipófisis se han descrito fenómenos de internalización para el TRH y la LHRH en células normales (Morel y col. 1985, Duello y col 1983) y en células tumorales GH3 para el TRH (Brunet y col. 1974); con respecto a la captura como mecanismo inactivador, se encontró un mecanismo de "acumulación" para el TRH en rebanadas de cerebelo (Pacheco y col. 1981) y de hipotálamo (Charli y col. 1984), sin embargo la baja velocidad de este mecanismo cuestiona su relevancia en el fenómeno de inactivación.

Se han caracterizado dos enzimas solubles que degradan al TRH: La piroglutamato amino peptidasa I (PGA I) (E.C. 3.4.19.3.) y la prolilendopeptidasa (PPCE) (E.C.3.4.21.26), (Fig 5).

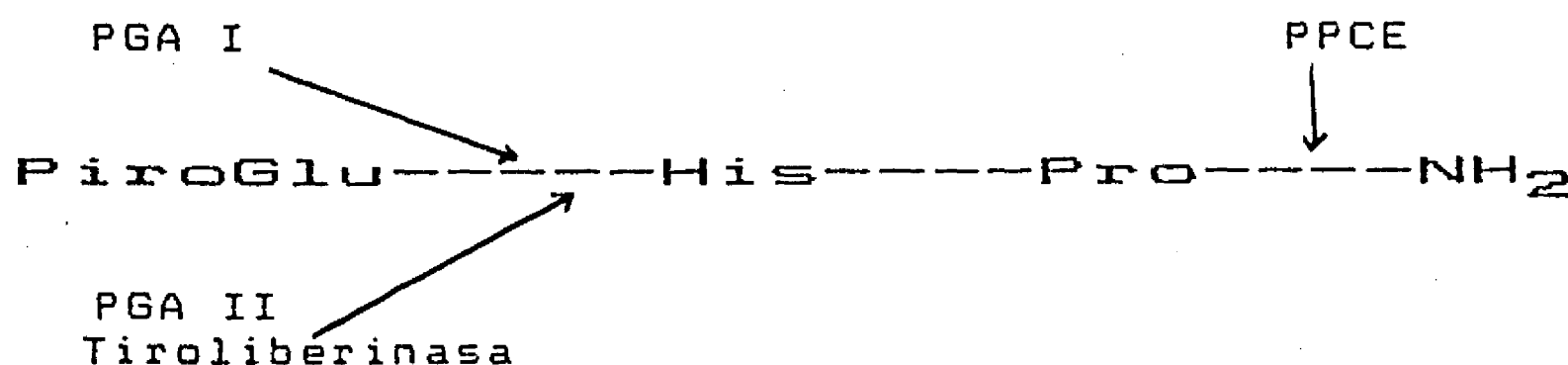


Fig 5. Degradación primaria del TRH. PGA-piroglutamato amino peptidasa: I-enzima soluble, II enzima membranal; PPCE-prolilendopeptidasa; Tiroliberinasa-enzima sérica.

La PGA I es una enzima sensible a los agentes que reaccionan con los grupos sulfhidrilo; ha sido aislada de hipófisis de rata (Bauer y Kleinkauf 1980) y de cerebro de cuyo (Browne y O'Cuinn 1983) y posee bajo peso molecular (28000d). Esta enzima hidroliza a otros péptidos que poseen como residuo N-terminal al piroglutamato entre los que podemos citar: LHRH, neurotensina y bombesina. Su distribución en el cerebro es muy homogénea (Friedman y col. 1985, Suen y Wilk 1989).

La PPCE es una serin proteasa sensible a agentes que reaccionan con grupos sulfhidrilo (Browne y O'Cuinn 1983, Wilk 1983) y posee un peso molecular de 77000d. Esta enzima hidroliza péptidos como el LHRH, Neurotensina, Bradikinina, Angiotensina II y puede ser inhibida "in vitro" por bacitracina.

Ambas enzimas solubles se encuentran en baja proporción en la terminal nerviosa (menos del 10% del total) donde se encuentra una alta concentración de TRH (Joseph-Bravo y col. 1979, Torres y col. 1986); la administración in vivo de inhibidores de las enzimas solubles no cambian el contenido hipotalámico del péptido ni la liberación del mismo en condiciones basales o tras estimulación con K⁺ (Charli y col. 1987). Estas enzimas no parecen ser liberadas al medio extracelular (Faivre-Bauman y col. 1986, Mendez 1989) por lo que es posible suponer que

Bauman y col. 1986, Mendez 1989) por lo que es posible suponer que ellas no participan en la regulación de la concentración del péptido intracelular (en la terminal nerviosa) o una vez que el péptido ha sido liberado.

El metabolito His-Pro-NH₂ generado por la acción de la PGA sobre el TRH, puede ser degradado a His-Pro (Bauer y Kleinkauf 1980, Browne y O'Cuinn 1983) por una enzima lisosomal, por lo que es probable que ésta sea liberada durante la preparación de la fracción a ensayar. Por otro lado, el His-Pro-NH₂ puede formar un heterociclo (de manera no enzimática), el His-Pro-dicetopiperacina (DKP), metabolito que inhibe la liberación de PRL in vivo e in vitro (Brabant y col. 1981, Enjalbert y col. 1979).

Además de las enzimas solubles que se encuentran en la terminal nerviosa, cuya participación en la regulación del nivel del péptido ha sido descartada, existen mecanismos en membranas de cerebro y otros órganos y en el suero que inactivan al péptido una vez que éste es liberado.

Tiroliberinasa

La tiroliberinasa es una metaloenzima que posee actividad de piroglutamato aminopeptidasa (PGA) que se encuentra en el suero (Taylor y Dixon 1978, Bauer y Novak 1979, Bauer y col. 1981); a diferencia de la PGA citosólica, posee un alto peso molecular (280000d), se inhibe por DTT y EDTA pero su actividad no se afecta por los agentes que modifican los grupos -SH. Esta enzima posee una alta especificidad de sustrato y no degrada otros péptidos que poseen el piro-glu-X como el LHRH.

Piroglutamato aminopeptidasa II -PGA II- (E.C.3.4.19._)

Browne y col 1981 mostraron la existencia de una actividad de PGA soluble que requiere DTT y EDTA para su expresión (PGA I) y otra actividad particulada inhibida por EDTA en el cerebro de cuyo (PGA II). La actividad de PGA II fué posteriormente encontrada en membranas de sinaptosomas de cuyo (O'Connor y O'Cuinn 1984), así como en la fracción particulada del cerebro de rata, en los sinaptosomas (Garat y col 1985, Torres y col. 1986) y en la adenohipófisis (Bauer 1987). Esta enzima posee mayor especificidad de sustrato que la PGA I (O'Connor y O'Cuinn 1985, Elmore y col 1989); es inhibida por el LHRH y aunque no lo degrada, la enzima es mucho más afin por el decapeptido que por el TRH (Ki LHRH 20 uM; TRH 42 uM).

En el cerebro, la PGA II se encuentra como una ectoenzima (Charli y col. 1988), restringida a las células neuronales y no a las gliales (Bauer y col. 1988, Cruz y col. 1990); su actividad específica en cerebro completo es cuatro veces mayor que para el pulmón o el suero. Su distribución en el cerebro es mucho más variable que para la PGA I (Friedman y Wilk 1986) aunque su localización no coincide con la distribución del péptido ni con la de sus receptores (Vargas y col. 1987, Martino y col. 1980, Taylor y Burt 1982).

La actividad de la PGA II parece tener mayor importancia en la regulación de la concentración de péptido liberado a nivel de las

terminaciones nerviosas del hipotálamo, ya que su inhibición con el LHRH o con un inhibidor específico (CPHNA sintetizado en el laboratorio del Dr S. Wilk) incrementan el nivel de TRH liberado de rebanadas de hipotálamo medio basal (Charli y col. 1989).

Una vez liberado el TRH y antes de difundir hacia la sangre portal, enfrenta en primer lugar la acción de la PGA II (de la membrana de la terminal nerviosa) y en segundo lugar la de la tiroliberinasa sérica, de tal manera que durante el transporte del TRH hacia la hipófisis, la cantidad de péptido activo podría disminuir considerablemente. La degradación del TRH puede generar metabolitos cuya actividad biológica es contraria a la del péptido original en cuanto a la secreción de PRL (Erabant y col. 1981, Enjalbert y col. 1979).

5.1- Regulación de la degradación de TRH

Se ha investigado si la retroalimentación que las hormonas tiroideas ejercen a nivel hipofisario e hipotalámico modulando la actividad del TRH, pudiera ser un evento regulable en relación a la inactivación del péptido.

La actividad de la tiroliberinasa cambia en relación directa al estado funcional tiroideo, se incrementa durante el hipertiroidismo y disminuye en la condición contraria (White y col. 1976, Bauer 1976, Dupont y col. 1976). Además existen también diferencias debidas al sexo ya que la actividad en hembras eutiroides es menor que en los machos (Bauer 1976).

La actividad de la PGA I se incrementa por T3 en células tumorales GH3 (Suen y Wilk 1987). En la adenohipófisis, la PGA I (enzima soluble) participaría en la degradación del TRH que ya ha interactuado con su receptor (la enzima no se secreta) por lo que la importancia de esta actividad enzimática quedaría restringida a la "eliminación" del péptido que ya ha ejercido su acción. Suen y Wilk 1989 han reportado incrementos en la actividad de la PGA I en hipotálamo, hipocampo, tálamo, bulbo olfatorio y adenohipófisis tras administración de grandes dosis de T3.

Existen otras enzimas cuya actividad cambia de acuerdo al estado tiroideo; por ejemplo, la piruvato carboxilasa en hígado (Weinberg y Utter 1979) y la enzima málica en células de embrión de pollo (Goodridge y Adelman 1976) incrementan en condiciones de hipertiroidismo. En líneas celulares de neuroblastoma, algunas enzimas involucradas en el metabolismo de las catecolaminas (la tirosinohidroxilasa y la monoaminooxidasa A) disminuyen su actividad durante el hipotiroidismo (Safei y Timiras 1985). En células fetales de cerebro de ratón la actividad de la dipeptidil peptidasa I se incrementa en condiciones de hipotiroidismo mientras que la enzima que convierte a la angiotensina disminuye cuando T3 esta presente en el medio (Davis y Pieringer 1987). No es claro si estos cambios estan relacionados a un efecto específico sobre las neuronas productoras de neurotransmisores o son cambios metabólicos generalizados; tampoco es evidente que ellos esten involucrados en el control de la actividad de las neuronas relacionadas con la neurona TRHérgica.

6- Control de la secreción hipofisaria

Los lóbulos anterior y posterior y en algunas especies, el intermedio constituyen la hipófisis; la hipófisis anterior o adenohipófisis esta compuesta por diferentes tipos celulares productores de hormonas que controlan diversas funciones del organismo como el crecimiento, la lactancia, la reproducción, etc. Las células hipofisarias se han clasificado de acuerdo a la familia de hormonas que producen: los lactotropos, prolactina (PRL); los somatotropos, hormona de crecimiento (GH); los tiotropos, tiotropina (TSH); los gonadotropos, hormona foliculo estimulante y hormona luteinizante (FSH y LH) y los corticotropos, péptidos derivados de POMC (ACTH, LPH y endorfinas).

El principal aporte sanguíneo de la adenohipófisis proviene del sistema porta-hipofisario, esta sangre transporta los diferentes factores hipotalámicos. La adenohipófisis recibe flujo sanguíneo proveniente del lóbulo posterior; este lóbulo esta constituido por terminales nerviosas de los núcleos supraóptico, paraventricular y supraquiasmático y liberan a la circulación general hormonas como la oxitocina y la vasopresina. En el lóbulo posterior se encuentran otros compuestos como la dopamina (DA), la serotonina (5HT) así como péptidos opiáceos como la leu-encefalina.

En la hipófisis anterior, la PRL es controlada por diferentes factores hipotalámicos (Enjalbert y col. 1984, Weiner y col. 1988, Lamberts 1988). Entre los factores estimulantes de la secreción se encuentra el TRH (Tashjian y col. 1971), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (Ruberg y col. 1978, Enjalbert y col. 1980), la angiotensina II (AII) (Steele y col. 1981) y la neurotensina (Enjalbert y col. 1982, Memo y col. 1986). Por otro lado podemos citar entre los inhibidores, el fisiológicamente más importante: la dopamina (MacLeod y col. 1974), el SRIF (Vale y col. 1974, Lamberts y col. 1988), la noradrenalina (NA), el ácido gamma amino butírico (GABA) y la acetilcolina (Martin y col. 1978, Rudnick y col. 1981, Beach y col. 1988); finalmente cabe señalar que uno de los metabolitos del TRH (His-Pro-dicetopiperacina) puede también inhibir la secreción de la PRL tanto in vivo (Brabant y col. 1981) como in vitro (Enjalbert y col. 1979).

Los diferentes factores hipotalámicos pueden afectar la secreción de acuerdo al balance de sus efectos individuales, por ejemplo, la DA inhibe la secreción de PRL inducida por TRH (Fagin y col. 1982), por VIP (Enjalbert y col. 1980), por la AII (Enjalbert y col. 1986) y por la neurotensina (Memo y col. 1986). Los opiáceos bloquean el efecto de la dopamina sobre la secreción de la PRL sin afectar la secreción basal (Enjalbert y col. 1979). El SRIF inhibe la secreción de PRL inducida por VIP o por TRH (Enjalbert y col. 1982).

A nivel de la hipófisis existen sistemas de regulación entre los diferentes tipos celulares (efecto paracrino): por ejemplo, la estimulación de la secreción de PRL por hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) es evidenciada cuando se cocultivan lactotropos con gonadotropos (Denef y col. 1981, 1983, 1984) mientras que con AII (angiotensina II) se incrementa cuando en el cultivo hay gonadotropos y /o tiotropos (Denef 1986, Denef y col. 1985, 1986). Sobre la secreción de PRL actúan VIP (péptido intestinal vasoactivo) y SP (substancia P), mismos que se producen en el lactotropo; este efecto es un ejemplo de la comunicación autocrina (Deschepper y col. 1986, Jones y col. 1988, Baes y col. 1987, Denef y col. 1988, Carmeliet y col. al 1988). Las células foliculoestelares -no secretoras- (Baes y col. 1987, Findell y

col 1988), así como los factores de crecimiento liberados a nivel hipofisario tienen posiblemente un papel regulatorio (Brockes y col 1980, Baird y col 1985, Zeytin y col 1988).

La reactividad de la hipófisis es afectada también por las hormonas de los órganos blanco; el 17 β -estradiol afecta la respuesta de los lactotrofos al TRH (Gershengorn y col. 1979), a la DA (Raymond y col. 1978, West y Dannies 1980, Eörgundvaag y George 1988, Munemura y col. 1989, Maus y col. 1989) y al SRIF (Kimura y col. 1986). Las hormonas tiroideas afectan la sensibilidad de los tirotrofos al TRH (De Lean y col. 1977), a la DA (Foord y col. 1984) y también al SRIF (Lamberts y col. 1988).

La respuesta secretora de la hipófisis implica eventos mucho más complejos que la sumatoria de estímulos e inhibiciones, tal es el caso de la secreción de PRL en la que participan varios efectores hipotalámicos afectando diferentes vías de comunicación intracelular (Lamberts y col. 1990). Martínez de la Escalera y col. 1988 muestran que quitar el tono inhibitorio dopaminérgico a los lactotrofos, es suficiente para observar incremento en la actividad de dos de los mensajeros intracelulares que median la respuesta de DA, la adenilato ciclasa y el metabolismo de fosfolípidos. En seguida, ya que la reactividad del lactotrofo puede ser afectada por hormonas periféricas, los patrones de secreción de éstas (durante la lactancia, ciclo estral) repercutirá en la secreción de PRL.

7- Mecanismo de acción de los factores hipotalámicos

El inicio de la transmisión del mensaje que portan las hormonas hipotalámicas (primer mensajero, ligando) ocurre al interactuar con sus receptores sobre la membrana plasmática de la célula hipofisaria; tal interacción provoca cambios en el metabolismo de biomoléculas (o en la concentración de iones) que se han denominado segundos mensajeros; éstos son responsables de la amplificación del mensaje dentro de la célula.

La interacción ligando-receptor, genera señales intracelulares principalmente de dos maneras: la primera es la activación o inactivación de enzimas asociadas a la membrana, generadoras de señales intracelulares solubles que median la respuesta celular; en otros casos el ligando estimula la actividad enzimática (cinasa) del receptor. La segunda, es a través de la apertura (o cierre) de canales iónicos lo que provoca cambios ligeros y rápidos en el flujo de los iones alterando brevemente el voltaje a través de la membrana plasmática o provoca la entrada de iones en mayor proporción iniciando así la señal intracelular. En algunos casos el receptor está asociado (no covalentemente) al efector generador de segundos mensajeros por medio de una proteína de acoplamiento (Berridge 1985); los sistemas efectores amplifican la señal activando sistemas enzimáticos que concluyen con la respuesta celular. La fosforilación de proteínas parece la vía final común a múltiples factores de regulación de la respuesta celular (Lohmann 1984, Nishizuka 1984).

7.1-Los receptores involucrados

Los receptores de moléculas hidrofílicas son proteínas integradas en la

membrana, de número variable, cuya localización puede ser difusa o restringida a determinada región sobre la membrana plasmática. Para la mayoría de las neurohormonas, sus receptores han sido caracterizados a partir de membranas de adenomas, líneas tumorales o hipófisis entera. Existen receptores a TRH en los lactotrofos y tirotrofos (Grant y col. 1972, Labrie y col. 1972, Foord y col. 1983, Wilber y Seibel 1973) cuyas características bioquímicas son similares a las de los receptores de alta afinidad encontrados en el cerebro (Taylor y Burt 1982, Ogawa y col. 1982, Rostene y col. 1984). En la hipófisis existen receptores para AII (Hauger y col. 1982) y DA (Caron y col. 1978, Cronin y col. 1978); Los receptores dopaminérgicos se encuentran sobre los lactotrofos (Kebabian y col. 1979, Caron y col. 1978, Enjalbert y col. 1983), así como sobre las células a TSH (Foord y col. 1983, 1986).

7.2- Proteínas de acoplamiento

Las proteínas que unen nucleótidos de guanidina se denominan proteínas G o N, se han encontrado como intermediarias en la relación entre el receptor y el efector. Son una familia de proteínas cuyas funciones son muy diversas. Las proteínas G fueron descritas inicialmente para el sistema efector adenilato ciclasa y dependiendo del efecto final (estimulación o inhibición) fueron denominadas Gs (estimulante) o Gi (inhibitoria). En seguida, se encontraron proteínas G asociadas a otros efectores como las fosfolipasas C y A2 (Gp), la fosfodiesterasa específica de GMPC así como asociadas a algunos canales iónicos (Sasaki y Sato 1987, Yatani y col. 1987 a,b, Neer y Clapham 1988r, Axelrod y col. 1988r), la transducina (Gt) que media la transducción de señales luminosas en la retina (Lochrie y col. 1985) y G olf que media la transducción de señales olfatorias en las neuronas bipolares olfatorias (Jones y Reed 1989).

Existen en el cerebro y en menor cantidad en la hipófisis, las llamadas alfa o (Go) cuya función aún no es clara; en el cerebro podría estar implicada en la regulación de la actividad de los canales de calcio (Hescheler y col. 1988r).

Las proteínas G son heterotrimeros cuyas subunidades caracterizadas se denominan alfa, beta, gamma; las subunidades beta y gamma parecerían comunes a diferentes proteínas, siendo la subunidad alfa, la específica. Esta subunidad alfa posee un sitio de unión para el GTP y también posee actividad GTPásica sensible al Mg^{2+} (Birnbaumer 1990).

La unión del ligando a su receptor es seguida por la activación de la proteína G, su actividad es regulada de manera cíclica por la asociación de GTP a la subunidad alfa, la hidrólisis de GTP en GDP y Pi y la disociación del GDP. Con la unión del GTP y la activación de la proteína G se activa el efector correspondiente. La unión del ligando a su receptor y la interacción ligando-receptor con la proteína G provoca la disociación de la subunidad alfa de beta-gamma lo que provoca un cambio en la afinidad del receptor (de alta a baja afinidad) y estimula la activación de alfa tras asociación al GTP, esta es la forma activa capaz de asociarse al efector. La relajación del sistema se produce tras la hidrólisis del GTP, la disociación de la subunidad alfa del efector y la reasociación de las subunidades α , β y γ que provoca el regreso a una forma de alta afinidad del receptor (Birnbaumer 1990) (fig 1).

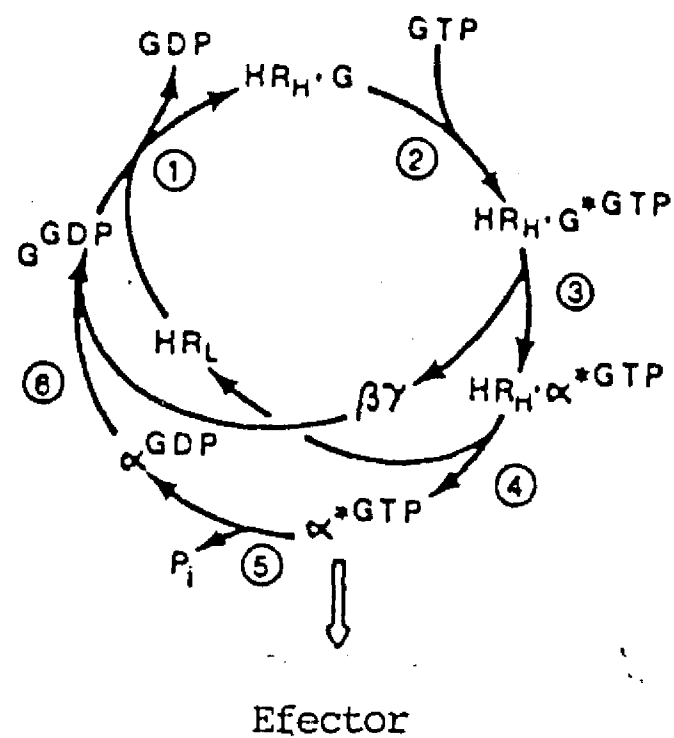


Fig. 1 Activación de proteínas G mediada por receptor; el papel de los receptores es promover el intercambio nucleotídico y estabilizar la forma activada dependiente de GTP. La proteína G sufre reacciones de disociación-reasociación y oscila entre diferentes estados de asociación a: GDP, libre de nucleótido y GTP. El receptor posee alta afinidad por el agonista (R_H) cuando está asociado con la forma trimérica $\alpha\beta\gamma$ libre de nucleótido de la proteína G y tiene baja afinidad por el agonista (R_L) cuando éste se encuentra libre. Posteriormente el receptor tiene mayor afinidad por la forma trimérica $\alpha\beta\gamma$ de G que por G-GDP. El dímero $\beta\gamma$ se requiere para la interacción de α con R, después de la formación de G-GTP no hay formación de G^* . En este momento, el receptor posee mayor afinidad por G^* -GTP que por la proteína G libre de nucleótido. Como consecuencia la disociación del receptor es dependiente de la reacción 3 (disociación de las subunidades). Mediante la reacción 4, α^* GTP pierde su capacidad para permanecer asociado con el receptor y se disocia en α^* GTP activado más el receptor libre; razón por la cual en condiciones de saturación de GTP y hormona, solamente una pequeña proporción de receptores se encuentra en estado de alta afinidad asociado a la proteína G. El ciclo de la proteína G es conducido no solo por el ciclo de la GTPasa sino también por la reacción de disociación de las subunidades. Se asume que las reacciones 1, 2 y 3 son reversibles (tomado de Birnbaumer 1990).

Existen otros 4 tipos diferentes de subunidades alfa s. Una alfa p asociada a la activación de la fosfolipasa C y de la fosfolipasa A2. En el campo de las alfa inhibitorias, se han caracterizado 4 alfa i : alfa i-1 (41 kD), alfa o (39 kD), alfa i-2 y alfa i-3 (ésta última correspondería a G alfa k asociada a la conductancia de k+ en el corazón (Sakasi y Sato 1987)). En la hipófisis anterior de la rata se han caracterizado 3 diferentes alfa i que son sustrato de la toxina Pertussis: alfa i de 39 kD, alfa i de 41 kD y alfa i de 40 kD.

La toxina Pertussis (de Bordetella pertussis, PTX o IAP) y la del cólera (Vibrión del cólera CT) han sido de gran utilidad en la caracterización y estudio de las proteínas G. Estas toxinas provocan la ADP-ribosilación de la subunidad alfa: la toxina del cólera activa alfa s lo que conduce a la activación del efector; mientras que la toxina pertussis bloquea el acoplamiento entre Gi, Go y los receptores (Ui y col. 1988r, Birnbaumer 1990) bloqueando la inhibición. El resultado de la actividad de una u otra toxina es el mismo: la activación del efector.

7.3- Los sistemas efectores

Los receptores se encuentran asociados a los sistemas de transducción de la información (generadores de señales intracelulares) que amplifican la señal transmitida por el ligando (efector). Existen varios mecanismos de transducción descritos a la fecha, entre los que se encuentran la producción de nucleótidos cíclicos por medio de la adenilato ciclasa (AC) y la guanilato ciclasa (GC), que median una gran cantidad de respuestas biológicas.

La categoría correspondiente a los fosfolípidos incluye el metabolismo de fosfoinositoles (IPs) por la fosfolipasa C (PLC), la producción de ácido araquidónico (AA) ya sea por la acción de la PLC y la diacilglicerol lipasa (DGL) o directamente por acción de la fosfolipasa A2 (PLA2) sobre una variedad de fosfolípidos (PL). El AA es metabolizado por enzimas intracelulares y algunos de sus productos poseen actividad biológica. En la misma categoría se encuentra la metilación de fosfolípidos y el metabolismo de la fosfatidilcolina (PC).

El calcio proveniente de reservorios intracelulares o del medio extracelular ha sido ampliamente involucrado en las respuestas biológicas relacionadas a los mecanismos de contracción muscular y secreción. Su mecanismo de acción implica cinasas dependientes de calcio o su acción como cofactor induciendo cambios conformacionales de las proteínas lo que activa algunas enzimas.

7.3.1- Producción de nucleótidos cíclicos

El sistema adenilato ciclasa (AC) esta compuesto de 3 subunidades: el receptor que une específicamente al agonista, una proteína G (inhibidora o estimulante) que acopla al receptor con su efector y la enzima misma que cataliza la formación de AMPc a partir de ATP-Mg2+. El AMPc se fija

a la subunidad reguladora de una proteína cinasa A (PKA) dependiente del nucleótido cíclico, la subunidad catalítica de esta cinasa fosforila proteínas involucradas en la respuesta biológica (fig 2). El nivel de AMPc en la célula depende de dos actividades: la actividad de la AC generadora de AMPc y la actividad de la fosfodiesterasa que lo degrada.

En la hipófisis existen acoplamientos de tipo estimulatorio con la AC: del VIP (Gourdjy y col. 1979), del CRF (Aguilera y col. 1983), del GRF (Harwood y col. 1984, Labrie y col. 1983) y de tipo inhibitorio con la AII (Marie y col. 1985), la DA (Tam y col. 1981, Enjalbert y col. 1983) y el SRIF (Dorflinger y col. 1983)

El GMPc se sintetiza a partir de GTP y es responsable de la fosforilación de proteínas cuya función no esta muy bien definida; su actividad no esta asociada a la activación de algún receptor, sino que es paralela a la estimulación de la hidrólisis de fosfolípidos, ya sea por la PLC o por la PLA2. El GMPc activa a la cinasa G que fosforila proteínas relacionadas con la respuesta celular (Corbin y col. 1988r); se ha sugerido que el producto de reacción participa en la regulación de corrientes cálcicas (Hartzell y Fischmeister 1986). En cultivos de astrocitoma, el péptido atrial natriurético incrementa la cantidad de GMPc y este efecto esta directamente relacionado con la activación de receptor (Lyall y col. 1988).

La enzima guanilato ciclasa (GC) es activada por ácidos grasos insaturados como el AA (Asakawa y col. 1978). En células de neuroblastoma, la activación del receptor histaminérgico 1 (H1) estimula la producción de GMPc (efecto mediado por los metabolitos del AA de la vía lipoxigenasa) (Snider y col. 1984).

7.3.2- Metabolismo de fosfolípidos

La fosfolipasa C (PLC), teniendo como sustrato al fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), genera diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El IP3 y los otros fosfatos de inositol son degradados hasta inositol que es reutilizado para la síntesis de fosfoinositoles; el IP3 puede también ser fosforilado para formar IP4, IP5, IP6 (Rajendra y Lowell 1990). El DG es hidrolizado por la diacilglicerol y en seguida por la monoacilglicerol lipasas (DGL y MGL) liberando ácidos grasos; puede ser fosforilado por la DGcinasa formando ácido fosfatídico que se reintegra a la síntesis de fosfoinositoles o convertirse en sustrato de la fosfolipasa A2.

La generación de IP3 y el incremento en Ca²⁺ intracelular es la señal que inicia la respuesta, mientras que el DG activando a la PKC modularía la señal intracelular iniciada por el incremento en Ca²⁺ o por alguna otra vía generadora de segundos mensajeros (Nishizuka y col. 1984, Pozzan y col. 1984, Albert y col. 1985, Anderson y col 1985, Albert y col. 1987, Herridge 1989, Kikkawa y col. 1988).

Existen multiples formas de PKC, que pertenecen a un grupo de 6 genes que codifican para 7 formas con requerimientos diferentes. Las PKCs poseen una región catalítica, una región regulatoria y una tercera que se supone ocupa el lugar del sitio catalítico en ausencia de estímulo (Parker y col. 1989r). La región amino terminal de 32 kDa interactua con el Ca²⁺, los fosfolípidos y con el ester de forbol/DG; la región

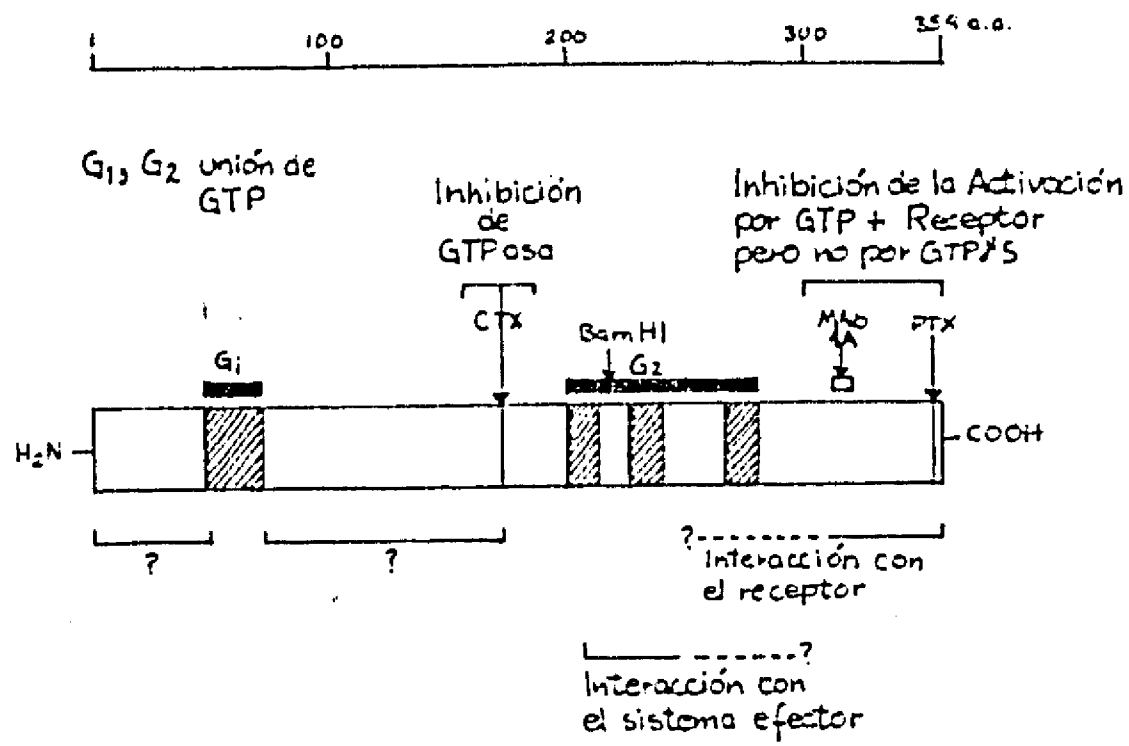
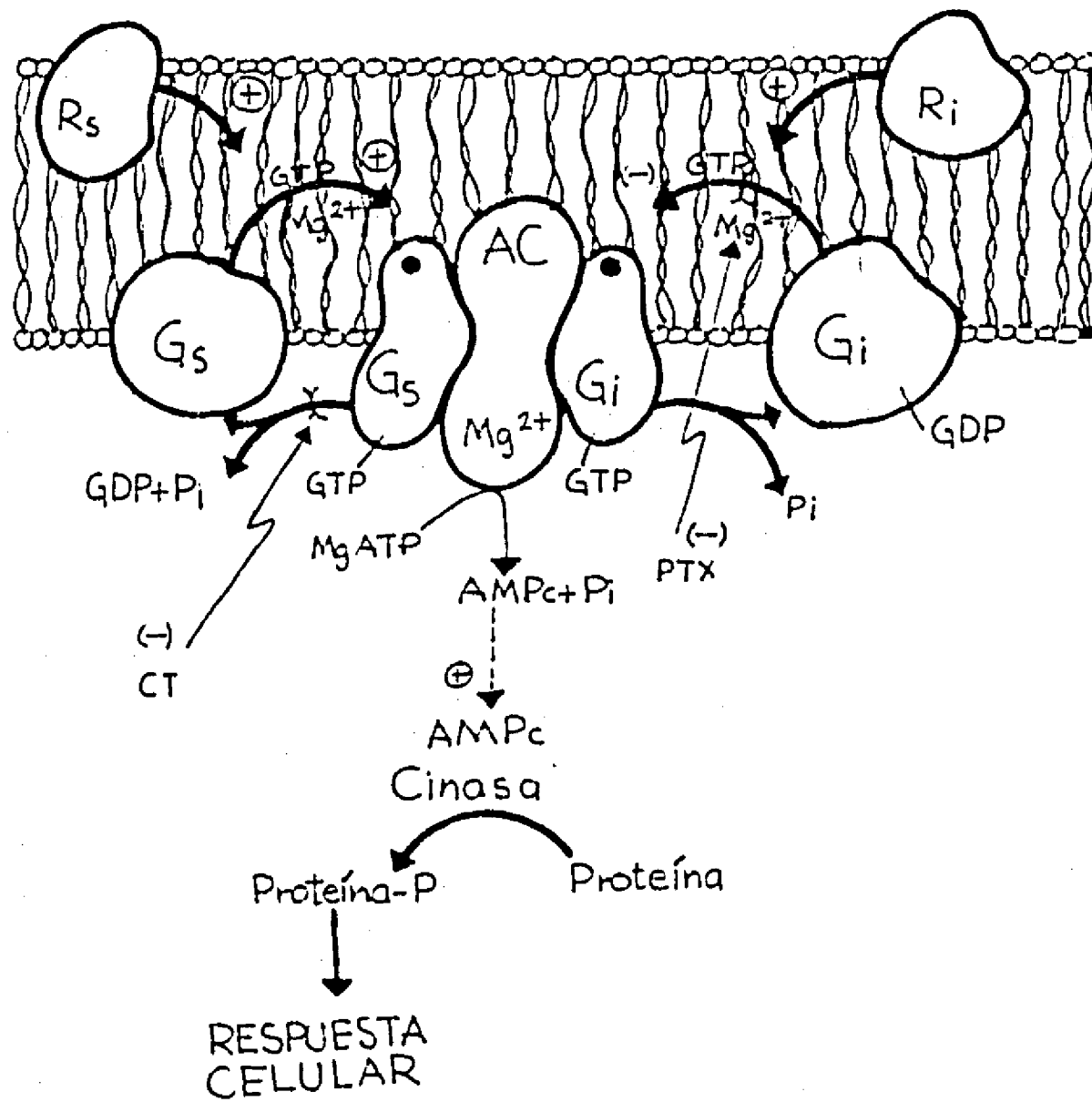


Fig. 1 Interacción receptor-proteína G-efector.

A: asociación de los dominios funcionales a dominios estructurales de la subunidad $G\alpha$. G1 y G2 regiones de contacto de la subunidad α con los nucleótidos de guanina. Se indica el sitio de ADP-ribosilación por PTX (tomado de Birnbaumer, 1990).



B: Regulación del sistema adenilato ciclasa. El agonista se une al receptor (R_s : estimulante, R_i : inhibidor), éste complejo interactúa con el trímero $\alpha\beta\gamma$ lo que permite la disociación de la subunidad α de la $\beta\gamma$. La subunidad α se une con el GTP y es esta forma de α que se une a la subunidad catalítica (C) de la AC para activarla. La regulación del sistema es paralela a la hidrólisis del GTP, la disociación de α de C y la reasociación del trímero $\alpha\beta\gamma$.

carboxiterminal de 50kDa (dominio catalítico) interactúa con el ATP y las proteínas sustrato (Yasuf 1990). Los requerimientos de la PKC activada por el DG son: Ca²⁺ y fosfolípidos ácidos de los cuales la fosfatidilserina (PS) es la más efectiva.

En la hipófisis se han caracterizado receptores a IP₃ (Guillemette y col. 1987) y se conoce que tipo de PKC se encuentra en ella (Hirota y col. 1985, Hermon y col. 1986, Makowske y col. 1986). Desde el punto de vista farmacológico (activación de PKC con ésteres de forbol) se han logrado evidenciar diferencias en los requerimientos de las PKCs. La enzima PKC II de hipotálamo es menos sensible que la de la hipófisis mientras que la I hipotalámica es muy resistente a la activación por TPA y puede ser activada por AA aún en ausencia de Ca²⁺, PS y DG, aunque el DG las activa de igual manera (Naor 1990).

Se han caracterizado acoplamiento de tipo estimulatorio a la PLC (E.C.3.1.4.3) para el TRH (Gershengorn 1985, Kolesnick y Gershengorn 1986) a través de una proteína G insensible a PTX y CT (Albert y col. 1987, Journot y col. 1987, Yajima y col. 1988); para la AII (Canonico y MacLeod 1986) y de manera inhibitoria posiblemente para la dopamina tras estimulación por A II (Enjalbert y col. 1986) y por TRH (Simmonds y Strange 1985). La proteína G que media este efecto es sensible a la PTX (Journot y col. 1987). Algunos resultados indican que la DA no tiene efecto sobre la hidrólisis de IPs (Canonico y MacLeod 1986); la DA actuaría preferentemente sobre la fosforilación del IP y del IP₄ que sobre la hidrólisis de los fosfolípidos (Jarvis y col. 1988). Sin embargo se ha propuesto que es la ausencia de DA la que provoca el incremento en la hidrólisis de IPs y no un efecto inhibitorio propio de la amina sobre la actividad de la PLC (Martínez de la Escalera y Weiner 1988). Vallar y col. 1988, cuestionan el acoplamiento del receptor de la DA a la PLC y proponen que el efecto de la amina sobre el metabolismo de IPs estimulado por TRH se debe al bloqueo del infujo de Ca²⁺.

La actividad de la PLC así como la de la DG lipasa puede ser modulada por los esteroides. En el endometrio de rata, los esteroides que incrementan la actividad de la PLC disminuyen la actividad de la DG lipasa. Este efecto contrario de la actividad de dos enzimas sobre la misma vía metabólica quizá participe en el control de la producción de sustratos generadores de segundos mensajeros (Bonney y col. 1988).

Otra manera de generar DG es mediante la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC) de los lípidos membranales; ésta es sustrato de la PLC, PLA₂ y PLD. El significado biológico de la existencia de este proceso degradativo de PC estimulado por agonistas radica en su capacidad para generar DG; la cinética de producción de éste por hidrólisis de los fosfatos de inositol es corta y en pequeña cantidad, mientras que aquella producida por hidrólisis de PC puede prolongarse mucho más tiempo; además la cantidad celular de PC es mucho mayor que la de fosfatos de inositol (Exton 1990).

La producción de DG es específica ya que no se produce movilización de calcio intracelular, aunque existen pocos casos en los que la hidrólisis de PC no esta acompañada de la hidrólisis de fosfatos de inositol. Por otro lado la hidrólisis de PC provoca la acumulación de ácido fosfatídico (PA) de manera paralela a la de DG con la consecuente actividad de PA como ionóforo y movilizador de calcio intracelular o como sustrato de la PLA₂.

La variedad de PKCs reconocidas a la fecha sugieren que ellas podrían

ser activadas diferencialmente por los DG originados por la acción de alguna fosfolipasa sobre determinado sustrato (fosfatos de inositol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilcolina).

7.3.3- Metilación de fosfolípidos

En algunos tipos celulares, la metilación de los fosfolípidos membranales provoca la entrada de Ca^{2+} , la liberación de AA y desencadena la respuesta secretora.

La secuencia de reacciones que convertirían a la fosfatidiletanolamina en fosfatidilcolina implica enzimas localizadas en la membrana, transferidoras de radicales metilo ($-CH_3$) a partir de la S-adenosilmetionina (SAM), al radical amino de la fosfatidiletanolamina (Hirata y col. 1978).

A nivel hipofisario, existe una actividad metil-transferasa (Prasad y Edwards 1981) cuya actividad puede ser modulada por los estrógenos (Drouva y col. 1986a,b). En células tumorales GHS Kolesnick 1987, mostró que el TRH y los esteroides de forbol inducen la síntesis de fosfatidilcolina y posiblemente la PKC media este efecto; sin embargo ni el TRH ni el TPA estimulan la degradación de la fosfatidilcolina.

Se propone un mecanismo por el cual la metilación de la fosfatidiletanolamina a fosfatidilcolina participaría en la respuesta celular: el cambio en la fluidez membranal producido durante la translocación de la fosfatidiletanolamina del lado citoplasmático a la parte externa de la membrana plasmática (Hiarta y Axelrod 1978), los cambios producidos bajo esta situación podrían desenmascarar receptores normalmente ocultos (Strittmatter y col. 1981).

7.3.4- Producción de Acido araquidónico

Algunos fosfolípidos tienen en posición 2n esterificado al AA, éste puede ser hidrolizado por la PLA2 (E.C.3.1.1.4) en presencia de Ca^{2+} ; otra manera de producirlo es a través de la acción de la PLC, DGL /MGL sobre los fosfatos de inositol o sobre otros fosfolípidos (Rajendra y Lowell 1990).

La actividad de la PLA2 (así como la de la PLC) puede ser afectada por las hormonas esteroideas; en endometrio de rata, los estrógenos incrementan la actividad de la PLA2 (Bonney y col. 1987).

El AA y sus metabolitos han sido involucrados en la potencialización a largo plazo (Dumuis y col. 1988, Barbour y col. 1989), en la inhibición presináptica (Piomelli 1987, Buttner y col. 1989) y al parecer el responsable de este efecto es el 12-HEPTE. Los metabolitos de la vía lipoxigenasa (5-HEPTE, LTA4, LTC4) provocan la activación del canal de K^+ muscarínico cuya actividad está mediada por una proteína G sensible a la PTX (Kurachi y col. 1989).

7.3.4.1- Metabolismo de Acido Araquidónico

El ácido araquidónico puede ser metabolizado por 3 vías diferentes, la ciclooxigenasa, productora de prostaglandinas y tromboxanos; la lipoxigenasa, cuyos productos de reacción son los HPTEs, HETEs y LTs; y la epoxigenasa, productora de epóxidos (fig 3).

En la hipófisis completa, Pilote y col. 1982 han reportado la formación de 12 y 15-HETE HHT, PGE2, PGD2 y PGF2alfa principalmente, mientras que en la fracción microsomal se han encontrado derivados de la vía lipoxigenasa así como de la epoxigenasa (Capdevila y col. 1984). Las células GH3 producen y liberan una variedad de HETEs (5,9,12,15-HETE siendo éste último mayoritario) mientras que tras estimulación con TRH prevalecen los HETEs 15 y 9. Dentro de la célula no se detectan HETEs, por lo que se ha propuesto que éstos son producidos y liberados sin ser almacenados (Rabier y col. 1987).

En un estudio realizado con fracciones enriquecidas en tres tipos celulares se detectan, en gonadotropos, metabolitos de la vía lipoxigenasa (11,12,15-HETE), HHT, TxB2, PGE2 y PGD2. En mamotropos y somatotropos en cambio, no se detectaron metabolitos del AA aunque sí se identificó al AA esterificado en los fosfolípidos. Ya que el producto relacionado con la secreción de la LH es el 5-HETE, es probable que éste provenga de otro tipo celular (Vanderhoek y col. 1984). Generalmente se asume que los efectos del AA y/o sus metabolitos son debidos principalmente a la participación de los lactotropos (ya que su porcentaje de éstos es mayoritario).

Es necesario conocer la relevancia del AA y sus metabolitos en la secreción hipofisaria así como el origen de los productos, es decir si ellos son producidos por la misma célula sobre la que actúan (efecto autócrino) o si son producidos y liberados afectando el funcionamiento de otro tipo celular (efecto parácrino).

De los metabolitos del AA, la PGE2 estimula la secreción de GH actuando a nivel hipofisario (Dray y col. 1980). Indirectamente esta prostaglandina estimula la secreción de LH al estimular la liberación de LH-RH a nivel hipotalámico (Ojeda y col. 1979).

En general parecen ser los metabolitos del AA de la vía lipoxigenasa los relacionados con la secreción hipofisaria. Así por ejemplo el LTC4 y el 5-HETE estimulan la secreción de LH y de GH (Hulting y col. 1985, Naor 1986r, Wisner-Provost y col. 1986r, Kiesel y Catt 1987, Canonico y col. 1986b). En cuanto a la secreción de PRL los derivados lipoxigenados parecen estar involucrados ya que la inhibición de la vía lipoxigenasa conduce a la inhibición basal de la secreción de PRL así como la estimulada por TRH, A II, y NT (Canonico 1983, 1985, Koike 1985, Judd 1988). Aunque la vía epoxigenasa ha sido poco explorada, existen evidencias que indican la participación de productos de esta vía en la secreción de LH (Snyder y col. 1983); el derivado 5,6-EET parece estar involucrado en la secreción de PRL en células GH3 (Cashman y col. 1987).

7.3.5- El calcio como mensajero intracelular

Existen proteínas (calmodulina, calpactinas, lipocortinas, endonexina, calcimedinas, sinexina, calelectrina, cromobindina y sinhibina) que

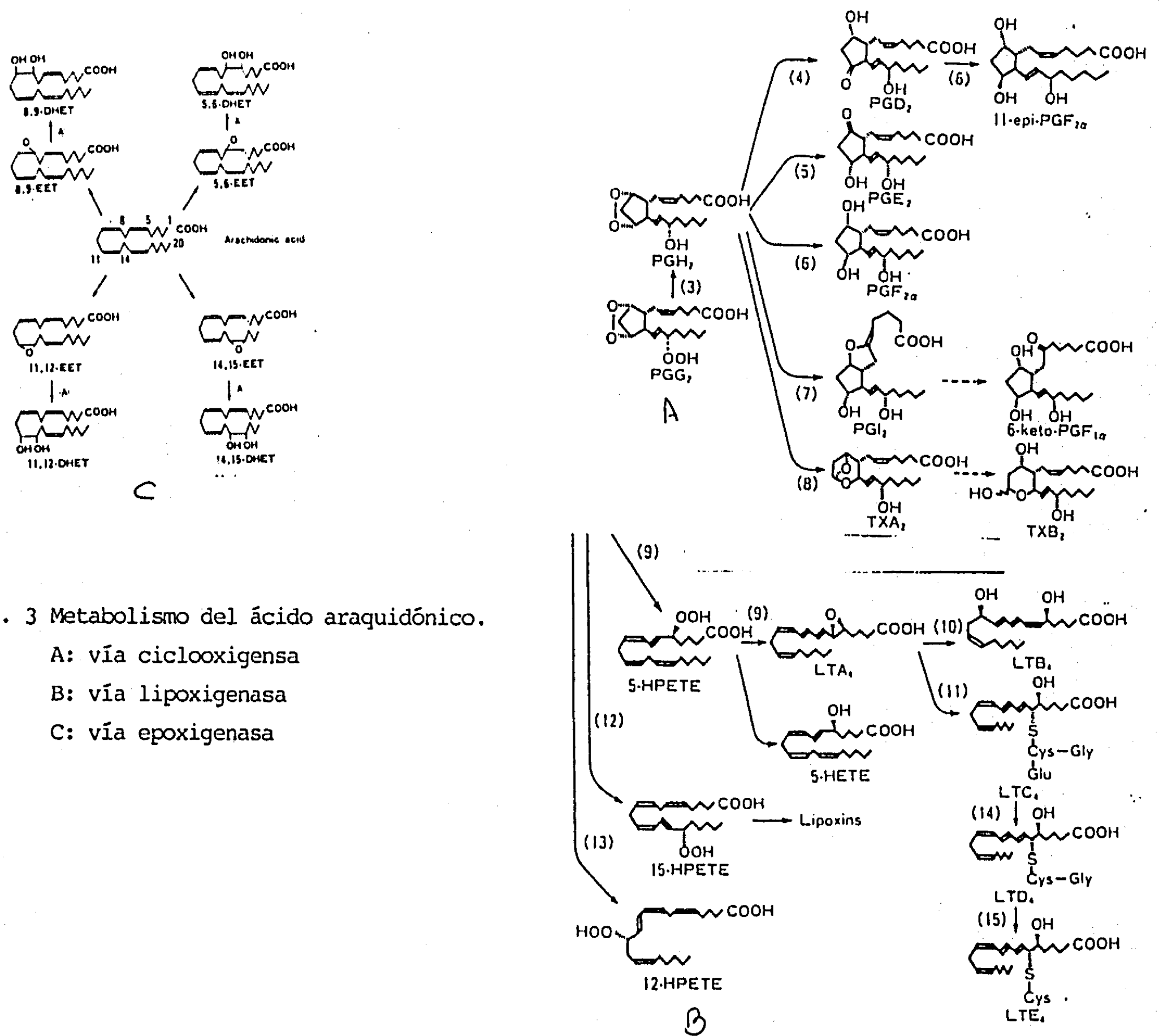


Fig. 3 Metabolismo del ácido araquidónico.
 A: vía ciclooxygenasa
 B: vía lipoxigenasa
 C: vía epoxigenasa

unen al calcio provocando la activación de enzimas, proteínas contractiles o proteínas relacionadas con los procesos de secreción. La interacción de algunos ligandos con su receptor y el consecuente incremento en calcio intracelular provee de un mecanismo para incrementar la baja afinidad de estas proteínas por el calcio, lo que puede resultar en la unión cooperativa del ión, permitiendo que las proteínas respondan a pequeños cambios en Ca^{2+} intracelular (como ocurre en el caso de la interacción calcio-calmodulina durante la activación de la fosfodiesterasa de AMPc) (Klee 1988). Estas proteínas cuya asociación a la membrana depende del Ca^{2+} , han sido involucradas en el acoplamiento del estímulo-secreción por su capacidad de promover la fusión membranal.

Dentro de los efectos "directos" del calcio, se ha encontrado la activación de la PLC que es sensible a las variaciones de calcio intracelular, aunque no es claro si es una consecuencia del calcio sobre la enzima o si el calcio es un cofactor sustituible por algún otro catión divalente.

7.3.6- Actividad eléctrica de canales

Se han caracterizado diferentes tipos de canales dependientes de voltaje (Hofmann 1988, Bean 1989). Los canales que más se han estudiado son los canales de tipo L sensibles a DHP (Bean 1989) que generan corrientes cálcicas de larga duración cuando el potencial de membrana alcanza los 0 mV. Los canales de tipo T generan corrientes cálcicas de corta duración ya que el potencial de membrana se encuentra entre -70 a -40 mV. Existe otro tipo de canal cálcico denominado N, encontrado hasta la fecha solamente en neuronas, que se abre cuando el potencial de membrana se sitúa entre -100 a 0 mV; este canal es sensible a la ω -cronotoxina (Cruz y Olivera 1986).

En la hipófisis se han caracterizado 2 tipos de canales utilizando líneas tumorales: el canal tipo T y el canal que es inactivado por DHP, el canal tipo L. Estos canales se encuentran en células normales y son inhibidos por los activadores de la PKC (Bean 1989).

Utilizando la técnica de patch-clamp se pudo mostrar que existe una actividad eléctrica espontánea que implica corrientes cálcicas en lactotropos (Taraskevich y Douglas 1978, Vincent y col. 1985), somatotropos (Israel y col. 1983, Vincent y col. 1985) y gonadotropos de rata (Croxtton y col. 1988).

La entrada de calcio en la célula puede también afectarse al activar los canales de K^{+} que al modificar el potencial eléctrico modifican la actividad de los canales cálcicos dependientes de voltaje (Tsien 1987).

La dihidropiridina Bay-K 8644 (Bk) es un agonista del canal de calcio que incrementa el tiempo de apertura de los canales ya activos. En la hipófisis existen sitios de unión a Bk (Titeler y col. 1985) a través de los cuales puede estimularse la secreción de PRL, ACTH y GH de células normales y tumorales (Enyeart y Hinkle 1984, Heisler 1985, Enyeart y col. 1986).

En los tirotropos, los canales cálcicos dependientes de voltaje, (sensibles a DHP), parecen encontrarse en estado inactivo en condiciones basales ya que los agonistas de VSCC afectan la secreción de TSH solamente en presencia de un estímulo despolarizante (Musset 1990).

Drouva y col 1988 han puesto en evidencia la diferente sensibilidad de los VSCC en los diversos tipos celulares hipofisarios, siendo los lactotrofos los más sensibles a la activación por agonistas del canal cálcico; además la estimulación con DHP solo se observa en las células provenientes de hembras y la actividad de éstos pueden ser regulados por estrógenos.

7.4- Interacción entre las diferentes vías de transducción

El hipotálamo libera diferentes neurohormonas que estimulan o inhiben la secreción de las células hipofisarias. Una neurohormona puede afectar la secreción de más de una hormona en la hipófisis y una hormona hipofisaria puede ser influenciada por varias hormonas hipotalámicas así como por efectos paracrinos y/o autocrinos. En este sentido, la respuesta que evaluamos en un momento dado es la resultante de estímulos, inhibiciones de la concentración de los mensajeros intracelulares y de las interacciones de éstos dentro de la célula. La fig 4 muestra las posibles interacciones entre las diferentes vías de transducción. Se ha observado la retroalimentación negativa de los sistemas adenilato ciclasa y fosfolipasa C. El ácido araquidónico puede movilizar calcio intracelular (Wolf y col. 1986, Kolesnick y col. 1984), mientras que los metabolitos del AA 12 y 15 HETE inhiben la formación de ácido fosfatídico (PA) a partir de diacilglicerol (DG) inhibiendo a la DG cinasa (Setty y col. 1987); los leucotrienos pueden activar la guanilato ciclasa (GC) y las prostaglandinas la adenilato ciclasa (AC) (Abdel-Latif 1986). La PKC a través de la fosforilación ejercería un control (homólogo u heterólogo) a nivel de receptores (Sibley y col. 1988), de la proteína G (Bell y col. 1986, Brock y col. 1985) o de los canales iónicos (De Riemer y col. 1985, Galizzi y col. 1987, Navaro y col. 1987). Cuando se desensibiliza a la PKC se sensibiliza la vía de los fosfoinositoles ya que se pierde la retroalimentación negativa de la PKC sobre la PLC (Hepler y col. 1988). La activación de la PKC podría también intervenir en la formación de AA a través de la fosforilación de las lipocortinas (Parker y col. 1987). En la hipófisis, la activación de la PKC activa los canales de calcio dependientes de voltaje sensibles a las DHP (Tashjian y col. 1987, Dufy y col. 1987).

7.5- Mecanismos de transducción y actividad celular

La actividad celular puede ser regulada por los diferentes efectores y las interacciones que entre ellas ocurre. A nivel hipotalámico se integra una gran cantidad de información cuya resultante es traducida en secreciones que van a repercutir en la actividad sintética y secretora así como en la capacidad de respuesta de las células hipofisarias.

7.5.1- Síntesis de TSH

La TSH es una glicoproteína compuesta de dos subunidades alfa y beta sintetizadas a partir de dos RNAm diferentes. Las hormonas tiroideas retroalimentan negativamente la síntesis de ambas subunidades. El hipotoroidismo provoca grandes incrementos en el nivel de RNAm de las

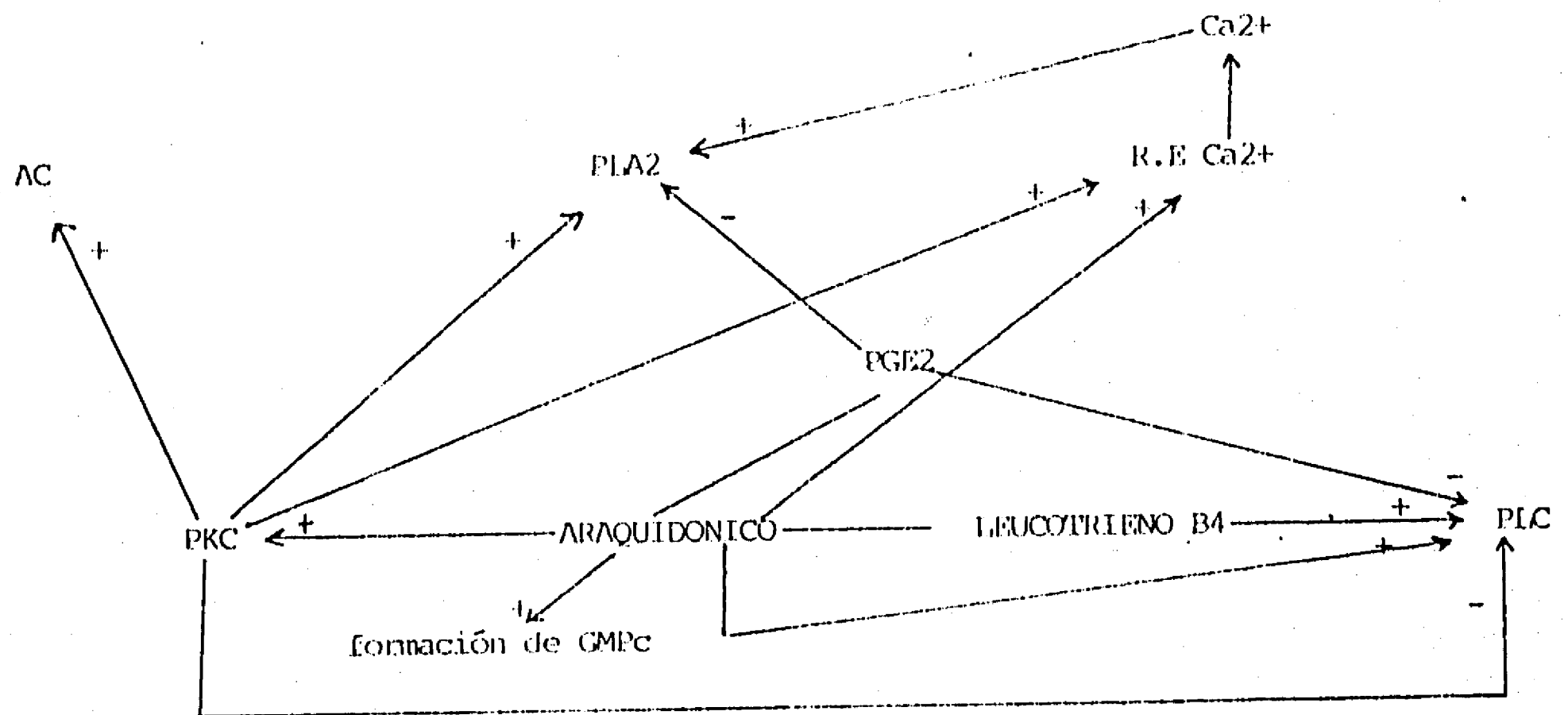


Fig. 4 Ejemplo de las posibles interacciones entre las diferentes vías de comunicación intracelular.

subunidades alfa y beta, mientras que la terapia reconstitutiva en animales hipotiroideos lo disminuye; estos cambios ocurren más rápidamente y son de mayor magnitud en la subunidad beta. El efecto de las hormonas tiroideas sobre la síntesis de TSH parece implicar cambios en la transcripción del gen de ambas subunidades (Weintraub y col. 1989).

El TRH participa también en la regulación de la síntesis de TSH. En células normales y tumorales, el TRH induce incrementos en la transcripción del gen así como en el nivel de RNAm de la glicoproteína. Se han observado efectos de TRH a nivel postraduccionales: cambios en el perfil de glicosilación principalmente de la subunidad beta que están fuertemente relacionados a la bioactividad de las moléculas de TSH (Weintraub y col. 1989).

7.5.2- Síntesis de PRL

En el lactotrofo, la síntesis de PRL está regulada por diferentes factores. En células GH el TRH estimula la transcripción del gen en tiempos muy cortos (5 min o menos). Evidencias experimentales indican que cambios en la concentración intracelular de calcio originan este efecto, sin alterar la síntesis de GH o de proteínas en general. La activación no hormonal de la PKC induce la transcripción del gen de PRL; aunque se desconoce la participación relativa del calcio y la PKC, es indudable que ambos están asociados a la regulación de la síntesis de la PRL (Hinkle 1989).

Los estrógenos estimulan la síntesis de PRL actuando a través de receptores nucleares induciendo la transcripción del gen de PRL e incrementando el nivel de RNAm pre-PRL (Lieberman y col. 1978) incrementando el nivel de PRL (Wiklund y col. 1981). Por el contrario, la progesterona inhibe la síntesis y la liberación de PRL provocada por los estrógenos (Bethea y col. 1988, Chen y Meites 1970). Las hormonas tiroideas (T3) también tienen un efecto inhibitorio (Maurer 1982) mientras que el hipotiroidismo incrementa la acumulación del RNAm así como la liberación de la hormona (Wood y col. 1987).

7.5.3- El receptor de TRH

Las regiones enriquecidas en receptor a TRH son el bulbo olfatorio accesorio, el complejo amigdaloso, el hipocampo, la región peririnal de la corteza cerebral y la adenohipófisis. Aunque las características de unión de los receptores a TRH en cerebro e hipófisis son similares, la función del TRH estaría determinada por el tipo de relaciones postreceptor que cada tejido posee. Existen diferencias en la sensibilidad de los receptores a los nucleótidos de guanidina; la hipófisis, cerebelo, estriado y retina se encuentran entre las regiones de mayor sensibilidad (Sharif 1989).

La concentración de receptores a TRH es regulada homóloga y heterológicamente. La presencia de TRH induce la pérdida de sitios receptores de TRH y a este tipo de desensibilización se le denomina

homóloga; éste es un proceso lento que requiere de la síntesis de proteína y ocurre tanto en el tirotropo como en el lactotropo. Dentro de las hormonas que de manera heteróloga desensibilizan el receptor de TRH, se encuentran las hormonas tiroideas, éstas ejercen retroalimentación negativa disminuyendo el número de receptores hipofisarios al tripeptido. El tiempo requerido para la observación de este efecto es de 24-48 h y es totalmente reversible; se observa tanto en lactotropos como en tirotropos.

Aunque se desconoce el mecanismo molecular implicado en la regulación del receptor de TRH en la adenohipófisis, el AMPc está fuertemente involucrado en este efecto. El incremento en los niveles de AMPc lleva a la reducción del número de receptores a TRH; este efecto no es mediado por fosforilación ya que los efectos de ésteres de forbol o bien son muy rápidos y relacionados a cambios en afinidad del receptor o más lentos y relacionados al número de receptores al péptido (Hinkle 1989).

8- Corolario

El TRH es liberado de la eminencia media y viaja por el sistema porta-hipofisario hasta alcanzar la hipófisis, donde interactúa con los receptores del tirotropo o del lactotropo afectando la síntesis y la liberación de TSH y PRL respectivamente. Las hormonas tiroideas liberadas por la acción de la TSH sobre la glándula tiroides retroalimentan negativamente el sistema; a nivel hipofisario la síntesis de TSH y del receptor de TRH; a nivel hipotalámico la síntesis y posiblemente la liberación de TRH. La enzima sérica responsable de la degradación de TRH, la tiroliberinasa, en cambio es activada por las hormonas tiroideas (fig 6).

Se conocen algunos de los mecanismos intracelulares que median la respuesta del TRH. En particular los relacionados a la liberación de PRL que son mediados por la degradación de fosfatos de inositol, incrementos de calcio y quizá por la producción de ácido araquidónico y sus metabolitos.

Uno de los eventos que podría participar en la regulación de los niveles de TRH accesibles al lactotropo o tirotropo, es la degradación del TRH por la enzima membranal presente en la hipófisis. La actividad de la PGA II podría estar regulada por las hormonas del órgano blanco o por las neurohormonas hipotalámicas, a través de los mensajeros que ellos generan.

Entre los mensajeros intracelulares generados por los efectores hipotalámicos que controlan la secreción

de PRL, el ácido araquidónico puede ser producido por TRH y tal producción inhibida por la DA, sin embargo las características de estos procesos se desconocen. El estudio de la sensibilidad a la toxina pertussis así como la participación de otros segundos mensajeros, contribuirá a la comprensión de la fisiología del lactotrofo.

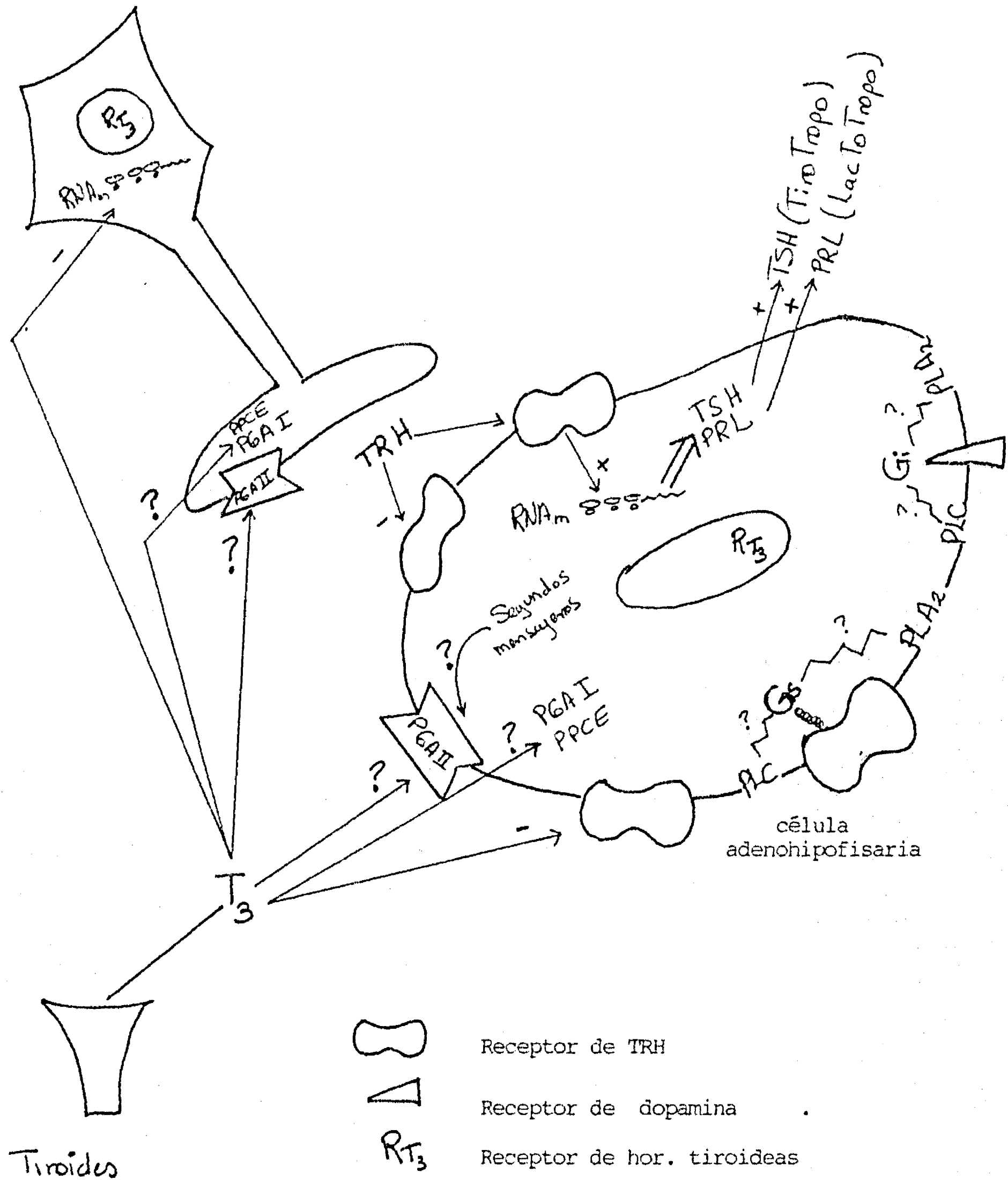


Fig 6 Estado actual del conocimiento de la retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides por las hormonas tiroideas y el TRH.

PLAN DE TRABAJO

Se sabe que el TRH estimula la secreción de hormonas hipofisarias. Específicamente, en el caso de la PRL, a nivel intracelular la activación del receptor a TRH está relacionado con la actividad de la PLC, de los canales cálcicos así como de la producción de ácido araquidónico (AA). La activación del receptor a DA y la consecuente inhibición de la secreción de PRL, está relacionada con la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa, de la PLC, de la producción de AA y de la actividad de canales iónicos. Además se ha demostrado que la DA inhibe la secreción de PRL provocada por el TRH y este efecto está asociado a la inhibición de la hidrólisis de fosfatos de inositol y /o la actividad de los canales iónicos.

La regulación de la concentración de segundos mensajeros que las moléculas señal afectan, es solamente uno de los eventos que participan en la regulación de la actividad hipofisaria, sin embargo como antes se mencionó existen otras etapas susceptibles de regulación y una de ellas es la terminación de la actividad del "primer mensajero".

La primera parte de este trabajo se diseñó para analizar la posible regulación de las enzimas que degradan al TRH, por el producto final del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides, las hormonas tiroideas en el SNC y la hipófisis; también estuvimos interesados en conocer la participación de algunos segundos mensajeros en la regulación de la actividad degradativa de TRH en células hipofisarias. Sabemos que en el metabolismo del TRH existen otras etapas que se encuentran bajo control; si la degradación también lo está, ya sea por las hormonas periféricas o por los factores hipotalámicos (y los mensajeros que median sus respuestas), podría ser un factor que contribuya a la regulación de la actividad del péptido.

El modelo de trabajo lo constituyen en primer lugar las preparaciones (fracción soluble o membranal) de diversos tejidos de rata en diferente estado tiroideo y en segundo lugar los cultivos primarios de células hipofisarias dispersas.

La segunda parte fue enfocada al estudio de la posible participación de algunas hormonas hipotalámicas (TRH, DA y A II) en la producción de AA relacionada con la secreción de PRL.

El modelo de trabajo lo constituye en primer lugar las preparaciones (fracción soluble o membranal) de diversos tejidos de rata en diferente estado tiroideo y en segundo lugar los cultivos primarios de células adenohipofisarias dispersas.

ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD DE PGA II "in vivo" e "in vitro"

OBJETIVOS

En el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del CIIGB (dirigido por el Dr J.L. Charli y la Dra. P. Joseph-Bravo) se planteó desde hace algunos años el interés en el estudio integral del péptido hipofisiotrópico TRH, por lo que diferentes subgrupos de trabajo han estudiado cada una de las etapas implicadas en el metabolismo y función del TRH.

El efecto retroalimentador de las hormonas tiroideas ha sido identificado sobre diversas etapas involucradas en la síntesis y liberación de tirotropina, la modulación de los receptores a TRH y en los niveles de RNAm a TRH.

En esta tesis se aborda la degradación del TRH como un posible evento sometido a regulación y relacionado con la actividad hipofisiotrópica del TRH, esto es, la degradación como un evento que regula la concentración de péptido activo responsable del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides. La primera estrategia consistió en estudiar en condiciones de hipo e hipertiroidismo la actividad de las enzimas responsables de la degradación del péptido liberado (la tiroliberinasa sérica y la piroglutamato aminopeptidasa membranal, así como las enzimas citosólicas).

Otra posible etapa de regulación, a nivel hipofisario, es el efecto de factores hipotalámicos sobre la actividad de la peptidasa membranal. Para ello, se optimizó un sistema de células hipofisarias en cultivo en el que se estudió la actividad de PGA II en presencia de algunos de los efectores involucrados en la secreción de TSH y prolactina, particularmente TRH, dopamina y angiotensina. Se estudió el efecto de las diferentes familias de segundos mensajeros, ya que la enzima podría estar regulada por otro efector hipotalámico diferente a los mencionados.

MATERIAL Y METODOS

1- Optimización del método de obtención de membranas

a- Método corto

El tejido fué homogeneizado con homogeneizador de vástago (o sonicador según se indique) en buffer Tris-HCl 50 mM pH 7.4 (10% peso/vol) y se centrifugó durante 15 min a 49 C y 3000 rpm; el sobrenadante se retiró y el sedimento fué homogeneizado repitiendo la operación de centrifugación bajo las mismas condiciones. Se reunieron los dos sobrenadantes y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 15 min a 49 C. El sobrenadante de esta preparación fué llamado "fracción soluble" y el sedimento "fracción membranal".

b- Método largo

Este método es similar al antes descrito hasta las dos centrifugaciones consecutivas a 3000 rpm. Posteriormente los dos sobrenadantes reunidos fueron centrifugados a 25,000 rpm durante 1h 10 min. Terminada esta etapa se separó el sobrenadante que fué llamado "fracción soluble". El sedimento fué rehomogeneizado en buffer PO_4 50 mM pH 7.4 y se repitió la operación de centrifugación a 25,000 rpm. El sobrenadante fué desechado y el sedimento fué llamado "fracción membranal". Las fracciones membranales fueron ensayadas en presencia de los inhibidores inespecíficos de las enzimas solubles (bacitracina y N-etilmaleimida) o, los específicos (Z-Pro-Prolinal, ZPP y piroglutamil diazometilcetona, PDMK).

2- Determinación de la actividad enzimática

Los animales en la condición indicada (hipo, hiper o eutiroides) fueron sacrificados por decapitación a las 10:00 a.m.. Se colctó la sangre del tronco para la obtención de suero (coagulación 2h a 49 C y centrifugación a 5,000 rpm durante 15 min.) y los tejidos: adenohipófisis, núcleo arcuato-eminencia media, resto del hipotálamo, septo lateral-núcleo accumbens, corteza, lóbulo olfatorio, hígado y pulmón fueron disecados y congelados a -709 C hasta la determinación de la actividad enzimática. Después de la optimización del método todos los tejidos fueron procesados como se indica en el "método corto" tras homogeneización por sonicación. El sedimento final fué recuperado en buffer PO_4 50 mM. La mezcla de reacción fué preparada dependiendo de la actividad enzimática a ser evaluada, de la siguiente manera:

PGA I

Tris-HCl 50 mM pH 7.4
DTT-EDTA 2mM
bacitracina
N-etilmaleimida 2.5 mM

PGA II

fosfatos 50 mM pH 7.4
bacitracina/
N-etilmaleimida
2.5 mM

Tiroliberinasa

Tris-HCl 100 mM pH 7.6
bacitracina/ N-etilmalei
mida 2.5 mM

En los tres casos en presencia de TRH 10^{-6} M y 100,000 cpm de 3 H-Pro-TRH. La cantidad de proteína óptima para la detección de la actividad enzimática (cuantificada por el método de Lowry 1951) para los diferentes tejidos fué:

	Proteína mg/ml (X + SEM)	
	PGA I	PGA II
Adenohipófisis	3.20 + 0.30	3.78 + 0.32
N. arcuato-E. media	1.30 + 0.30	0.60 + 0.04
Resto del hipotal.	1.66 + 0.24	6.48 + 0.15
Silateral-N. accumbens	1.91 + 0.17	3.44 + 0.36
Lóbulo olfatorio	----	6.15 + 0.22
Corteza	----	10.56 + 0.51
Hígado	----	
Pulmón	----	
Suero	7.0 + 0.30	

3- Optimización de la determinación de Tiroliberinasa

La actividad de tiroliberinasa fué ensayada en el suero diluido 1:3 (25 ul) en las siguientes condiciones:

- a- Tris-HCl 100 mM pH 7.6
- b- Tris-HCl 100 mM, DTT 0.5 mM pH 7.6
- c- Tris-HCl 100 mM, Bac-Nem 2.5 mM pH 7.6
- d- Tris-HCl 100 mM, DTT 0.5 mM, Bac-Nem 2.5 mM pH 7.6

4- Cinética de la actividad de PGA II en animales hipertiroideos

Los animales fueron inyectados (09:00 a.m.) con T_3 (20 ug/100 g peso corporal) administrada por vía subcutánea en aceite de maíz, durante 0.5, 1, 3, 5 o 7 días. Terminado el tratamiento fueron sacrificados por decapitación recuperando la sangre para la obtención de suero (determinación de la actividad de tiroliberinasa) y los tejidos disecados y congelados a $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta la determinación de la actividad enzimática.

5- Curva dosis-respuesta de la actividad de PGA II en animales hipertiroideos

Los animales fueron inyectados (09:00 a.m.) diariamente durante 7 días con diferentes dosis de T_3 : 0.5, 1, 5, 10, 20 y 40 $\mu\text{g}/100 \text{ g p.c.}$ Terminado el tratamiento los animales fueron sacrificados, la sangre recuperada y los tejidos procesados como se describió antes.

6- Efecto de la T_3 adicionada "in vitro" sobre la actividad de la PGA II en adenohipófisis

A una preparación membranar se le adicionó T_3 en diferentes concentraciones que corresponden a la concentración de T_3 determinada por RIA en el suero de animales en diferente estado tiroideo:

Hipotiroides	0.18 ng/ml
Eutiroideo	0.70 ng/ml
Hipertiroides	10.00 ng/ml

7- Liberación de TRH

Se analizó la liberación de TRH de rebanadas de hipotálamo medio basal o de eminencia media fué evaluada de acuerdo al método descrito por Méndez y col. (1987). Los hipotálamos fueron disecados, rebanados (250 μm) y depositados en el dispositivo de liberación (jeringa cortada por el extremo inferior y sellada con una malla de nylon). La jeringa fué sumergida en un vial con 500 μl de RKB pH 7.4 a 37 $^{\circ}$ C, bajo atmósfera de O_2 / CO_2 95/5% y con agitación lenta durante 10 min; esta operación fué repetida 6 veces. El TRH liberado en el sexto vial, correspondió a la liberación basal; el séptimo vial contuvo 500 μl de RKB con K^+ 56 mM. El TRH liberado en este vial correspondió a la "liberación estimulada". Después de cada transferencia se adicionó ácido acético al medio de incubación (20% concentración final). Después de la última incubación los tejidos se sonicaron en ácido acético 20%. El medio acidificado se centrifugó durante 30 min a 4 $^{\circ}$ C y 12,000 rpm y el sobrenadante se evaporó a sequedad. El residuo fué extraído dos veces con metanol al 90% y después de evaporarlo a sequedad el residuo fué utilizado para el RIA. Los tejidos homogeneizados en ácido acético al 20% fueron centrifugados 10 min a 4 $^{\circ}$ C y 12,000 rpm, el sobrenadante fué evaporado y extraído dos veces con metanol al 90%, el residuo fué utilizado para el RIA.

8- Radioinmunoanálisis de TRH

El RIA de TRH se efectuó de acuerdo al método descrito por Joseph P (1979). En 50 μl de buffer PO_4 50 mM pH 7.5 se hizo reaccionar el péptido 2.5 μg , 0.5 mCi de ^{131}I en presencia de 50 μg de cloramina T con agitación suave durante 30 sec, la reacción es terminada por la adición de 150 μg de metabisulfito de sodio disueltos en 10 μl de buffer. La purificación se realizó por cromatografía en columna sobre sephadex G-10 utilizando como eluyente buffer PO_4 50 mM con 0.25% de BSA.

La mezcla de incubación contuvo 50 μl de anticuerpo R_2 (1:20,000-1:40,000 dilución final) diluido en el buffer de RIA (PO_4 50 mM, NaCl

150 mM, albúmina 0.25%), 50 ul de ^{131}I -TRH (aprox. 7000 cpm) y el residuo del extracto de tejido resuspendido en 200 ul o el residuo del medio resuspendido en 400 ul de buffer de RIA sin NaCl. Después de 36-48 h de incubación a 40 C el complejo TRH-anticuerpo fué precipitado con etanol absoluto (80% final). La sensibilidad del ensayo (90% B/B₀) fué de 10 pg.

9- Radioinmunoanálisis de T3

La T3 fué cuantificada por radioinmunoanálisis en el laboratorio del Dr C. Valverde de acuerdo al método descrito en Dutrem y col 1978

10- Determinación de la actividad de PGA II en células adenohipofisarias en cultivo

Las células dispersas (la metodología de dispersión se describe en el artículo 2) fueron sembradas a 1 millón por pozo y se adicionó hormona tiroidea (concentración indicada). Los cultivos de 4 días con la T₃ adicionada fueron llamados "control" a diferencia de los pozos que fueron pretratados con diferentes compuestos con el objetivo de estimular la formación de segundos mensajeros intracelulares que fueron llamados cultivos "tratados".

En un primer intento de evaluación de la actividad enzimática probamos 3 concentraciones de hormona tiroidea (10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9}) en dos medios diferentes DMEM y PBS (Mg⁺⁺, Ca⁺⁺, glucosa) obteniendo resultados más reproducibles en PBS, solamente para la determinación de la actividad enzimática.

La duración del pretratamiento de las células con los diferentes compuestos fué muy variada ya que se intentó hacer un tamizado de las moléculas biológicas relacionadas de alguna manera con la secreción de PRL y que pudiesen estar involucradas en el mecanismo de regulación de PGA II. A continuación se listan los compuestos y tiempos de preincubación con los diferentes efectores, previo a la determinación de la actividad enzimática:

Tratamiento	tiempo(min)	concentración (M)
TPA	30,60,14-16 h (o.n.)	10^{-6}
A23187	15,60	10^{-6}
Forskolina	15,60	10^{-5}
4-Br AMPc	15,60	10^{-4}
Bromocriptina	15,60	10^{-4}
Melitina	15,60	0.5 ug / ml
Alto potasio	30	56 mM
Péptidos		
AII	15,60	10^{-6}
SRIF	15,60	10^{-6}
VIP	15,60	10^{-6}

De acuerdo a los resultados obtenidos en el experimento anterior, se eligieron aquellos tratamientos que presentaron algún efecto sobre la actividad de PGA II con el diseño experimental descrito a continuación:

TPA(10^{-6}) cinética de 5-120 min y toda la noche(o.n.)

Bromocriptina dosis respuesta 10^{-9} - 10^{-6} M

Melitina (0.5 ug/ml) cinética de 5-30 min

Forskolina (10^{-5}) 120 y 180 min

Estrógenos 10^{-9} y 10^{-10}

Estrógenos sobre cultivos tratados o.n. con TPA

Bromocriptina (10^{-7}) sobre cultivos tratados o.n. con

PTX (100 ng/ml)

PTX / TPA (10^{-6})

TPA sobre cultivos tratados o.n. con

A II (10^{-6})

TRH (10^{-6})

Angiotensina II sobre cultivos tratados o.n. con

A II

TPA

TRH sobre cultivos tratados o.n. con TRH

TPA / A II sobre cultivos tratados o.n. con TPA

RESULTADOS

1- Optimización del método de obtención de membranas

Para determinar las condiciones experimentales que permitieran una adecuada cuantificación de la PGA II se compararon primero los métodos de obtención de membranas (corto contra largo). Se realizó una cinética a diferentes concentraciones de proteína con el objeto de definir las condiciones de linealidad que aproximaran a velocidad inicial; esto se hizo en presencia de inhibidores de las enzimas solubles (bacitracina para la PPCE y N-etilmaleimida para la PGA I); en incubaciones paralelas se estudió también el efecto de inhibidores específicos de estas enzimas (ZPP y CPNH). La fig 1 y 2 muestran que no hay diferencia entre el método corto y el largo en un rango de 0.68 a 2.88 mg / ml de proteína.

La actividad de la PGA II cuantificada directamente en el homogenado (homogeneización por vástago) fue lineal en un rango de proteína más restringido 0.6-1.2 mg /ml; no se observaron diferencias por el uso de inhibidores específicos o no específicos (fig 2).

Se comparó también el método de homogeneización: vástago contra sonicador; en las preparaciones membranales cuya homogeneización se hizo con sonicación y procesados por el llamado método "corto" la actividad fue 4 veces mayor que en el resto de las preparaciones utilizando el inhibidor específico y 2 veces mayor con el uso de inhibidor no específico (tabla 1). Se eligió así la homogeneización por sonicación y el método corto de preparación de membranas. Debido a la dificultad de obtener cantidades suficientes de los inhibidores específicos decidimos utilizar los no específicos conociendo que la evaluación de la actividad enzimática de esta manera daría valores numéricos que son la mitad de aquellos obtenidos con el uso de inhibidores específicos.

2- Determinación de la actividad de la tiroliberinasa

La evaluación de la actividad de tiroliberinasa en las condiciones reportadas (Bauer 1976) no dieron resultados reproducibles en los ensayos realizados en el laboratorio, por lo que la actividad de la enzima sérica fue evaluada en diferentes soluciones. La figura 3 muestra que la ausencia de inhibidores (exista o no DTT) provocó que la formación de $^3\text{H-His-Pro-NH}_2$ no fuera lineal a lo largo del tiempo. La tabla 2 indica que es en las soluciones 3 y 4 (sin y con DTT respectivamente, pero en presencia de inhibidores de las enzimas solubles) donde la actividad de la tiroliberinasa es aproximadamente lineal. En base a estos resultados elegimos la solución 3 (Tris-HCl / Bac-Nem) para la evaluación de la actividad de la enzima sérica. No se observó diferencia por la temperatura a la cual fue colectada la sangre para la obtención de suero (tabla 2).

RESULTADOS

1- Optimización del método de obtención de membranas

Para determinar las condiciones experimentales que permitieran una adecuada cuantificación de la PGA II se compararon primero los métodos de obtención de membranas (corto contra largo). Se realizó una cinética a diferentes concentraciones de proteína con el objeto de definir las condiciones de linealidad que aproximarán a velocidad inicial; esto se hizo en presencia de inhibidores de las enzimas solubles (bacitracina para la PPCE y N-etilmaleimida para la PGA I); en incubaciones paralelas se estudió también el efecto de inhibidores específicos de estas enzimas (ZPP y CPNH). La fig 1 y 2 muestran que no hay diferencia entre el método corto y el largo en un rango de 0.68 a 2.88 mg / ml de proteína.

La actividad de la PGA II cuantificada directamente en el homogenado (homogeneización por vástago) fue lineal en un rango de proteína más restringido 0.6-1.2 mg /ml; no se observaron diferencias por el uso de inhibidores específicos o no específicos (fig 2).

Se comparó también el método de homogeneización: vástago contra sonicador; en las preparaciones membranales cuya homogeneización se hizo con sonicación y procesados por el llamado método "corto" la actividad fue 4 veces mayor que en el resto de las preparaciones utilizando el inhibidor específico y 2 veces mayor con el uso de inhibidor no específico (tabla 1). Se eligió así la homogeneización por sonicación y el método corto de preparación de membranas. Debido a la dificultad de obtener cantidades suficientes de los inhibidores específicos decidimos utilizar los no específicos conociendo que la evaluación de la actividad enzimática de esta manera daría valores numéricos que son la mitad de aquellos obtenidos con el uso de inhibidores específicos.

2- Determinación de la actividad de la tiroliberinasa

La evaluación de la actividad de tiroliberinasa en las condiciones reportadas (Bauer 1976) no dieron resultados reproducibles en los ensayos realizados en el laboratorio, por lo que la actividad de la enzima sérica fue evaluada en diferentes soluciones. La figura 3 muestra que la ausencia de inhibidores (exista o no DTT) provocó que la formación de $^3\text{H-His-Pro-NH}_2$ no fuera lineal a lo largo del tiempo. La tabla 2 indica que es en las soluciones 3 y 4 (sin y con DTT respectivamente, pero en presencia de inhibidores de las enzimas solubles) donde la actividad de la tiroliberinasa es aproximadamente lineal. En base a estos resultados elegimos la solución 3 (Tris-HCl / Bac-Nem) para la evaluación de la actividad de la enzima sérica. No se observó diferencia por la temperatura a la cual fue colectada la sangre para la obtención de suero (tabla 2).

3- Actividad de PGA en condiciones de hipo, hiper o eu- tiroidismo
Algunos de estos resultados se encuentran en la publicación 1 y solo se mencionaran brevemente.

a- Actividad de la PGA I (enzima soluble)

La tabla 3 muestra la actividad de PGA I evaluada en animales hipertiroideos; en ningún tejido se observaron cambios debidos al tratamiento con T_3 durante 7 días comparado con la respuesta de los tejidos sin tratamiento.

b- Actividad de la PGA II (enzima membranal)

Es en la adenohipófisis (uno de los órganos blanco del TRH) donde se observaron los cambios más significativos; durante el hipotiroidismo, ésta disminuye (80%) y se incrementa durante el hipertiroidismo (267%)(tabla 4). Los efectos de la hormona tiroidea sobre la actividad enzimática se observan desde las 12 h después su administración; la actividad de la PGA II sigue incrementandose a lo largo del tratamiento alcanzando su máximo a los 3 días tras lo cual parece estabilizarse, para disminuir un poco a los 7 días de administración de T_3 (fig 4). La dosis a la cual se observó un efecto significativo fué de 10 ug de T_3 / 100 g de peso corporal, aunque del análisis de la curva dosis respuesta se presume que dosis menores provocarían ya un efecto sobre la actividad de la enzima. Es notable que la actividad parece aumentar sin alcanzar un máximo por lo menos hasta 40 ug / 100 g p.c. de T_3 (fig 4).

Como se indica en el artículo la terapia reitutiva en animales hipotiroideos muestra que dosis de 3.2 ug / 100 g p.c. recuperan la actividad de PGA II encontrada en animales eutiroides (verificando el estado tiroideo mediante RIA de T_3 en sangre).

A nivel del SNC la actividad de la enzima membranal en algunas regiones (tabla 4) no parece responder al tratamiento hormonal. Aunque en el caso del núcleo arcuato-eminencia media se observó tendencia al aumento en la actividad de PGA II en animales hipertiroideos, este cambio queda en el límite de la significancia estadística.

La actividad de la PGA II evaluada en la corteza de animales hipertiroideos parece resistente al cambio ya que ni en la curva dosis respuesta ni en la cinética a lo largo de 7 días se observaron cambios significativos (fig 5); el ligero incremento "relativo" en la actividad de la enzima observada al septimo día es debido a que el valor numérico del control en este día es menor aunque no difiere de manera significativa del resto de los controles.

En contraste la actividad de la PGA II evaluada en el lóbulo olfatorio durante la terapia reitutiva se incrementó de acuerdo a la dosis de T_3 administrada (tabla 5).

4- Actividad de Tiroliberinasa

Como se mencionó en la introducción, la actividad de la enzima sérica varía en los diferentes estados tiroideos por lo que se utilizó como control. Confirmamos que la actividad de la tiroliberinasa se incrementa durante el hipertiroidismo y disminuye en el hipotiroidismo. A diferencia de la enzima hipofisaria a tiempos de tratamiento de 12 o 24 h no hubo incremento significativo de esta actividad; es a los 3 días (no evaluada entre 24 y 72 h) de tratamiento que ésta aumentó. La máxima actividad se observó a los 5 días de tratamiento para después disminuir a los 7 días (fig 6).

La dosis mínima de T_3 a la cual responde la tiroliberinasa fue de 20 ug / 100 g p.c. La magnitud de respuesta de la tiroliberinasa a las hormonas tiroideas es menor que aquella de la adenohipófisis cuando los animales son llevados del estado eutiroides al hipertiroideo (los cambios en la curva dosis-respuesta fueron menores para la enzima sérica) (fig 6).

El comportamiento de la tiroliberinasa durante la terapia reconstitutiva con T_3 fue diferente al mostrado por la adenohipófisis; la disminución observada durante el hipotiroidismo es menor a la observada en la PGA II (solo 35% de disminución contra 80% en la adenohipófisis). La dosis mínima de T_3 ensayada (1.4 ug / 100 g p.c.) reconstituye y sobrepasa la actividad de PGA II presente en los animales eutiroides (fig 7).

5- Efecto de T_3 adicionada "in vitro" sobre la actividad de PGA II

Algunas enzimas requieren de cofactores para expresar su actividad, éstos pueden ser iones mono o divalentes o bien biomoléculas de tamaño molecular variable. Para estudiar un posible efecto de la T_3 como cofactor, a través de un mecanismo no mediado por síntesis de la enzima, estudiamos su efecto "in vitro" sobre la actividad de la PGA II.

Tomando en cuenta la concentración de T_3 cuantificada por RIA en el suero de animales en los diferentes estados tiroideos, adicionamos la concentración correspondiente de T_3 a las preparaciones membranales en el ensayo de PGA II. La figura 8 muestra que en ningún caso obtuvimos cambios en la actividad de la PGA II bajo estas condiciones.

6- Cuantificación de TRH por RIA

Ya que en condiciones de hipo e hipertiroidismo la actividad de PGA II cambió en la adenohipófisis estudiamos la posibilidad de que se tratara de una respuesta enzimática a incrementos o decrementos en la cantidad de sustrato de acuerdo al estado tiroideo. Cuantificamos el contenido de TRH en los diferentes tejidos estudiados en actividad de PGA II. En condiciones de hipotiroidismo encontramos cambios en TRH únicamente en el hipotálamo (tabla 6).

7- Liberación de TRH

Se realizaron 2 experimentos con diferente manera de provocar el hipotiroidismo; el primero fué con ^{131}I (Ponce y col. 1988, experimento 2 de tabla 6) y la liberación fué evaluada en hipotálamo medio basal en rebanadas. La tabla 7 muestra que con esta estrategia no se observaron cambios en la cantidad de péptido liberado. Es importante recordar que esta manera de provocar el hipotiroidismo permite que el animal permanezca en "espera" periodos de tiempo largos hasta alcanzar esta condición.

En el segundo experimento los animales fueron llevados al estado hipotiroideo mediante la administración de propil tiouracil en el agua para beber durante varios días (PTU, agente goitrogénico que disminuye la actividad de la glándula tiroides). La liberación de TRH fué evaluada a partir de eminencia media; la tabla 8 muestra la diferencia en la concentración de TRH liberado al medio de incubación tras estimulación por alto potasio y el basal. Únicamente a los 3 días de administración de PTU se observó incremento significativo de la liberación del péptido, a tiempos de administración mayores no se observaron cambios.

8- Determinación de la actividad de PGA II en células adenohipofisarias en cultivo

Las hormonas tiroideas retroalimentan el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides afectando la actividad celular de sus componentes. Los efectos se manifiestan a nivel hipotálamico sobre la síntesis y posiblemente la liberación del TRH; mientras que a nivel hipofisario las hormonas tiroideas cambian la capacidad de respuesta de las células blanco del péptido alterando los procesos biosintéticos de la célula hipofisaria así como la degradación del TRH. Este mecanismo de retroalimentación del eje implica que las hormonas tiroideas sean transportadas en la sangre hasta alcanzar los órganos que afectan.

Existe una variedad de péptidos hipotalámicos que alcanzan la adenohipófisis y afectan las secreciones de la glándula; esta actividad requiere de receptores membranales que acoplados a diversos efectores, generan segundos mensajeros responsables de los procesos intracelulares. Este mecanismo generador de segundos mensajeros podría representar para la célula la posibilidad de regular los procesos degradativos del péptido de manera más rápida y local. Con el objeto de explorar esta posibilidad, se estudiaron los efectos de los compuestos que afectan la secreción hipofisaria sobre la actividad de la PGA II. Se eligieron familias de compuestos relacionados a la activación de la PLC y a incrementos en: AMPc, calcio intracelular y ácido araquidónico. También se evaluó el efecto de péptidos que al afectar alguna de la(s) vía(s) antes mencionada(s) provocan la secreción de prolactina.

Se estudió el efecto que los estrógenos provocan sobre la actividad enzimática. Finalmente se evaluó el efecto de la toxina pertussis (posible participación de una proteína Gi, Go) sobre la actividad de PGA II.

La figura 9 muestra la actividad de PGA II determinada en células adenohipofisarias en cultivo de 4 días; tal actividad fué determinada en dos medios diferentes DMEM y PBS. La actividad de PGA II fué ligeramente menor cuando se determinó en DMEM para todas las

concentraciones de T_3 utilizadas. Con estos resultados elegimos el PBS como medio para la determinación de la actividad de PGA II y 10^{-8} de T_3 .

Las manipulaciones que provocan cambios en la concentración intracelular de calcio no cambian (o ligeramente) la actividad de la PGA II; el A23187 (ionóforo cálcico) no cambió la actividad de PGA II evaluada a los 15 y 60 min (tabla 10). La despolarización por K^+ provocó un ligero cambio en la actividad aunque ésta solo fué evaluada a un tiempo de estimulación (tabla 9).

El incremento en AMPc ya sea administrando directamente el análogo no degradable 4-Br AMPc o, estimulando la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa con forskolina tampoco parecen provocar cambios significativos en la actividad de PGA II (tabla 10).

El tratamiento con el éster de forbol TPA, que mimetiza los efectos del DG producido en la célula tras activación de la fosfolipasa C, provocó cambios sorprendentes en condiciones de depleción de la actividad de la cinasa C. El tratamiento prolongado (14-16 h) con TPA resulta en una fuerte disminución de la actividad de PGA II de aproximadamente 51% (tabla 11).

El tratamiento prolongado (14-16 h) de las células con estrógenos parece "amortiguar" el efecto provocado por el TPA, ya que en las células pretratadas con E_2 /TPA la inhibición de la actividad de la PGA II es menor (E_2 /TPA 23% Vs TPA 51% de inhibición), mientras que el tratamiento con E_2 10^{-9} provocó un ligero incremento en la actividad enzimática (tabla 12).

De los péptidos estudiados ninguno provocó cambios significativos de la actividad de PGA II cuando se incubaba por tiempos cortos (1h 30min), si bien ellos estimulan la actividad de la PLC (A II), de la AC (VIP) o provocan la inhibición de esta última (SRIF) (tabla 13).

La incubación con dos de los péptidos que provocan la activación de la PKC provocaron a tiempos largos, efectos diferentes a aquellos provocados por el TPA. En el caso del tratamiento con A II no parece haber más que un ligero incremento en la actividad de la PGA II mientras que el TPA provocó disminución de aproximadamente 50% (tabla 14). Cuando las células fueron tratadas con TRH (14-15 h), la actividad de la PGA II se inhibe pero en menor proporción que la provocada por el TPA (tabla 14).

Es claro en este momento que el ácido araquidónico participa en el complejo sistema de regulación de la actividad hipofisaria. En nuestro modelo, la melitina (enzima que activa la PLA_2 incrementando la concentración de ácido araquidónico) incrementa la actividad de la enzima a tiempos cortos de estimulación (5 y 15 min) misma que tiende al valor control a tiempos superiores (fig 15).

La bromocriptina (BC) el agonista dopaminérgico provocó grandes cambios en la actividad de PGA II con 30 min de tratamiento, dosis de 10^{-8} M disminuyeron la actividad 21% mientras que 10^{-6} hasta 64 % respecto al control (tabla 16). El pretratamiento de la células con IAP (14-16 h) no parece modificar la respuesta de la BC ya que la inhibición de la actividad de la PGA II observada en células tratadas con IAP es ligeramente mayor a aquella provocada por la BC sola (tabla 17). La acción conjunta del IAP/TPA sobre las células, muestra un efecto mayor

a aquel provocado por el TPA (tabla 17).

Fig. 1 Cinética de la actividad de PGA II determinada en fracciones membranales con diferente concentración de proteína, preparadas por el método corto (a,b) o método largo (c,d). Las membranas fueron incubadas en presencia de bacitracina y N-etilmaleimida (inhibidores inespecíficos de las enzimas solubles PGA I y PPCE) (a,c y d) o PDMK y Z-pro-prolinal (inhibidores específicos) (b). La actividad esta expresada en $\text{cpm} \times 10^{-3}$ de His-Pro-NH₂ producido. La actividad enzimática se determinó en presencia de 10^{-6} M de TRH y 100,000 cpm de H³-pro-TRH.

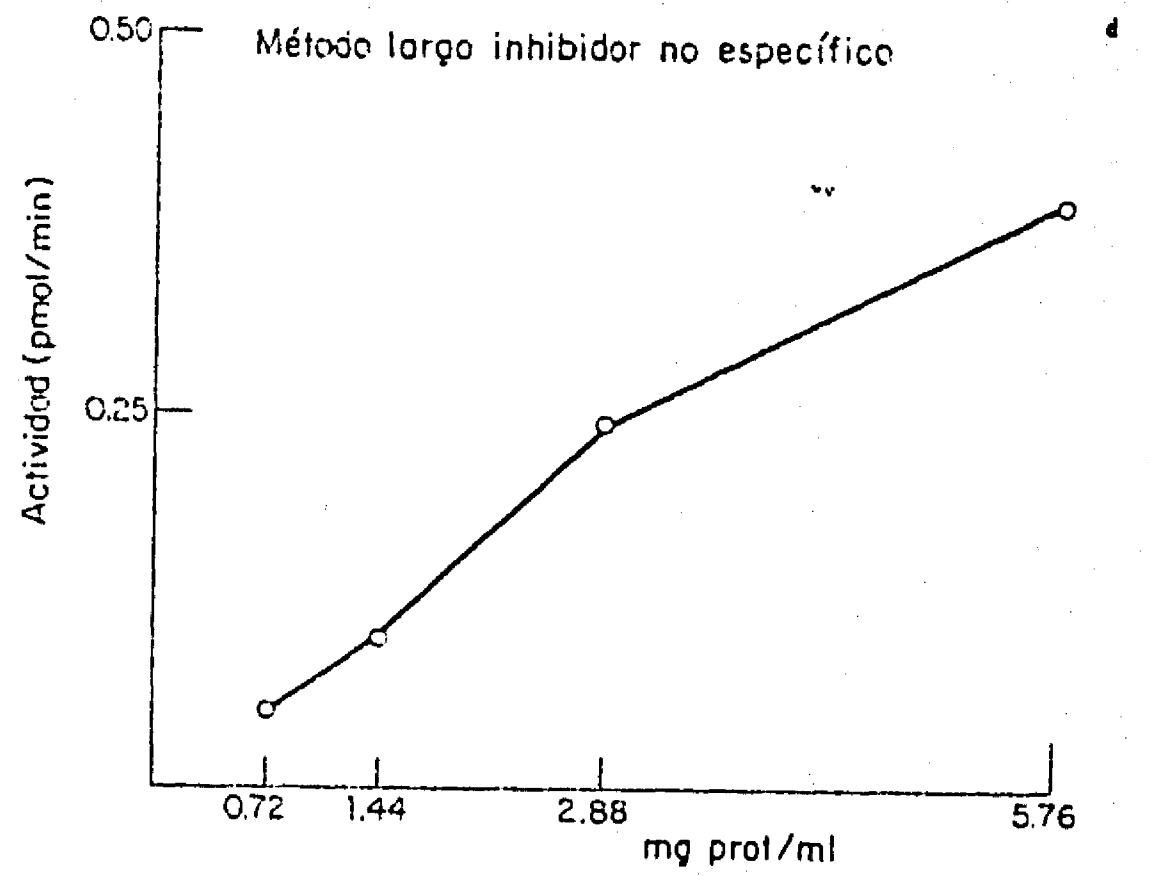
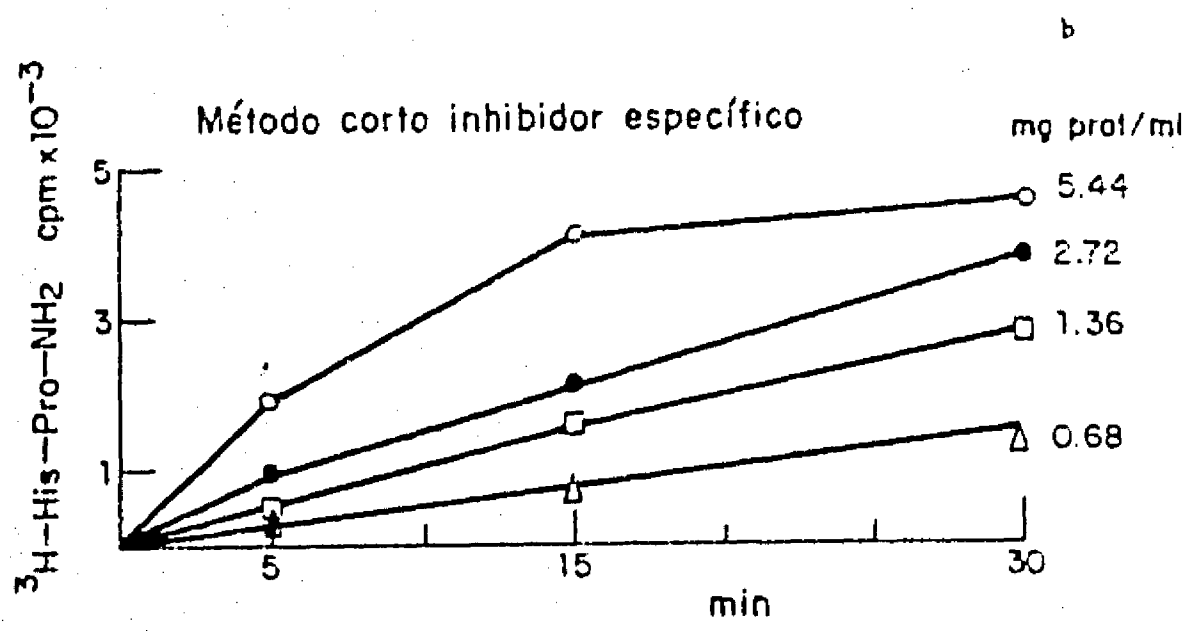
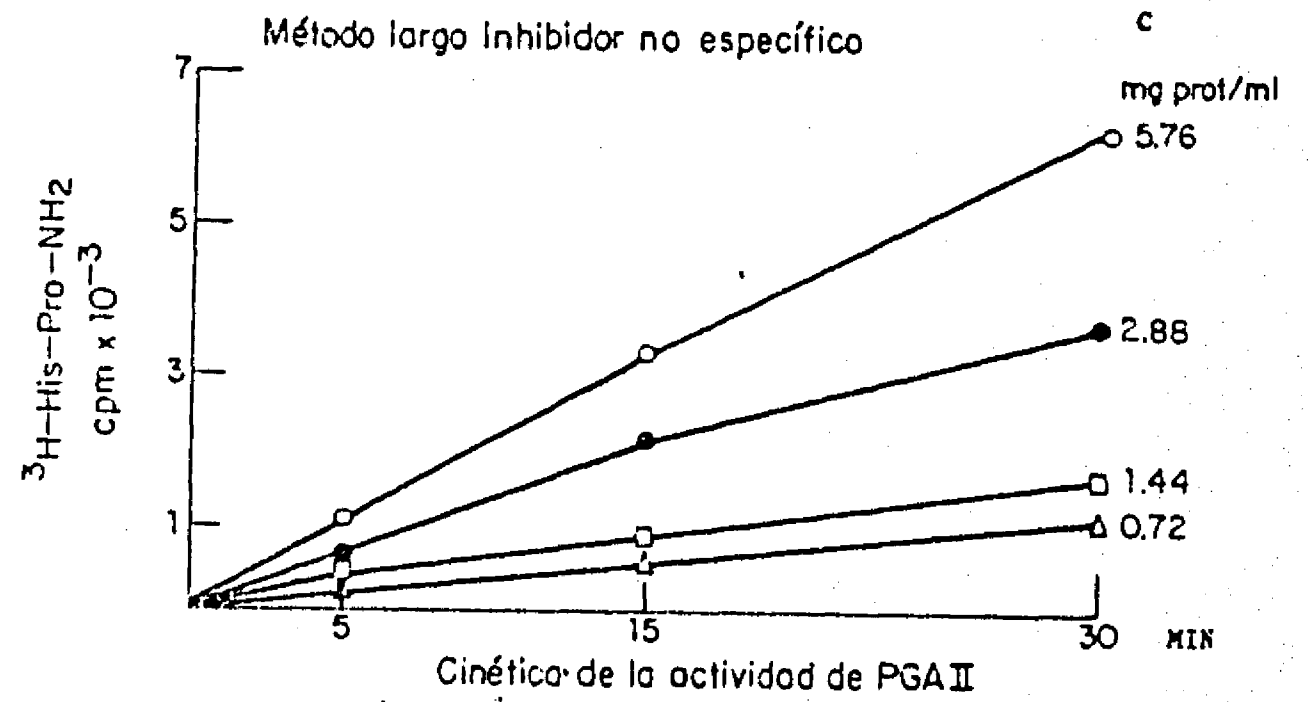
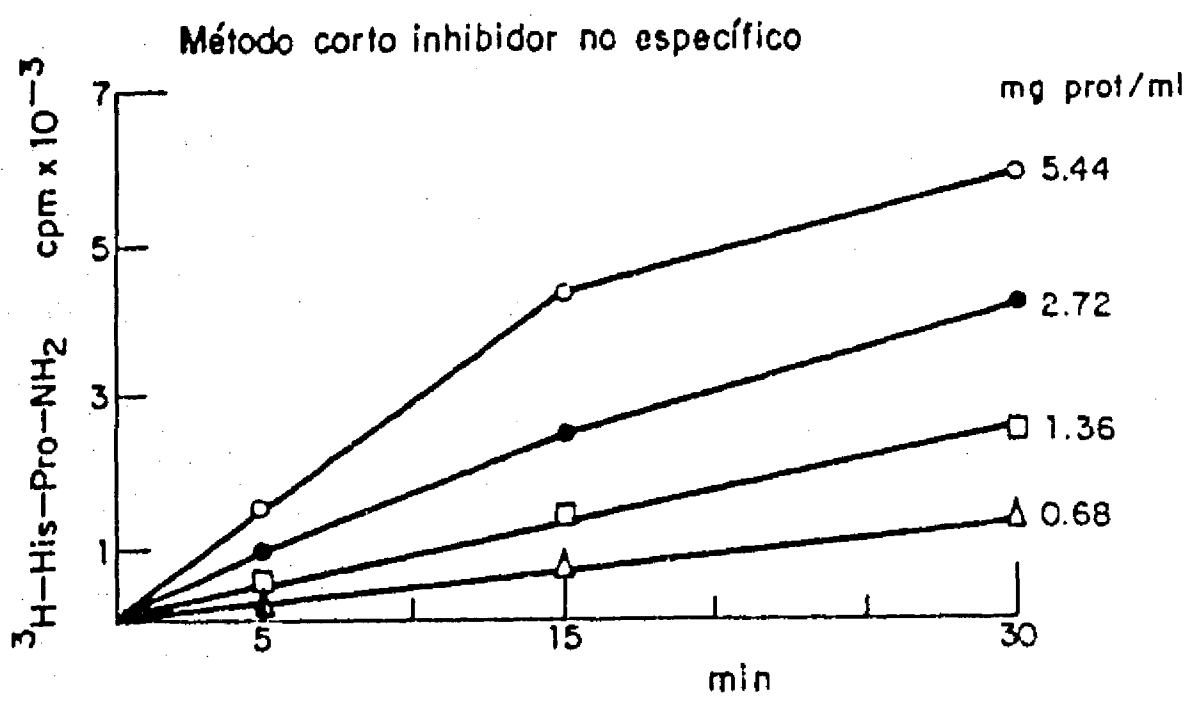
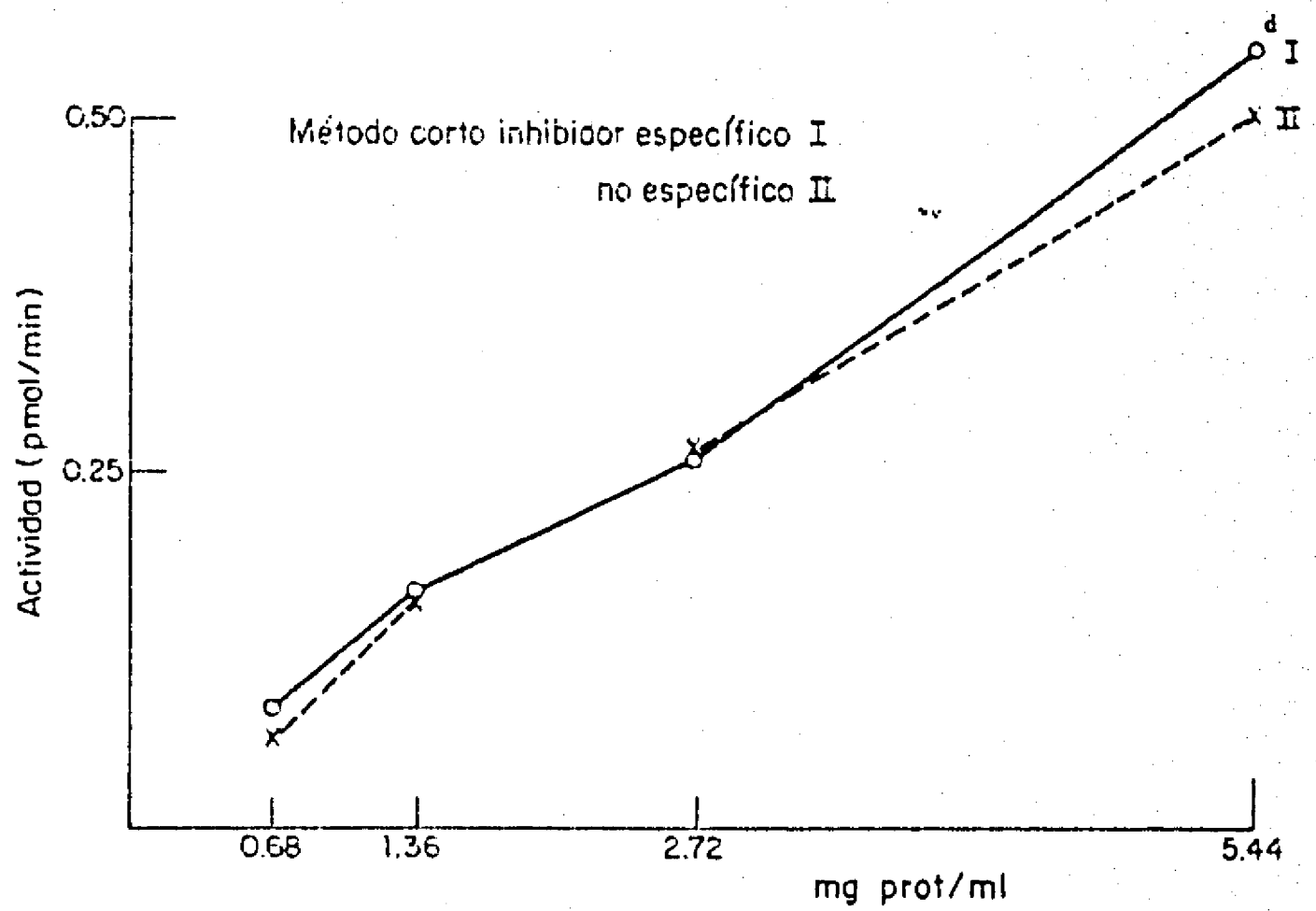
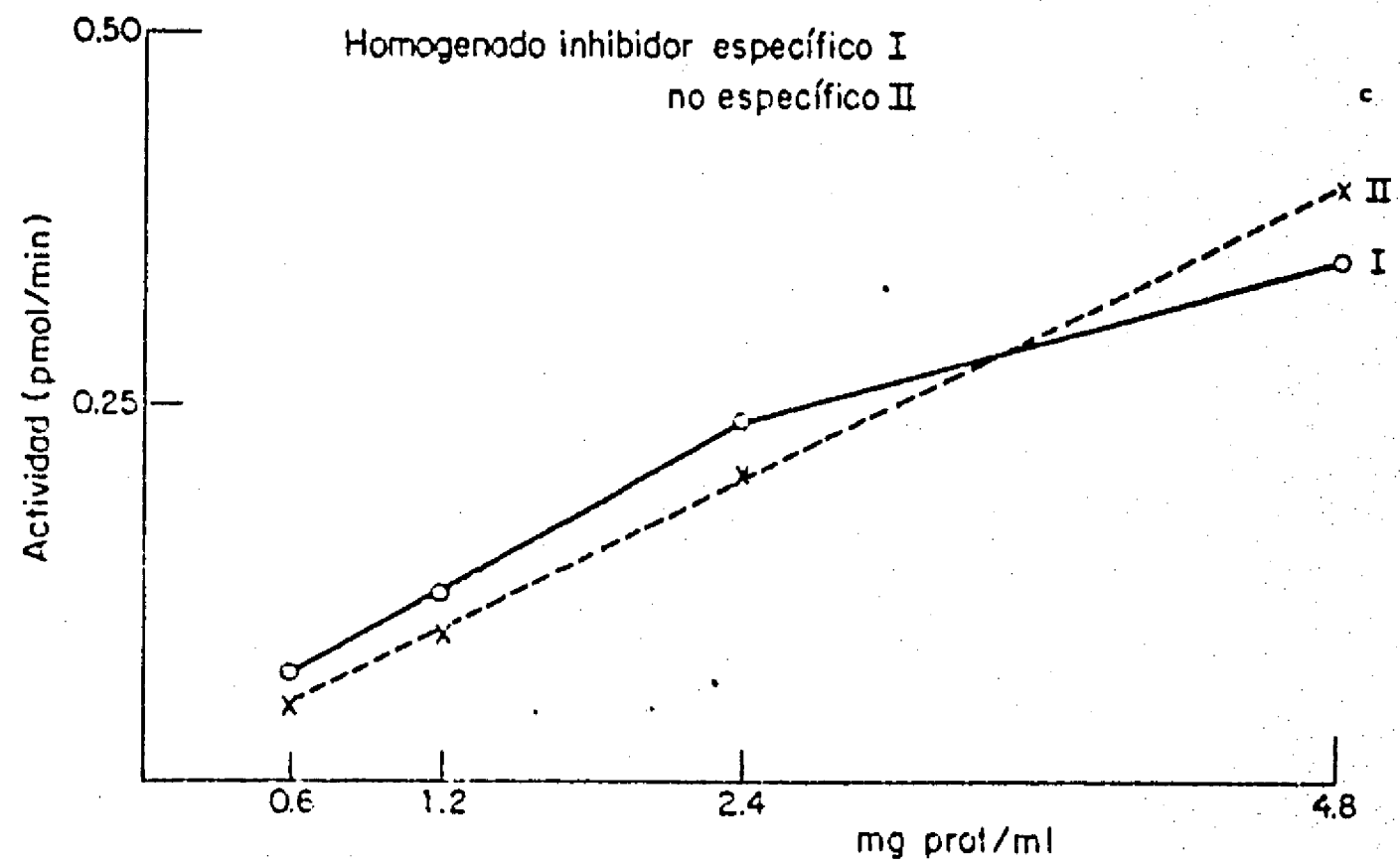
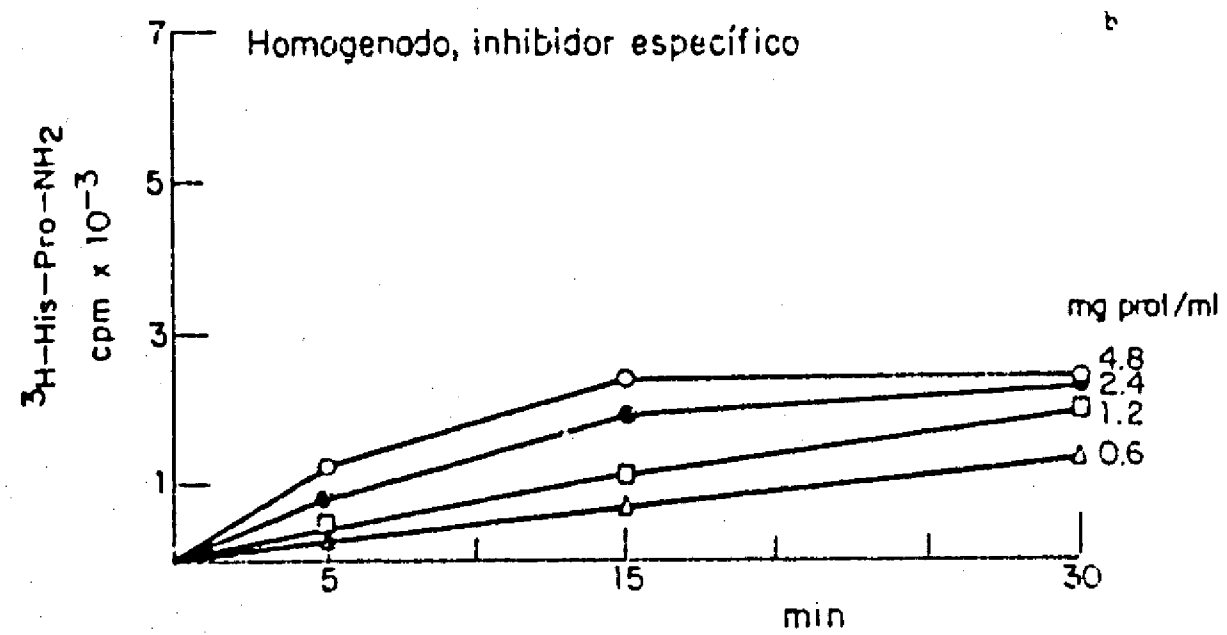
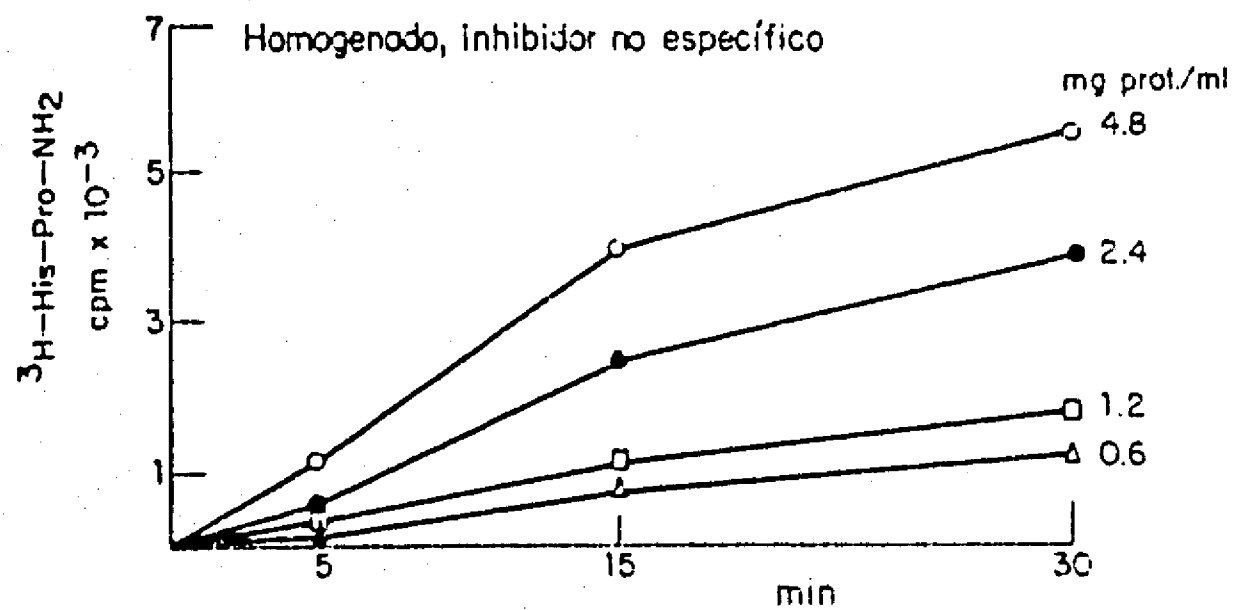


Fig. 2 Cinética de la actividad de PGA II determinada directamente en el homogenado en presencia de los inhibidores no específicos (a) o específicos (b). Actividad enzimática de PGA II en homogenado (c) y en preparaciones membranales preparadas por el método corto (d) calculadas a partir de la fig 2 a y b y de l a y b a 30 min.



V corto	NE	616
V corto	E	560
V largo	NE	610
Hom	NE	510
Hom	E	626
Son	NE	1271
Son	E	2490

Tabla 1 Comparación de diferentes métodos de homogeneización y obtención de membranas. Actividad total de PGA II en cerebro de rata (pmol de His-Pro-NH₂ / min); V: homogeneización con vástago, Son: sonicador, Hom: homogenado, NE: adición de inhibidores no específicos de las enzimas solubles, E: adición de inhibidores específicos (n=2).

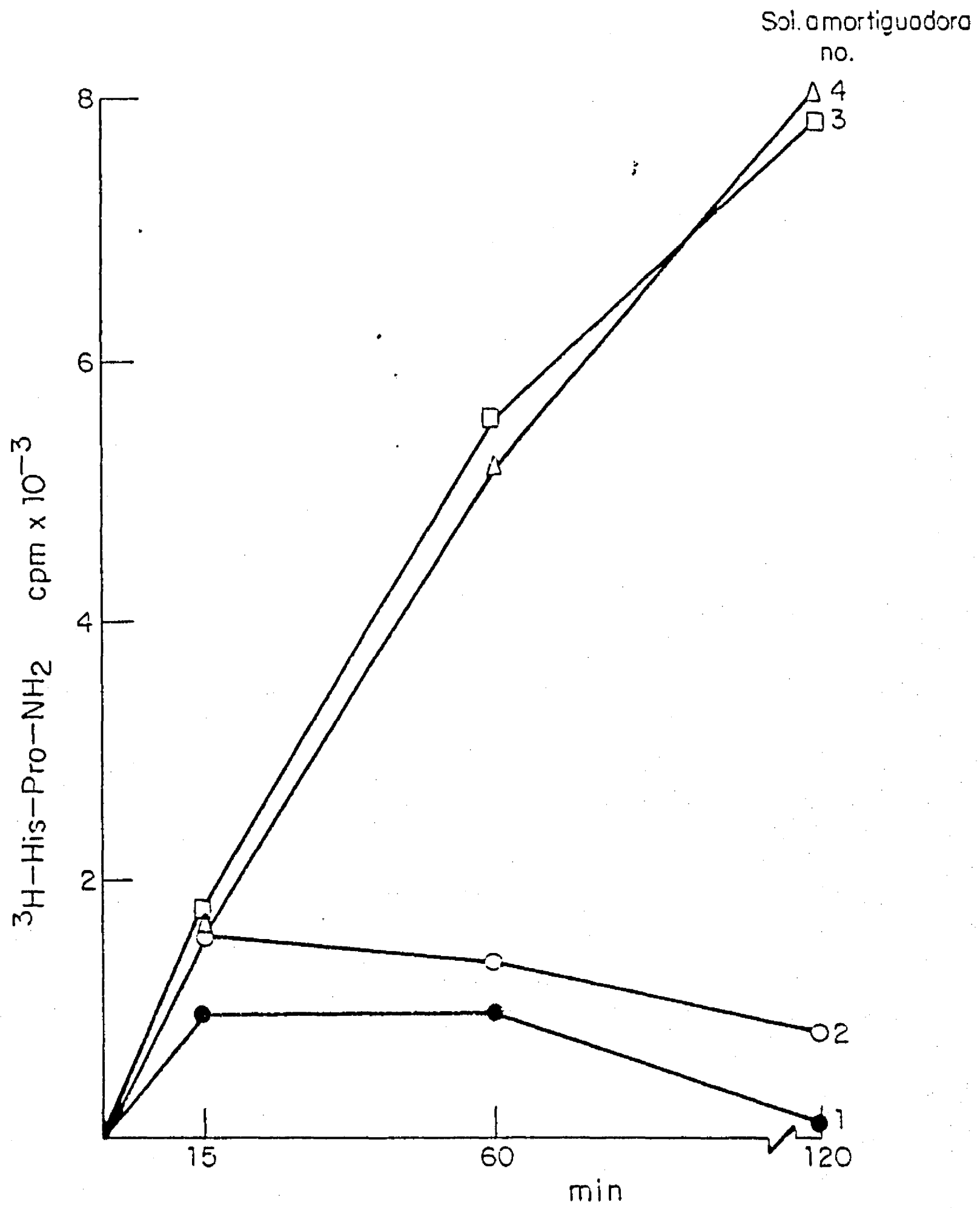


Fig. 5 Cinética de la actividad de tripsinasa en diferentes buffers. La sangre fué colectada a 4 °C y coagulada durante 2h a 4 °C y tras centrifugación a 5,000 rpm durante 15 min se recuperó el suero.

1: Tris-HCl 100 mM

2: buf 1 - DTT 0.5 mM

3: buf 1 - Bac/Nez

4: buf 1 - Bac/Nez

0.5 mM

Determinación de la actividad de Tiroliberinasa en diferentes buffers

tiempo (min)	1		2		3		4		°C
	4	22	4	22	4	22	4	22	
15	163	294	285	200	304	275	287	283	$\times 10^{-3}$
60	42	58	63	62	243	231	226	256	
120	4	15	18	12	170	173	175	211	

Tabla 2 Actividad específica de tiroliberinasa (pmol/min/mg prot). La sangre fué colectada a 4 o 22 °C y coagulada durante 2h a 4 °C y tras centrifugación a 5,000 rpm durante 15 min se recuperó el suero. El suero fué diluído 1:3 con Tris-HCl 100 mM pH 7.6

1: Tris-HCl 100 mM

3: buf 1 + Bac/Nem

2: buf 1 + DTT 0.5 mM

4: buf 2 + Bac/Nem
2.5 mM

Actividad de PGA I evaluada en animales hipertiroideos.

Adenohipófisis	90 ± 13	(4)
N.arcuato-E.media	95 ± 60	(8)
Resto del hipotal.	89 ± 17	(8)
N.accumbens	140 ± 27	(8)

Tabla 3 La actividad de PGA I se determinó en fracciones solubles de tejidos de animales hipertiroideos tratados durante 7 días con 20 ug / 100 g de p.c. de T₃. Los datos son el porcentaje respecto al control no tratado, X ± SEM, n se indica en paréntesis.

Actividad de PGA II en animales hipertiroideos

Adenohipófisis	367 ± 52	(7)
N.arcuato-E.media	198 ± 46	(5)
Resto del hipotal.	107 ± 10	(6)
N.accumbens	104 ± 6	(5)

Tabla 4 La actividad de PGA II se determinó en fracciones membranales de tejidos de animales hipertiroideos. Los resultados son el % de la actividad específica con respecto al control sin tratamiento, X ± SEM, n se indica entre paréntesis.

Fig. 4 Actividad específica (pmol His-Pro-NH₂ /min/mg prot) de PGA II durante el hipertiroidismo. A: cinética de la respuesta; B: curva dosis respuesta. Los animales fueron inyectados con 20 ug /100 g de p.c. de T₃ (a) o la concentración indicada (b). Los datos representan la $\bar{X} \pm \text{SEM}$ (n=4).

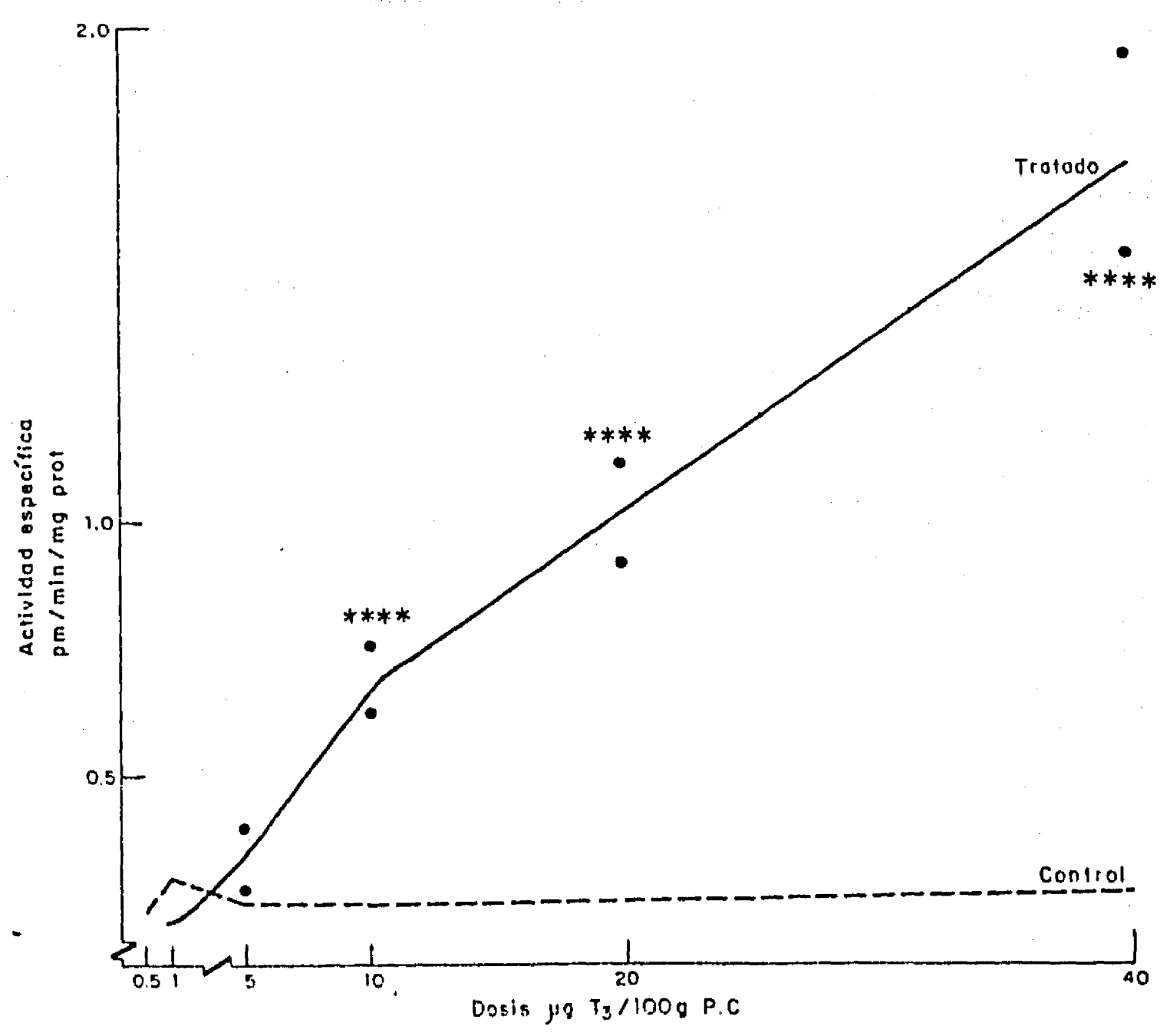
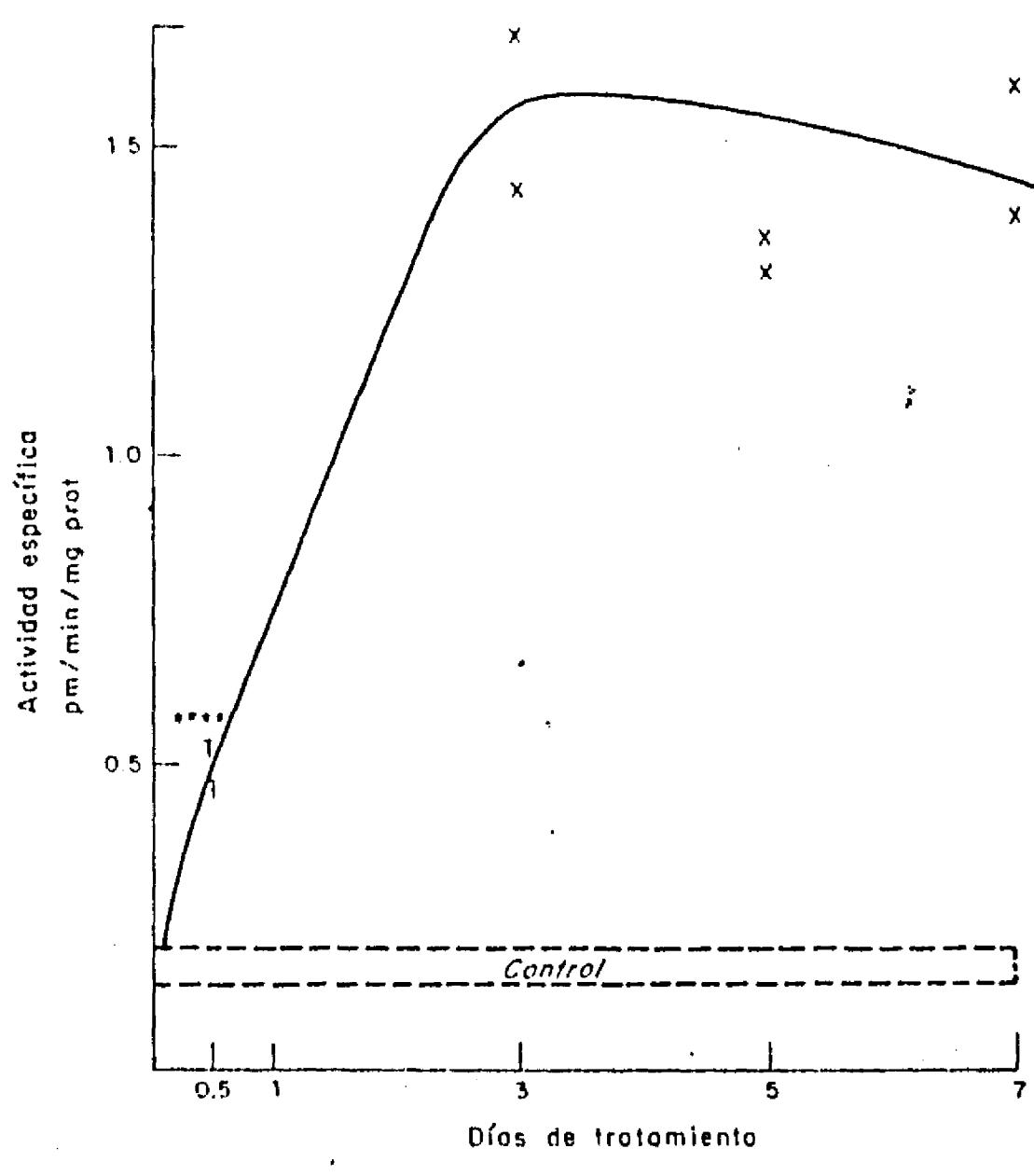
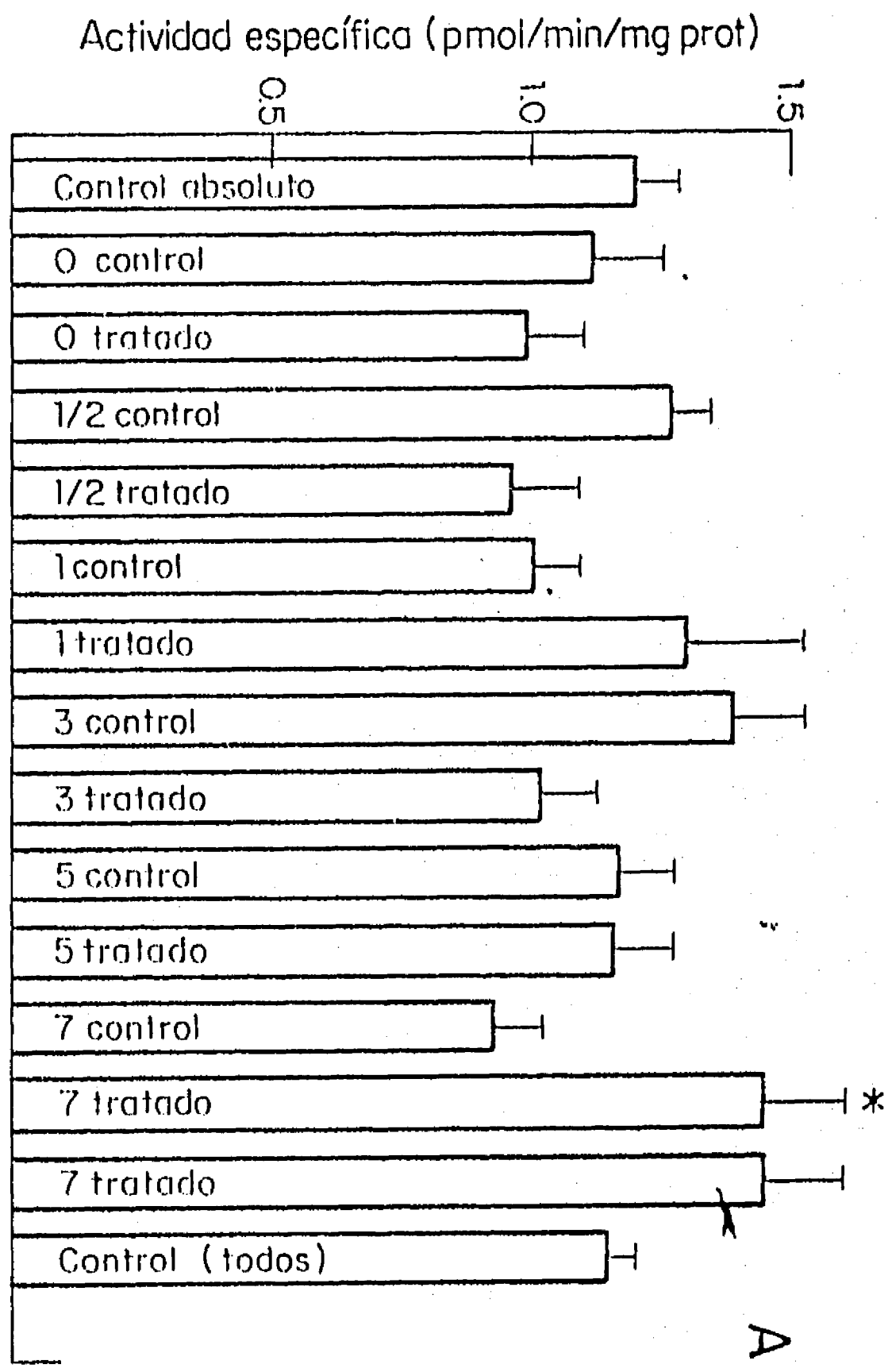
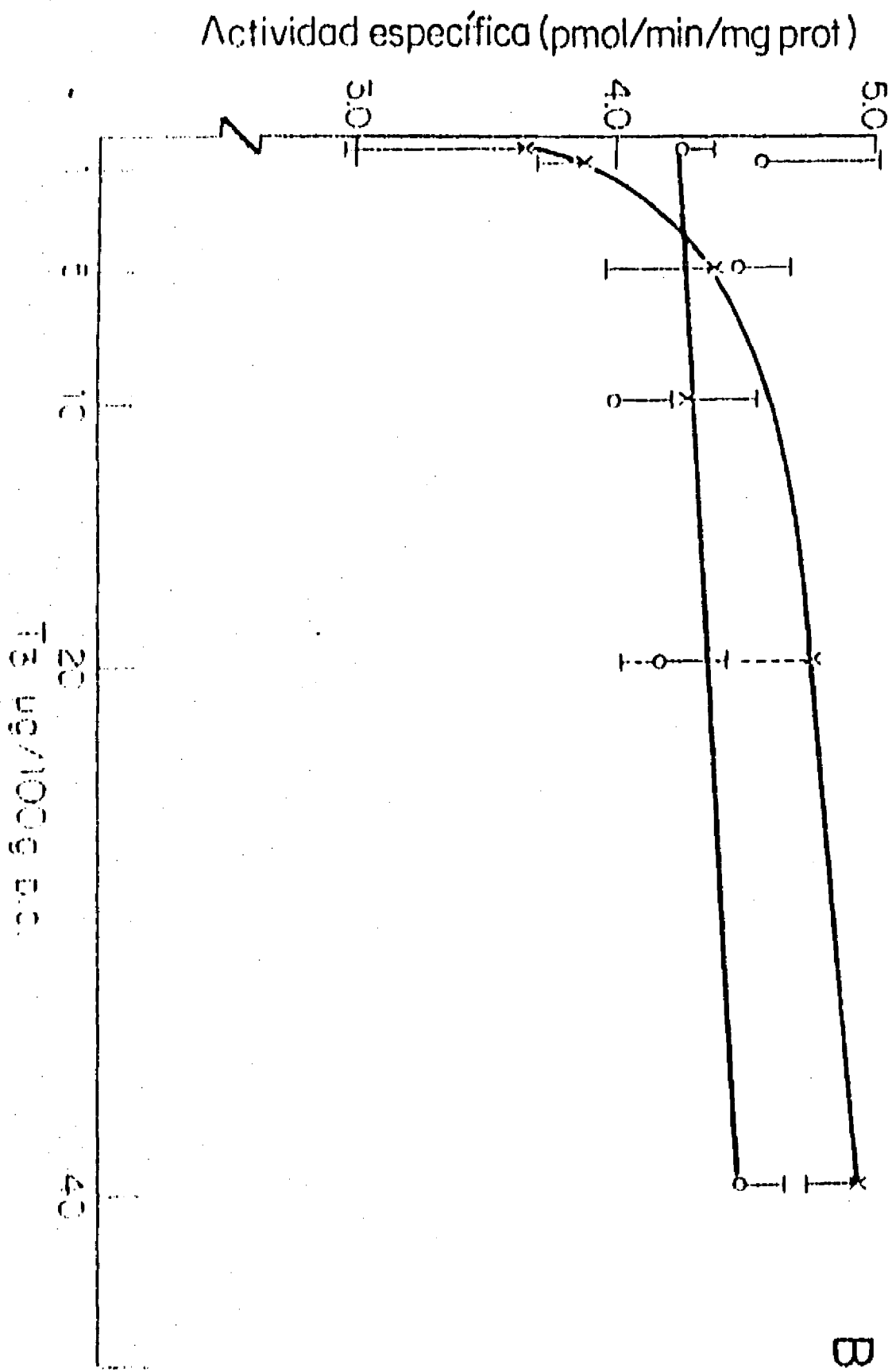


Fig. 5 Actividad específica de PGA II en corteza de animales hipertiroideos. Los animales fueron tratados durante el tiempo indicado con 20 ug / 100 g de p.c. de T_3 (A) o diferentes dosis (B). A: cinética de la actividad de PGA II (n=3); B: curva dosis-respuesta (n=4). Los datos son la $X \pm SEM$.

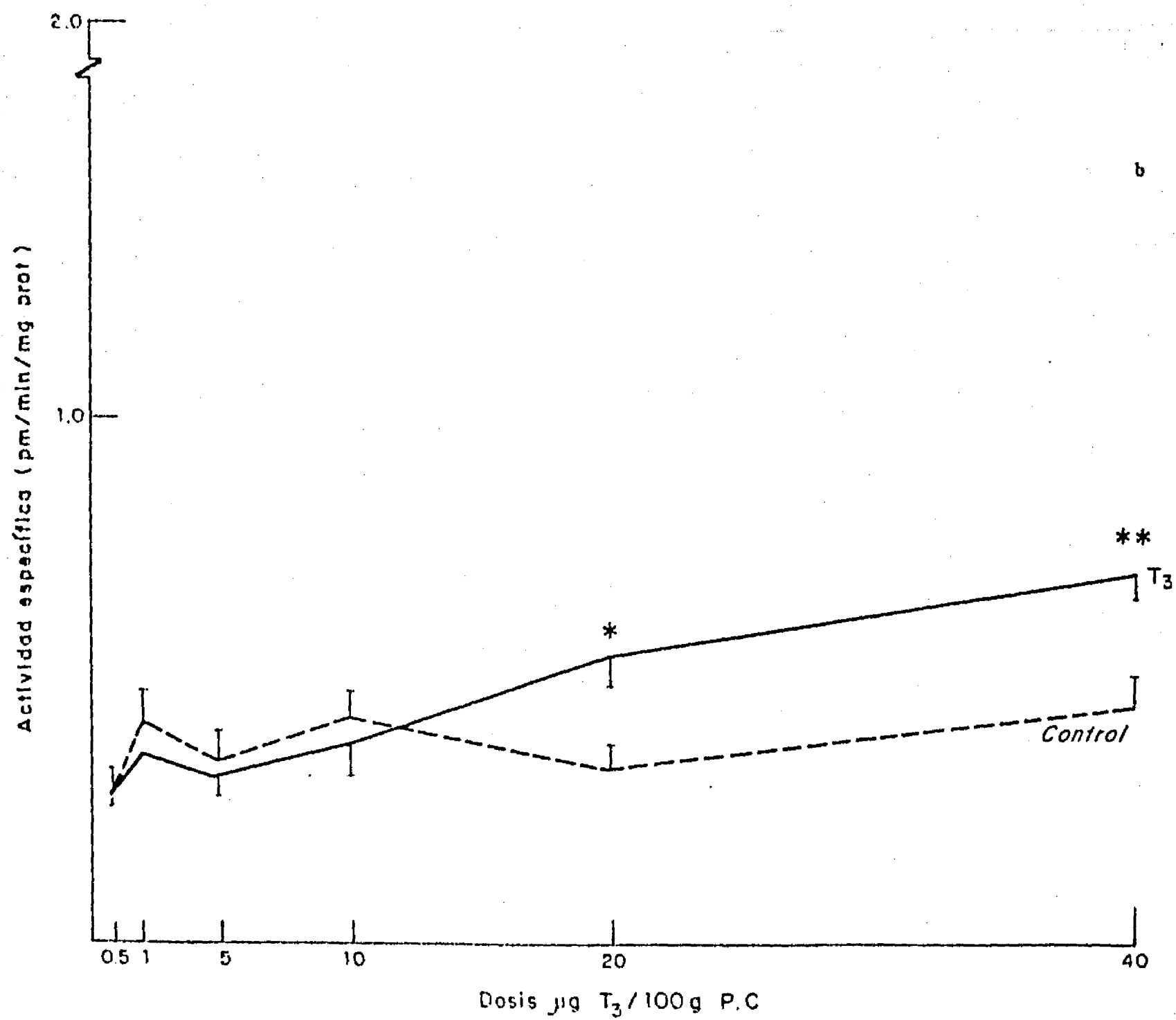
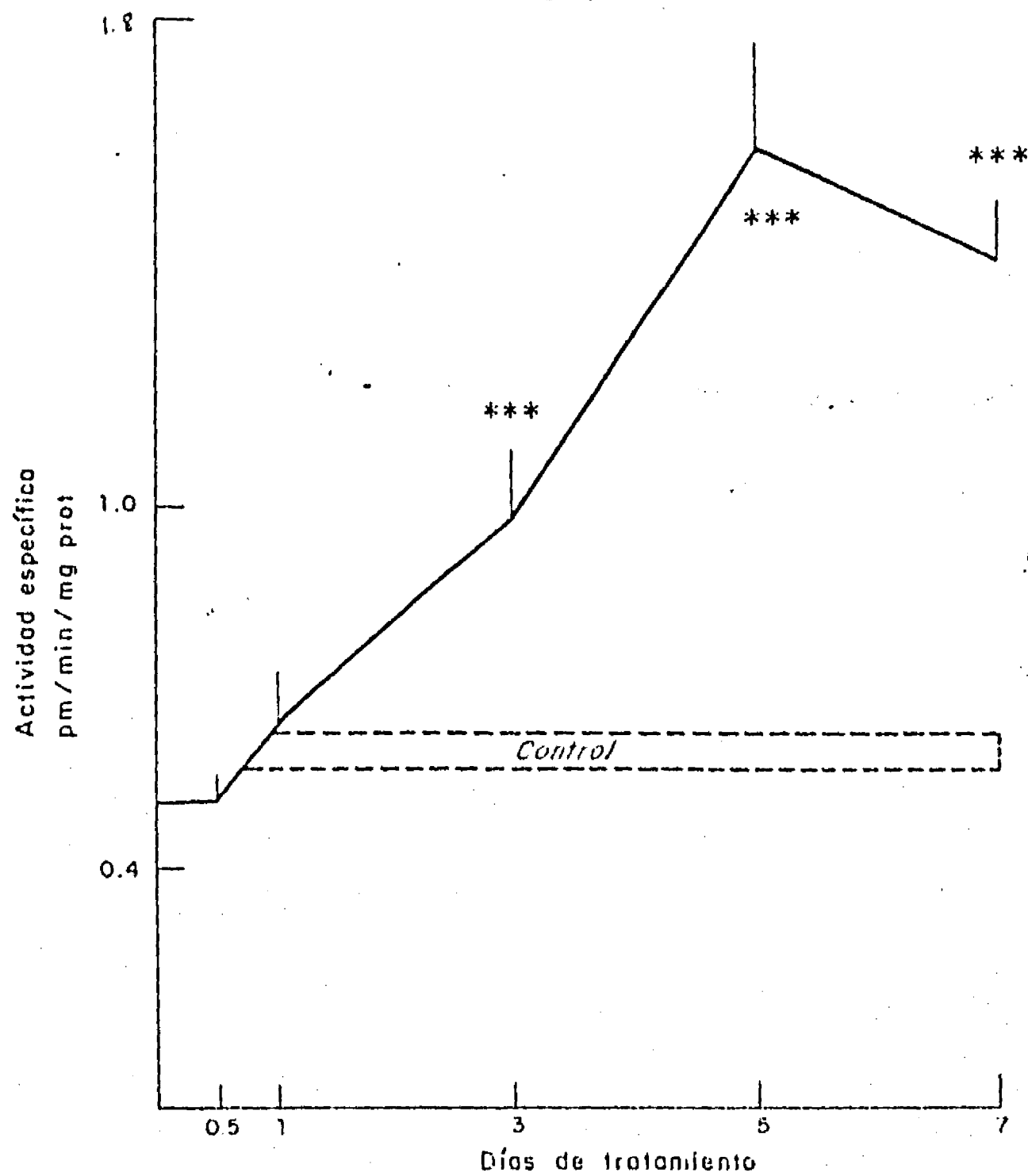


Actividad de PGA II en lóbulo olfatorio de animales hipotiroideos y terapia reconstitutiva con T₃

Hipotiroideo	0.74 ± 0.061 ***
Eutiroideo	0.53 ± 0.081
Hipo + 1.4 ug T ₃	0.91 ± 0.086
Hipo + 3.2 ug T ₃	1.0 ± 0.162
Hipo + 6.4 ug T ₃	1.16 ± 0.109 **

Tabla 5 Actividad específica de PGA II (pmol de His-Pro-NH₂ /min/mg prot). Los animales fueron llevados al estado hipotiroideo por tratamiento con PTU (250 mg / lt de agua) durante 7 días. A partir del estado hipotiroideo se administró la dosis de T₃ indicada. Los datos son la $\bar{X} \pm$ SEM (n=4).

Fig. 6 Actividad específica (pmol de His-Pro-NH₂ /min/mg prot) de tiroliberinasa durante el hipotiroidismo. A: cinética de respuesta; B: curva dosis-respuesta. Los animales fueron inyectados con 20 ug/100 g p.c. de T₃ o con la dosis indicada (b). Los datos son la X ± SEM³ de 6 determinaciones independientes.



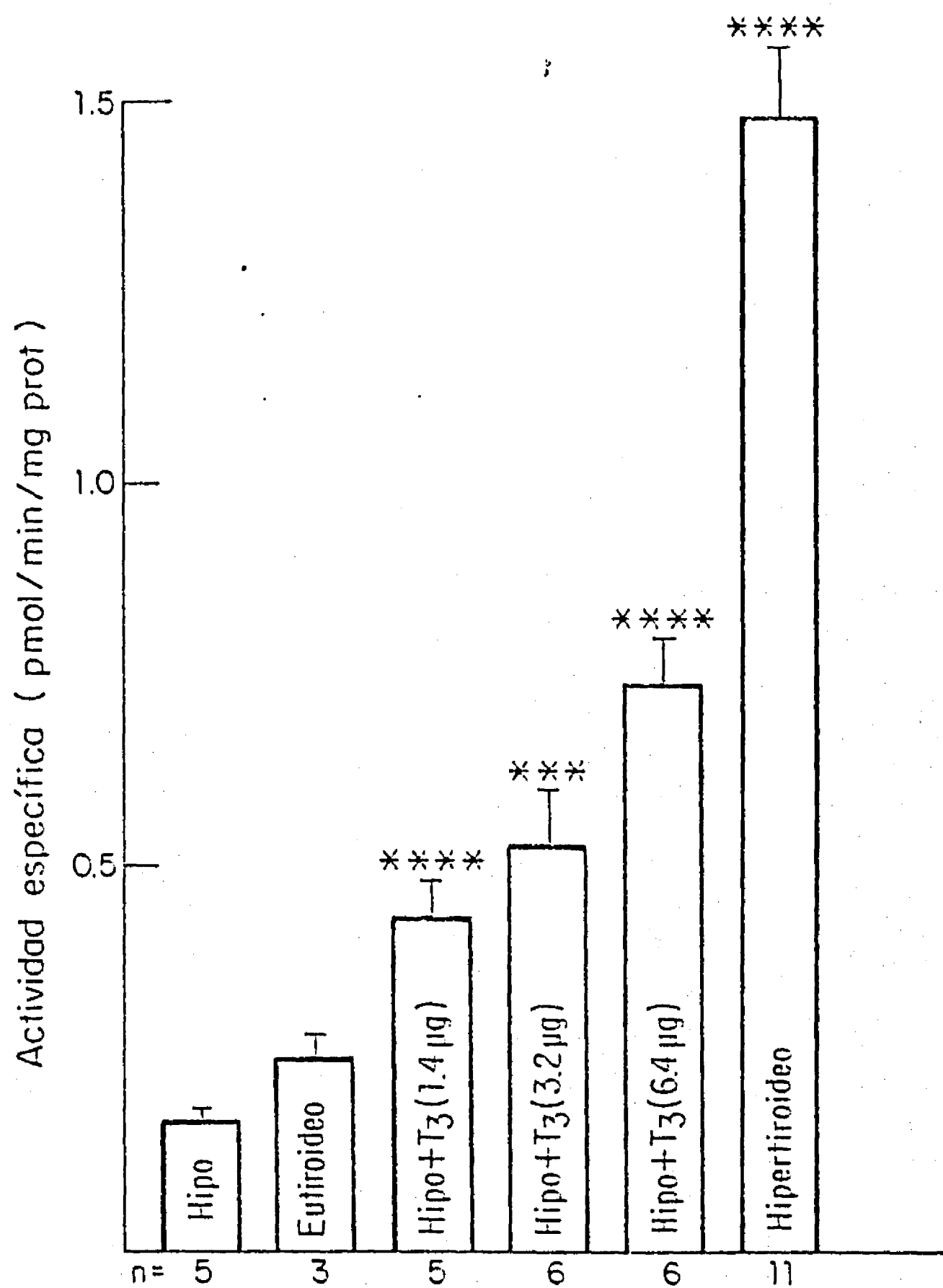


Fig 7 Actividad específica (pmol de His-Pro-NH₂ / min/mg prot) de tiroxina en animales hipotiroideos y terapia reconstitutiva. Los datos son la $\bar{X} \pm$ SEM, n se indica sobre el eje x.

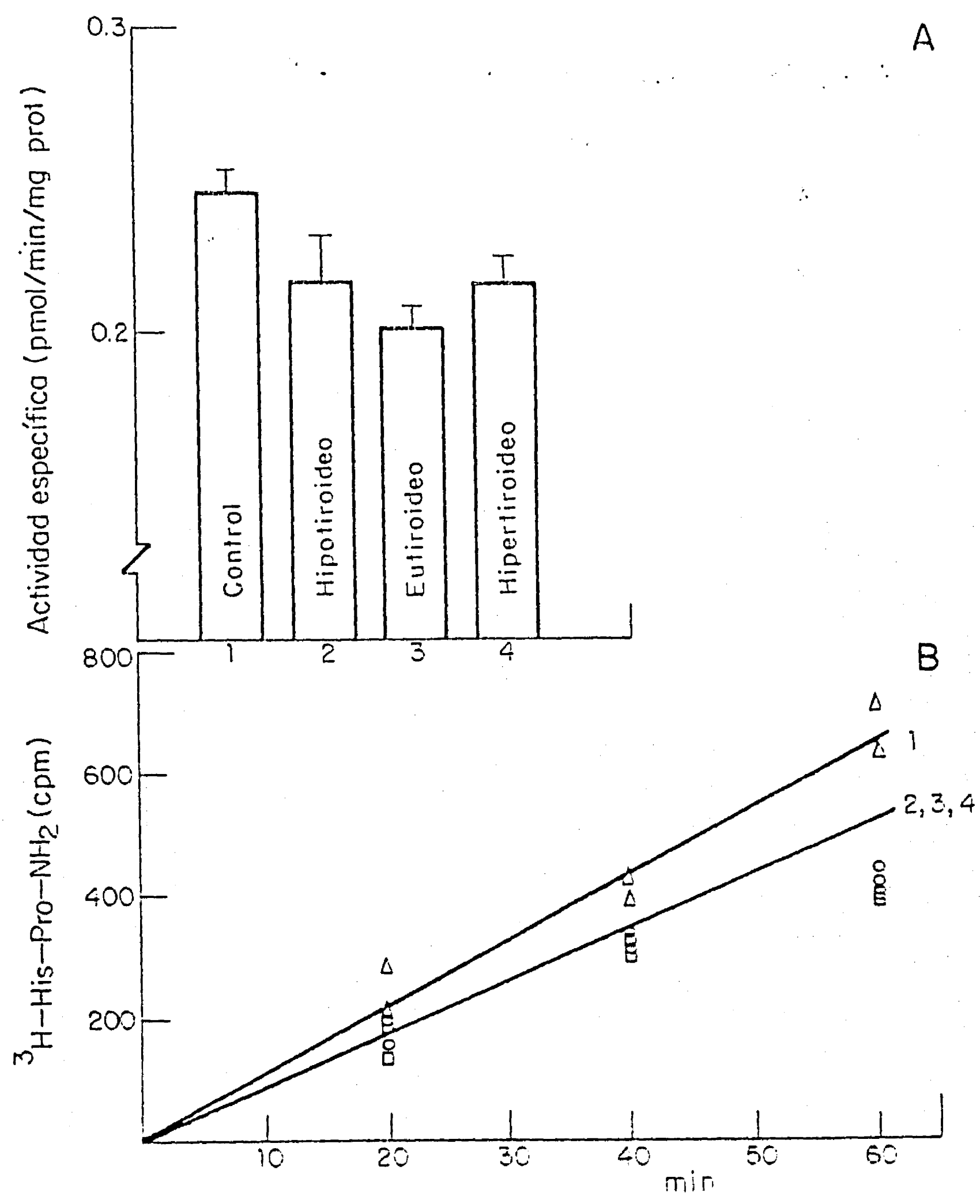


Fig. 8 Efecto de T₄ "in vitro". La T₄ fué adicionada de acuerdo a la concentración de T₄ en sangre determinada por RIA en los diferentes estados tiroideos. A) actividad específica de P₆. B) cinética de la actividad total de P₆ en las mismas preparaciones. En A los datos representan la $\bar{x} \pm$ SEM de 6 determinaciones.

Liberación de TRH de hipotálamo medio basal

	TRH pg/ mg prot
CONTROL	295 ± 48 (3)
TRATADO	264 ± 52 (4)

Tabla 7 La liberación de TRH fué evaluada como se describe en materiales y métodos. Los animales fueron llevados al estado hipotiroideo por administración de ¹³¹I y dieta baja en iodo. Los datos son la X ± SEM, n se indica entre paréntesis.

Liberación de TRH de eminencia media de animales hipotiroideos

días de trat. con PTU	TRH estimulado - TRH basal (pg)
0	28 ± 4
1	54 ± 14
3	67 ± 7 ***
7	29 ± 8
10	53 ± 14

Tabla 8 Los animales recibieron en el agua para beber PTU (250 mg/ lt). La liberación fué evaluada como se indica en material y métodos. Los datos son la X ± SEM, (n=4).

		pg/órgano	pg/ mg prot.
Hipotálamo	C	4902 + 301 (7)	1002 + 60
	T	6048 + 420 (13)	1300 + 86 ***
N.aracuato-	C	558 + 89 (3)	6278 + 1152
E. media	T	508 + 144 (9)	4066 + 730
S.lateral-	C	1011 + 80 (5)	399 + 33
N.accumbens	T	1121 + 132 (11)	406 + 52
Adenohip.	C	64 + 15 (3)	43 + 9
	T	57 + 3 (7)	39 + 10
Neurohip.	C	135 + 29 (6)	625 + 156
	T	88 + 15 (13)	390 + 60
L.olfat.	C	4504 + 553 (5)	533 + 83
	T	4025 334 (9)	412 + 35

Tabla 6 Contenido de TRH medido por radioinmunoanálisis en animales control (C) e hipotiroideas (T). Los datos son la X + SEM, n se indica entre paréntesis.

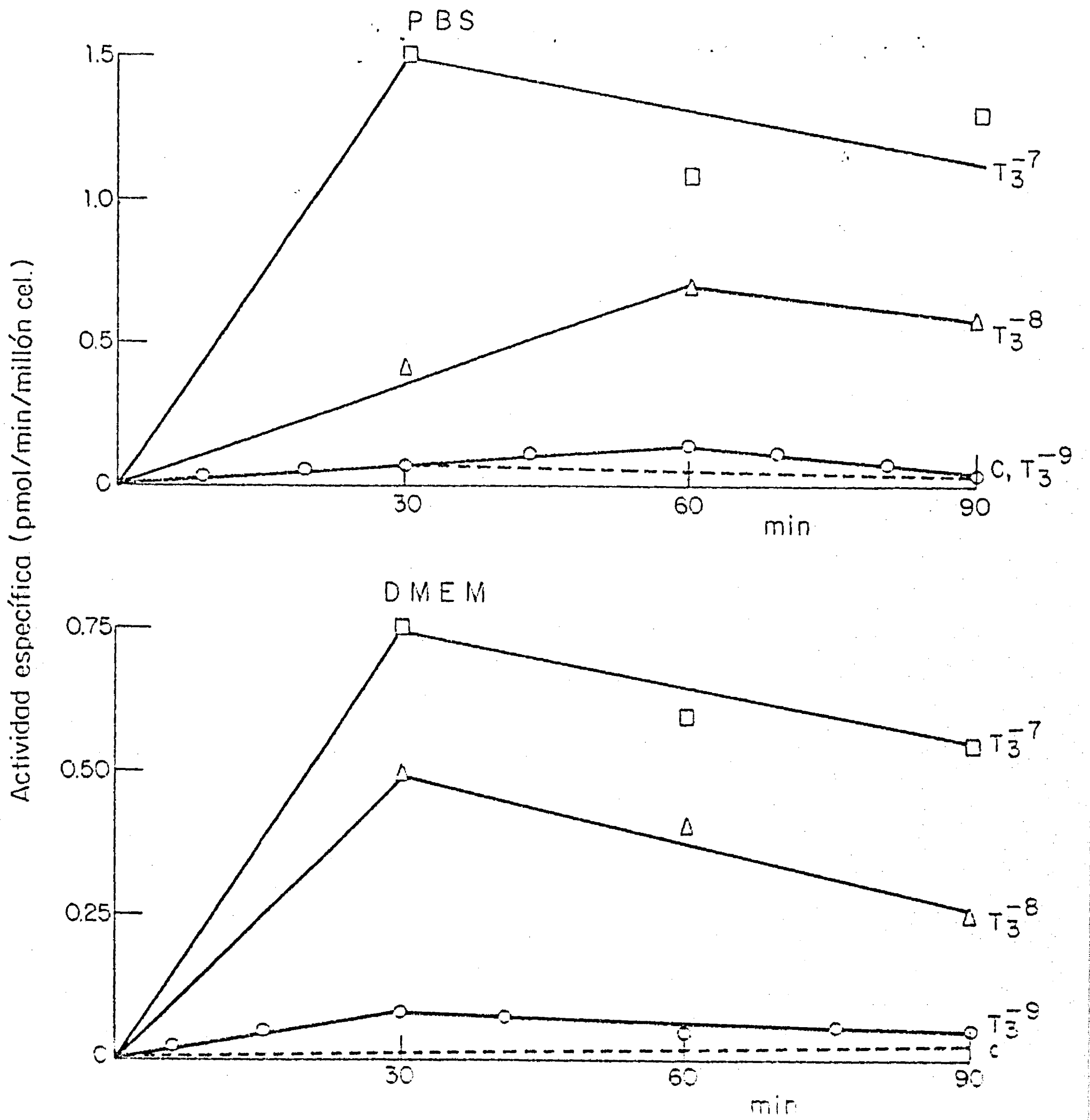


Fig. 9 Actividad específica de PGE II (pmol de His-Pro-GH₂ /min mg prot) de células adenocarcinomas en cultivo. Las células fueron tratadas con T₃ (concentración indicada) a partir del primer día de cultivo. La actividad de PGE II se determinó en los medios PBS y DMEM en presencia de T₃ 10⁻⁷ M y 300.000 cps de ³H-Pro-TXA.

Actividad de PGA II en células adenohipofisarias en cultivo en presencia del ionóforo A 23187 o alto potasio.

min	control	alto potasio	A 23187
15	100 ± 6 (10)	-----	106 (2)
30	100 (2)	140 ± 2 (3)	-----
60	107 ± 7 (10)	-----	118 ± 3 (3)

Tabla 9 Las células fueron estimuladas durante el tiempo indicado con A 23187 (1 uM) o potasio (56 mM). Los datos son el porcentaje de la actividad específica con respecto al control (c=100%), X ± SEM n, se indica entre paréntesis.

Efecto de la estimulación del sistema adenilato ciclasa sobre la actividad de PGA II en células en cultivo

min	control	Fk	8-Br AMPc
15	100 + 6 (10)	113 + 12 (3)	79 + 4* (3)
60	107 + 7 (10)	98 + 14 (3)	126 + 8 (3)
120	100 + 4 (4)	110 + 6 (3)	-----
180	100 (2)	112 + 7 (3)	-----

Tabla 10 Las células fueron estimuladas durante el tiempo indicado y la PGA II determinada en presencia de los compuestos, forskolina (Fk, 10 uM) y 8-Br AMPc (100 uM). Los datos son la X ± SEM del porcentaje de actividad con respecto al control, n se indica entre paréntesis.

Actividad de PGA II en células en cultivo, efecto del TPA

tiempo min	control	TPA
0	100 \pm (2)	91 (2)
5	100 \pm 5(3)	95 (2)
15	100 \pm 10(3)	92 (2)
30	101 (2)	116 \pm 3 (3)
60	100 \pm 4(4)	106 \pm 1 (4)
90	102 (2)	91 (2)
120	100 \pm 4(4)	95 \pm 6 (4)
o.n	100 \pm 6(6)	49 \pm 3 (6)***

Tabla 11 Las células fueron tratadas con TPA (1 μ M) durante el tiempo indicado (o.n 14-16h). Los resultados estan expresados como el % de actividad con respecto al control, X \pm SEM.

Actividad de PGA II en células en cultivo pretratadas con estrógenos

	control	pretrat(14-16h)
E ₂ 10 ⁻⁹	100 (2)	124 (2)
E ₂ 10 ⁻¹⁰	100 (2)	89 (2)
TPA/E ₂ 10 ⁻⁹	100 \pm 6 (4)	77 (2)
TPA/E ₂ 10 ⁻¹⁰	100 \pm 6 (4)	54 (2)
TPA	100 \pm 6 (6)	49 \pm 3 (6)***

Tabla 12 Las células fueron pretratadas con estrógenos, TPA o ambos. El % de actividad fué calculado contra su propio control no tratado, X \pm SEM.

Actividad específica de PGA II en células en cultivo

	15	60	min
CONTROL	100 \pm 6 (10)	107 \pm 7 (10)	
A II	107 \pm 4 (3)	92 \pm 6 (3)	
SRIF	92 \pm 17 (3)	113 \pm 6 (3)	
VIP	98 \pm 11 (3)	121 \pm 3 (3)	

Tabla 13 Las células fueron incubadas con el péptido durante el tiempo indicado. Los datos representan el % de actividad con respecto al control, $X \pm$ SEM.

Actividad de PGA II en células adenohipofisarias en cultivo en presencia de melitina (activador de la PLA_2)

min	control	melitina
5	100 \pm 5 (3)	128 \pm 6*(3)
15	100 \pm 10 (3)	137 \pm 8*(3)
30	100 \pm 6 (5)	110 \pm 9 (3)
60	107 \pm 7 (10)	112 \pm 2 (3)

Tabla 15 Las células fueron tratadas durante el tiempo indicado con melitina (0.5 ug/ml). Los datos son el % de actividad respecto al control, $X \pm$ SEM.

Actividad de PGA II en células adenohipofisarias en cultivo
Efecto del pretratamiento con TRH , A II o TPA.

tratamiento	control	pretratamiento
		<u>TPA</u>
TPA/ AII	93 + 6 (4)	50 + 2 (4)***
A II	100 + 2 (6)	44 + 2 (4)***
TPA	100 + 6 (6)	49 + 3 (6)***
		<u>A II</u>
A II	100 + 2 (6)	115 (2)
TPA	100 + 6 (6)	120 (2)
		<u>TRH</u>
TRH	100 (2)	72 (2)
TPA	100 + 6 (6)	75 (2)

Tabla 14 Las células fueron pretratadas 14-16 h con TRH, A II o TPA (1uM). Los datos son la X + SEM de la actividad de PGA II en presencia de A II o TPA (tratamiento).

Dosis respuesta de la actividad de PGA II en células adenohipofisarias en presencia de bromocriptina, análogo dopaminérgico (BC).

CONTROL	100 ± 6 (5)
BC 10 ⁻⁹	112 ± 6 (3)
" 10 ⁻⁸	79 ± 2 (3)**
" 10 ⁻⁷	74 ± 8 (3)*
" 10 ⁻⁶	36 ± 5 (3)***

Tabla 16 El agonista dopaminérgico fué adicionado 30 min antes de la determinación de la actividad enzimática. Los datos son el % de actividad respecto al control, X ± SEM.

Actividad de PGA II. Efecto de la bromocriptina en células pretratadas con TPA (éster de forbol activador de PKC) o PTX (t. pertussis).

	control	PTX	PTX/ TPA
control	100 ± 2 (4)	91 (2)	36 (2)
BC 10 ⁻⁷	86 ± 6 (4)	69 (2)	31 (2)
TPA	100 ± 6 (6)	-----	47 ± 4(4)***

Tabla 17 Las células fueron pretratadas (14-16h) con TPA (1 uM)/ PTX (100 ng/ml) o PTX. Los datos son la X ± SEM del % de actividad.

DISCUSION

El funcionamiento integral del organismo implica una intensa comunicación entre los diferentes sistemas que lo componen. Entre ellos es necesaria la comunicación constante entre los órganos que se encuentran constituidos por diversos tejidos y exigen que el conjunto celular trabaje en coordinación para responder a las necesidades puntuales y/o a larga duración que la homeostasis del organismo demanda.

El sistema neuroendócrino es un complejo constituido por diversos tejidos regulados por una amplia gama de biomoléculas. Uno de los mecanismos de regulación del sistema se ejerce a través de las hormonas cuya liberación depende de las secreciones hipofisarias; las hormonas de los órganos blanco pueden afectar el sistema tanto a nivel hipofisario como hipotalámico cambiando la actividad sintética, secretora o degradativa de las células, efectuando así su papel retroalimentador sobre el sistema neuroendócrino.

El papel regulatorio de las hormonas periféricas ha sido evaluado utilizando estrategias experimentales que provocan cambios poco fisiológicos de las concentraciones hormonales. Sin embargo es esta estrategia la que ha permitido evidenciar la participación de las hormonas periféricas en el control de la actividad celular.

Nuestros resultados muestran que en la adenohipófisis y en el suero, las hormonas tiroideas incrementan la actividad de las enzimas que degradan al TRH; enzimas de gran especificidad por el tripeptido, la PGA II y la tiroliberinasa (Bauer y col. 1979, 1981, O'Connor y col. 1985, Elmore y col. 1989). Las características de la respuesta de estas enzimas a las hormonas tiroideas es diferente.

La actividad basal de la PGA II en adenohipófisis, es ligeramente menor que aquella de la enzima sérica y la sensibilidad a las hormonas tiroideas parece también diferente ya que la misma dosis de T3 incrementa la actividad de la PGA II en adenohipófisis 4 veces, mientras que en la sangre la enzima aumenta su actividad solamente 1.5 veces. Se ha observado el efecto inverso cuando disminuye el nivel de hormonas tiroideas: el tratamiento con PTU (agente goitrogénico) disminuye la actividad de la PGA II 85% a los 16 días de tratamiento en la adenohipófisis, mientras que la enzima sérica disminuye solo de 35% a 40% (Bauer 1988 y este trabajo). El nivel máximo de enzima sérica alcanza el mismo valor en actividad específica que la PGA II hipofisaria solo que con 48 hr de retraso; al final del tratamiento con hormonas tiroideas se observa el mismo nivel de ambas enzimas.

Simultáneamente a este trabajo, Bauer (1988), reportó una cinética diferente de la activación de la PGA II por hormonas tiroideas; el máximo de actividad está a las 24 h después de la administración de T3. En nuestros resultados no se observa el máximo sino 72 h después. En el caso de la curva dosis-respuesta, la PGA II incrementa de manera paralela a la dosis de T3 y, aunque en este trabajo se requiere de una dosis de T3 mayor (5 veces mayor que la reportada por Bauer) la actividad correspondiente a la dosis máxima es similar en ambos trabajos (700% Bauer Vs 800% éste). Existen diferencias en los protocolos de administración de T3 y es posible que el metabolismo de éstas tenga una cinética diferente lo que pudiera explicar esta discrepancia. Suen y

col. 1989 observan incremento en la actividad de la PGA II hipofisaria solamente tras tratamiento agudo (24h) con T3 pero no con tratamiento crónico (40 ug /100 g p.c. durante 10-14 días). Es posible que entren en juego otros mecanismos en el control de la expresión de la PGA II hipofisaria en condiciones de estimulación crónica, o bien que las diferencias sean debidas a que estos investigadores realizan sus mediciones de actividad enzimática utilizando la hipófisis completa.

Se ha propuesto que la enzima sérica y la membranal por sus similitudes bioquímicas tengan el mismo origen. Es posible que la enzima membranal fuera liberada al torrente sanguíneo por algún mecanismo específico. Los resultados de nuestro laboratorio indican que la enzima de cerebro no se libera cuando se incuban rebanadas de hipotálamo medio basal en presencia de alto potasio, sin embargo, la despolarización es un estímulo inespecífico que no provoca la liberación de la enzima membranal y pudiera estar implicado otro por ejemplo, la estimulación de algún receptor específico. Esto sucede en las membranas de hipocampo donde, la acetilcolinesterasa se encuentra asociada a la membrana de las terminaciones nerviosas de manera no iónica y es la activación de la PLC la que conduce a la liberación de la enzima (Carrol y col. 1990). Este sería un mecanismo de aprovisionamiento de la enzima sérica tras liberación de la enzima membranal durante la estimulación por un agonista determinado.

En animales eutiroides la actividad de PGA II en lóbulo olfatorio es mayor que la de la hipófisis (es importante recordar que el lóbulo olfatorio es una zona rica en TRH, Kreider y col. 1985); resultados similares fueron reportados por Suen y col. 1989, sin embargo estos autores no encuentran incremento en la actividad enzimática tras administración de T3, contradicción que podría estar originada por el tipo de animal "hipertiroides" utilizado. Suen y col 1989 utilizan animales eutiroides llevados a hipertiroidismo por administración de grandes dosis de T3 durante tiempo prolongado. En nuestros experimentos, los animales fueron llevados al estado hipotiroides y restituidos en hormona tiroidea. El protocolo para provocar hipotiroidismo (¹³¹I) implica cambios en la dieta y largos periodos de espera; quizá, esto cambia las condiciones generales del organismo en un proceso de "adaptación" al nuevo estado por lo que estos resultados no pueden ser comparados aún sabiendo que ambos protocolos proporcionan animales hipertiroides.

Resultados previos (Suen y col. 1989) muestran incrementos en la actividad de PGA II en la corteza frontal; nuestros resultados no muestran cambio significativo de la actividad enzimática y quizá el ligero incremento observado al final de la cinética sea el resultado azaroso de la disección de una porción de la corteza frontal ya que nuestras disecciones se hicieron sin considerar ninguna región particular de la misma.

Dentro de los efectos mejor conocidos de las hormonas tiroideas se encuentran sus efectos sobre la síntesis de proteínas, mediados por el receptor nuclear (Oppenheimer y col. 1983). Este tipo de efectos requiere de un tiempo "lag" para la inducción de proteínas particulares; el período "lag" observado entre la administración de T3 y el efecto sobre PGA II sugiere que media un efecto nuclear de T3 involucrando síntesis de proteínas. Esto se apoya en la falta de efecto "in vitro" durante la determinación enzimática (Bauer 1988, y este trabajo).

Estos cambios hormona dependientes no están aislados de los que ocurren a otros niveles en la organización celular. El nivel de RNAm Pro-TRH así

como el de pro-TRH se incrementan durante el hipotiroidismo en las neuronas que circundan la región hipofisiotrófica y no en otros núcleos hipotalámicos (Segerson y col. 1987). Los cambios producidos por las hormonas tiroideas en determinadas zonas y no en otras, esta quizá relacionada al tipo de receptor a hormonas tiroideas (Izumo S y col. 1988, Vera y col. 1989), al metabolismo local de éstas (Fukuda y col. 1980, Valverde y col. 1989) o bien a la presencia de factores regulatorios intracelulares propios de la expresión de genes particulares.

Recientemente se ha caracterizado un tipo de receptor a hormonas tiroideas específico de la adenohipófisis (Hodin y col. 1989), lo que podría permitir respuestas diferenciales características de efectos órgano-específico. En el caso de la neurona TRHérgica, responsable de la actividad tirotrópica, la especificidad de respuesta pudiera estar también asociada al tipo de aferencias que éstas reciben (Liposits y col. 1987, Terry 1986) o bien, a la presencia de segundos mensajeros cuya capacidad de respuesta fuera diferente en determinadas zonas (como se ha observado en el caso de las PKCs de hipotálamo o hipófisis) (Naor 1990).

En áreas como el hipotálamo, estriado y cerebro medio, el TRH estimula la formación de AMPc sin observarse efectos a nivel de la corteza, hipocampo, cerebelo o médula pons; mientras que en el cerebelo, el péptido incrementa la hidrólisis de fosfatos de inositol sin provocar cambios en otras regiones del cerebro (Iriuchijima 1989).

El efecto de las hormonas tiroideas sobre la secreción de TRH ha sido evaluado en diferentes modelos: en el nuestro, el incremento en el contenido de péptido en animales hipotiroideos a nivel hipotalámico, no está acompañado de incremento en el nivel de péptido liberado cuando se analiza la liberación proveniente del hipotálamo medio basal; sin embargo, en el hipotálamo medio basal existen terminales nerviosas que no están relacionadas a la regulación de la actividad del tirotrópo. Cuando se observa la liberación de TRH de eminencia media de animales hipotiroideos logramos observar un incremento en el nivel de péptido liberado tras estimulación por potasio.

De manera que si consideramos todos los efectos en conjunto podríamos visualizar los cambios que ocurren sobre diferentes estructuras del organismo: las hormonas tiroideas inhiben la síntesis de TRH en las neuronas de la zona hipofisiotrófica; la disminución en concentración de T3 incrementa la cantidad de péptido liberado de la eminencia media y, en la hipófisis, disminuye la actividad de la enzima que lo degrada lo que permitiría mayor efectividad del TRH que alcanza la hipófisis provocando la activación de la glándula tiroides, reestableciendo así el equilibrio del sistema.

Ahora es claro que la actividad de la PGA II puede ser regulada por las hormonas del órgano blanco de la TSH, lo que podríamos denominar regulación de "largo alcance". Además, la actividad de la PGA II podría ser regulada por las neurohormonas hipotalámicas (o los mensajeros que ellas generan), de manera paralela (o consecuente) a la estimulación hormonal. De los mecanismos intracelulares que regulan la actividad de la PGA II existe poca información: en células de retinoblastoma Y-79 la presencia de TPA provoca la rápida disminución de la PGA II (Suen y col. 1991 en prensa). En nuestro modelo de células adenohipofisarias en cultivo observamos un efecto solo a tiempos de tratamiento prolongados, que de acuerdo a los resultados de Suen y col. 1990 correspondería a efectos tardíos del TPA; éstos implican síntesis de proteína. A

tiempos cortos de estimulación con TPA no observamos cambios en la actividad de la PGA II A ; sin embargo nuestro protocolo de incubación puede ser criticable. La fosforilación es un proceso reversible y a tiempos tan largos como 60 min es muy probable que ya no observemos el efecto de la fosforilación sobre la actividad de PGA II (Krebs 1986).

El uso del TPA para estimular la actividad de la PKC y aún para desensibilizar a las células de la enzima, es un procedimiento farmacológico que ninguno de los péptidos que utilizan la vía de la PKC pueden imitar. En un intento de ensayar la especificidad de la disminución de la actividad de la PGA II por TPA, desensibilizamos la PKC celular incubando las células durante 14-16 h con dos péptidos que activan a la PLC y por tanto a la PKC. Solo la incubación con TRH y no con A II disminuye la actividad de la PGA II, aunque el efecto no alcanza de ninguna manera la magnitud de aquel provocado por el TPA. Esto apoya una estrecha relación entre TRH-PGA II de manera específica ya que la AII no provoca ningún cambio sobre la actividad enzimática y sí estimula la actividad de la PLC (Canonico 1986).

La inhibición de la producción de ácido araquidónico afecta la secreciones hipofisarias. En este trabajo exploramos la participación del AA en los mecanismos de degradación del TRH. La adición de melitina (activador de la PLA2 productora de AA) incrementa la actividad de la PGA II cuando se incuba por tiempos cortos. Este podría ser el resultado de alguno de los efectos del AA sobre la célula; el AA posee actividad de ionóforo cálcico y es posible que este ión active de alguna manera a la PGA II. El análisis de los pocos resultados experimentales obtenidos por estimulación de las células con el ionóforo cálcico A 23187 o con alto K^+ sugieren que los cambios en concentración intracelular de Ca^{2+} afectan (activan) la actividad enzimática de PGA II. Debe recordarse que la PGA II es una metaloproteasa, de la que se desconoce el metal involucrado en la actividad.

No parece haber participación del sistema adenilato ciclasa en la regulación de la actividad enzimática ya que ni la estimulación de la subunidad catalítica de la AC por forskolina ni el incremento en los niveles de AMPc inducen cambios en la actividad de PGA II o bien éstos podrían estar enmascarados por los largos tiempos de incubación con los compuestos.

Utilizando fracciones enriquecidas en los diferentes tipos celulares hipofisarios, Bauer 1990 localizó la enzima PGA II principalmente sobre los lactotropos y sorprendentemente estas células responden a la activación por hormonas tiroideas. La aparente ausencia de PGA II en los tirotropos concede mayor importancia fisiológica a la regulación de la actividad enzimática a nivel del lactotrofo en relación con la secreción de la PRL.

Múltiples factores afectan la actividad del lactotrofo, de entre ellos, los esteroides, juegan un papel importante tanto a nivel hipotalámico como localmente en la adenohipófisis (Wiklund y col. 1981 Lieberman y col. 1978) ya que ellos incrementan la síntesis, almacenamiento y liberación de PRL.

Los esteroides disminuyen la actividad de PGA II tanto "in vivo" como "in vitro", estos efectos parecen contraponerse en un dialogo concertador que modularía la secreción de PRL. A nivel hipofisario, los estrógenos antagonizan los efectos de las hormonas tiroideas "in vivo" e "in vitro" y aún en animales ovariectomizados se observa un fuerte incremento de la actividad de PGA II (Bauer 1988,1990). Nuestros

resultados muestran un ligero incremento en la actividad de PGA II en células tratadas 24 h con la hormona. Estos resultados aunque contradictorios sugieren que los estrógenos requieren de mayor tiempo para mostrar su efecto inhibitorio sobre la expresión de PGA II (72-120 h Bauer Vs 24 h este trabajo).

Durante el ciclo estral, los estrógenos ejercen un efecto antidopaminérgico sobre los lactotopos, que muestran menor capacidad de respuesta a la DA durante el proestro (algunas horas después del pico máximo de estrógenos) y durante el diestro 1 (D1) después del incremento en E2 observado la tarde del estro (Brandi y col. 1990).

Drouva y col 1990 muestran que algunos de los efectos de los estrógenos al incrementar la sensibilidad y capacidad de respuesta a nivel hipofisario, están mediados por la PKC; en efecto, el tratamiento prolongado con estrógenos incrementa la cantidad de PKC tanto a nivel citoplasmático como membranar. Este efecto podría contribuir al efecto "amortiguador" que observamos en las células pretratadas con TPA/E2 en donde la actividad de PGA II no disminuye tanto como en los tratados únicamente con TPA.

La actividad del lactotopo está regulada por una gran cantidad de factores estimulantes e inhibidores (Lamberts y col 1990); entre estos últimos se encuentra la DA, cuya concentración disminuye en sangre portal durante la succión en animales lactantes y en animales cíclicos durante el día del proestro, lo que coincide con la máxima secreción de PRL en estas condiciones (Ben-Jonathan y col. 1977, 1980). La actividad de la PGA II varía a lo largo del ciclo estral, observándose la menor actividad en el día del D2 y proestro (Uribe y col. sometido), días en los que disminuye también la concentración de DA en sangre portal (Ben-Jonathan 1977, 1980).

Existen otras correlaciones interesantes entre los niveles de DA y la actividad de PGA II. La actividad de la PGA II, así como la de la tiroliberinasa, es menor en hembras que en machos (Bauer 1988) mientras que, tanto la síntesis como el recambio de la amina y la concentración de ésta en sangre portal, son menores en el macho (Ben-Jonathan y col. 1977, Demarest y col. 1981, Gudelsky y col. 1981).

En nuestro modelo, la bromocriptina (análogo dopaminérgico) inhibe, de manera dependiente de la dosis la actividad de la PGA II; esta inhibición no parece ser afectada por tratamiento con la toxina pertussis y cuando se desensibilizan las células de PKC, no se observa más el efecto. Dentro de las vías intracelulares que la DA inhibe parece ser nuevamente el influjo cálcico el involucrado en esta respuesta ya que cambios en el nivel de AMPc o la estimulación de la PLC o PKC a tiempos cortos no alteran la actividad de la PGA II. Sin embargo es posible que en nuestras condiciones de cultivo e incubación (con T3) estemos muy cerca de la estimulación máxima lo que nos permitiría observar más fácilmente inhibiciones que efectos estimulatorios.

En sinaptosomas de hipotálamo, la incubación con DA "incrementa" la liberación de TRH; sin embargo es posible que el incremento en el nivel de TRH pudiera deberse a la inhibición de la degradación de éste, ya que, el contenido de péptido en los sinaptosomas no cambia, lo que contradice la interpretación del autor de que el incremento es debido a la mayor liberación del péptido (Marcano de Cotte y col. 1980); además se ha demostrado que las preparaciones de sinaptosomas no responden a estímulos liberadores (Joseph-Bravo y col. 1979).

Desde el punto de vista fisiológico, la especificidad de la PGA II y su regulación por las hormonas tiroideas y estrógenos da gran importancia a esta enzima en el control de la actividad hipofisaria. Por otro lado los efectos del TPA (limitados parcialmente por el TRH) invitan a proponer que cuando se requiere del estímulo de TRH por tiempo prolongado, él mismo evita su degradación permitiendo mayor concentración efectiva del péptido alrededor de la célula blanco.

En conclusión, la actividad de la PGA II a nivel hipofisario es retroalimentada positivamente por las hormonas tiroideas aparentemente actuando a través de su receptor nuclear, resultados que concuerdan con aquellos de Bauer 1987 y Suen y col. 1989. La actividad de PGA II es afectada vía receptor por el mismo TRH y por la DA siendo éstos fuertes estimulante e inhibidor respectivamente de la secreción de PRL. A nivel intracelular, los incrementos en Ca^{2+} (estimulan) y la disminución en los niveles de PKC (inhiben) afectan la actividad enzimática. Es importante ahora saber si los efectos de TRH (que estimula la PLC y por tanto la PKC) y los de las hormonas tiroideas (o la carencia de ellas) están mediados por la PKC. Es necesario el estudio más profundo de los cambios en concentración de calcio intracelular y su efecto sobre la actividad de PGA II así como el mecanismo a través del cual ésta se efecta.

La importancia de la actividad de la PGA II en el funcionamiento de las células blanco del TRH, el tirotripo y el lactotropro requiere de la evaluación de la actividad secretora de éstas en condiciones de inhibición de la enzima.

LA PRODUCCION DE ACIDO ARAQUIDONICO EN LA SECRECION DE PRL

OBJETIVOS

La inhibición de la secreción de prolactina por dopamina es un evento sensible a la toxina pertussis. Dentro de los mecanismos intracelulares relacionados a esta inhibición se encuentra la hidrólisis de fosfoinositoles, la actividad de la adenilato ciclasa y la de los canales cálcicos dependientes de voltaje y sensibles a DHP. La inhibición dopaminérgica de la formación de estos mensajeros intracelulares es un evento también sensible al tratamiento con la toxina.

En trabajos previos del laboratorio de Dinámica de los Sistemas Neuroendócrinos, U-159 del INSERM en Paris (Musset 1990), se analizó la respuesta diferencial de las células hipofisarias a factores inhibidores de la secreción; se observó que el tratamiento con la toxina pertussis revierte totalmente la inhibición de la secreción de PRL por somatostatina. Por otro lado, el efecto de la toxina en la inhibición de la secreción de PRL por dopamina es diferente, ya que la inhibición dopaminérgica es solo parcialmente revertida por la toxina y la reversión completa se observa únicamente en presencia de activadores de la cinasa C y de ionóforos cálcicos. Una explicación de estos resultados sería la existencia de algún otro mecanismo responsable de la secreción de la PRL, inhibible por DA e insensible a la PTX.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la producción de ácido araquidónico como un posible candidato al mecanismo referido.

RESULTADOS

En la literatura se encuentran descritas técnicas de incorporación de ácido araquidónico con diferentes tiempos de incubación, concentraciones del ácido graso radiactivo, etc., por lo que en primer lugar establecimos las condiciones de incorporación del ácido araquidónico en nuestros cultivos.

1- Optimización de las condiciones de incorporación del ^3H -Ácido araquidónico (^3H -AA)

Las células adenohipofisarias (10^6 células) de 5 días de cultivo fueron incubadas en presencia de 0.5 uCi de ^3H -AA durante diferentes períodos de tiempo. De acuerdo a la cinética de incorporación de AA (fig 1) se eligió un tiempo de incubación de 180 min.

El tiempo de incubación con los diferentes agentes estimulantes fué establecido en función de la respuesta obtenida en presencia de 2 péptidos estimulantes de la secreción de PRL: el TRH y la AII. De acuerdo a la cinética de liberación de AA (en presencia de albúmina bovina delipidada que al atrapar el ácido araquidónico liberado, evita su reesterificación) se eligió un tiempo de estimulación de 5 min ya que en nuestras condiciones el tiempo de estimulación superior ensayado no permitió detectar ninguna liberación de AA aunque si de PRL (fig 2).

La liberación de AA por los péptidos estimulantes se ensayó en medio RPMI-1640 y en Ringer-Krebs bicarbonato (RKB) y en este último se varió la concentración de Mg^{2+} . No se observaron cambios significativos en la cantidad de AA liberado ni en la PRL secretada en los diferentes medios de incubación para las 3 primeras concentraciones de Mg^{2+} (tabla 1). Aparentemente altas concentraciones de Mg^{2+} parecerían ser inhibitorias de la liberación de AA aunque no de la secreción de PRL. En RKB 2 mM de Mg^{2+} ninguno de los péptidos fué efectivo en la liberación de AA pero si lograron estimular la secreción de PRL. La respuesta de liberación de AA provocada por el TRH se mostró dependiente de la dosis del péptido (fig 3).

La incorporación prolongada del ácido graso radiactivo no afectó ni la respuesta estimulada por los péptidos ni la inhibitoria por la DA (fig 4).

2- Inhibición de la liberación de AA y PRL

Como se muestra en la figura 5 la dopamina inhibió de manera dependiente de la dosis la liberación de AA. La inhibición dependió del medio de incubación utilizado (RPMI-1640 o RKB) así como de la concentración de Mg^{2+} en el medio. La inhibición dopaminérgica de la liberación de AA esta acompañada de la inhibición de la secreción de PRL; es claro que el grado de inhibición de AA y PRL a la misma dosis fué diferente. En RKB 0.2 o 1.26 mM de Mg^{2+} es posible observar la inhibición inducida por la DA, sin embargo en presencia de 0.5 mM de Mg^{2+} así como en medio RPMI cuya concentración de Mg^{2+} es de 0.406 mM

la inhibición de DA no es aparente.

La dependencia que la DA muestra del Mg^{2+} en la inhibición de la liberación de AA y no de PRL, difícilmente podría explicarse por cambios en la afinidad del receptor ya que solo se afecta por Mg^{2+} uno de los procesos intracelulares que se suponen mediados por el mismo tipo de receptor dopaminérgico.

Se hizo una evaluación del efecto que sobre la liberación de AA y PRL tienen: el TRH, la A II y la DA (los dos primeros estimulantes y la última inhibidora de la secreción de PRL); los compuestos que cambian la concentración intracelular de calcio (Bk, nifedipina, A 23187); el nivel de APMc (forskolina, 8-BrAMPc) en cultivos control y pretratados con:

- a- El éster de forbol TPA que disminuye el nivel de PKC celular, tratamiento con el que es posible evaluar la participación de la PKC en los procesos de liberación así como la participación de la PLC ya que el tratamiento prolongado con TPA provoca la pérdida de la retroalimentación negativa sobre la PLC.
- b- La toxina pertussis (PTX, IAP), que ADP-ribosila las proteínas G que participan en las respuestas inhibitorias dopaminérgicas que median la inhibición de la secreción de PRL por dopamina.
- c- El éster de forbol TPA y la toxina pertussis juntos

3- Efecto de TRH, AII y DA sobre la liberación de PRL y AA

El TRH y la AII liberan PRL y AA aunque el tripéptido se muestra más eficiente cuando se compara su efecto a la misma dosis. El tratamiento con TPA, IAP o ambos disminuye la cantidad de AA y PRL cuando se estimula con AII y no así cuando se hace con TRH (fig 6) lo que apoya un papel más importante de la PLA 2 en la estimulación de AA por TRH y de la PLC para la estimulación por AII.

La DA inhibe la liberación de PRL en condiciones basales y estimuladas por TRH o AII que es bloqueada cuando se hace el pretratamiento con IAP; mientras que, en todas las condiciones se observó el efecto inhibitorio de la DA sobre la liberación de AA (fig 6). La inhibición dopaminérgica de AA resistente a todos los tratamientos, sugiere que se trata de un efecto en el que no participa ningún otro mensajero intracelular.

4- Efecto de los compuestos que cambian la concentración intracelular de calcio sobre la liberación de PRL y AA.

La presencia del agonista de canales cálcicos (Bk) dependientes de voltaje y sensibles a dihidropiridinas (DHP) o del antagonista (nifedipina) no provocó ningún efecto sobre la liberación de AA en las diferentes condiciones ensayadas (fig 7), aunque si manifiestan su

efecto estimulante (Bk) o inhibitorio (nife) sobre la secreción de PRL (fig 7); la aplicación del ionóforo cálcico A 23187 incrementó de manera altamente significativa la liberación de AA (fig 7). Esta respuesta diferencial a dos compuestos que incrementan la concentración intracelular de calcio refleja quizá requerimientos cálcicos diferentes de las fosfolipasas.

La inhibición de la liberación de AA por DA se observa tras estimulación por Bk o A 23187 aún en condiciones en las que la participación de la PLC es bloqueada (fig. 7), lo que apoya la participación de la PLA 2 en la producción de AA inhibible por DA.

El tratamiento con PTX no afecta los cambios en calcio intracelular provocados por el Bk o el A23187, aunque si bloquea la inhibición dopaminérgica de la secreción de PRL provocada por estos compuestos (fig 7), nuestros resultados muestran que no es a través del bloqueo de los flujos cálcicos que la DA inhibe la liberación de AA ya que la inhibición dopaminérgica de la liberación de AA no se ve afectada por el tratamiento con la toxina (fig 7).

La respuesta de liberación de AA a la entrada masiva de Ca^{2+} fue dependiente de la dosis. Se ensayaron diferentes dosis de A 23187 obteniendo una respuesta creciente paralela a la dosis del ionóforo (fig 8). En las dosis bajas de A 23187 la DA aún es capaz de inhibir tanto la liberación de AA como la secreción de PRL, sin embargo en la dosis más alta de A 23187 la DA no inhibe ninguno de los dos parámetros (fig 8). Es importante mencionar que la incapacidad de la DA para inhibir ambas secreciones pudo ser debida a la falta de integridad celular, ya que la prueba de viabilidad celular revelada por la permeabilidad al azul de tripano, mostró la existencia de células permeables al colorante.

El ionóforo provoca respuestas de liberación de AA mayores en cultivos pretratados con TPA y es la inhibición dopaminérgica, la que se mostró de menor magnitud (fig 8). Las respuestas estimuladas fueron de mayor magnitud que en los cultivos control (fig 8); estos datos apoyan la presencia de un mecanismo productor de AA cuya sensibilidad a la inhibición dopaminérgica es menor.

5- Efecto del incremento de AMPc (por estimulación con forskolina -FK-) sobre la secreción de AA y PRL

En todas las condiciones ensayadas, la Fk provocó un ligero incremento en la liberación de AA mismo que es revertido completamente por la DA (fig 9); la magnitud de la inhibición dopaminérgica es igual en condiciones basales o estimuladas.

Como control de la efectividad del tratamiento con IAP en nuestro sistema, aprovechamos el conocido efecto del IAP sobre la inhibición por DA del sistema AMPc. La tabla 2 muestra la acumulación de AMPc en condiciones control y bajo estímulo con FK así como la inhibición por DA y el efecto del tratamiento con IAP sobre estos parámetros. El tratamiento con IAP provocó la esperada pérdida de la inhibición dopaminérgica tanto basal como estimulada de la secreción de PRL sin afectar la liberación de AA (fig 9). Este control se hizo en algunos experimentos donde se incluyó tratamiento con IAP.

Sobre la secreción de la PRL la Fk provocó un marcado efecto estimulante

revertido a niveles normales tras la incubación en presencia de la DA (fig 9). Es importante notar que el tratamiento con IAP efectivamente bloquea la inhibición dopaminérgica de la secreción de PRL (fig 9).

El incremento del nivel de AMPc por forskolina no afecta la inhibición dopaminérgica de la liberación de AA y ya que la inhibición por DA de la actividad de la AC es un fenómeno sensible a la PTX y en nuestros resultados este tratamiento no afecta la inhibición dopaminérgica, podemos dejar de lado la participación del sistema AC en efecto de DA sobre la liberación de AA.

6- Efecto de la activación de la PLA₂ sobre la liberación de AA y PRL

Una de las posibles vías de producción de AA es la activación de PLA₂. La incubación de las células en presencia de melitina (estimulante de la actividad de la PLA₂ en dosis de 1 ug / ml provocó la liberación tanto de AA como de PRL. Ambas liberaciones se incrementan con el tiempo siendo estadísticamente significativas a tiempos tan cortos como 5 min (fig 10).

Por otro lado, la producción de AA se mostró dependiente de la dosis de melitina utilizada y en ningún caso la dopamina fue capaz de inhibir ni la liberación del ácido graso ni la secreción de PRL cuando la melitina esta presente (tabla 3).

7- Efecto de la DA sobre la liberación de AA a partir de membranas de células hipofisarias en cultivo

La preparación de las membranas se efectuó con células a las que previamente se les incorporó el ³H-AA durante toda la noche. La figura 11 muestra la producción de AA, dependiendo de la cantidad de proteína en la preparación así como la correspondiente inhibición dopaminérgica. Se ensayaron también diferentes dosis de DA sobre producción de AA obteniendo inhibición significativa de la producción de AA con dosis de la amina de 10₅ uM en membranas preparadas a partir de 1.5 millones de células (26 ug de proteína) en incubaciones de 60 min (fig 12).

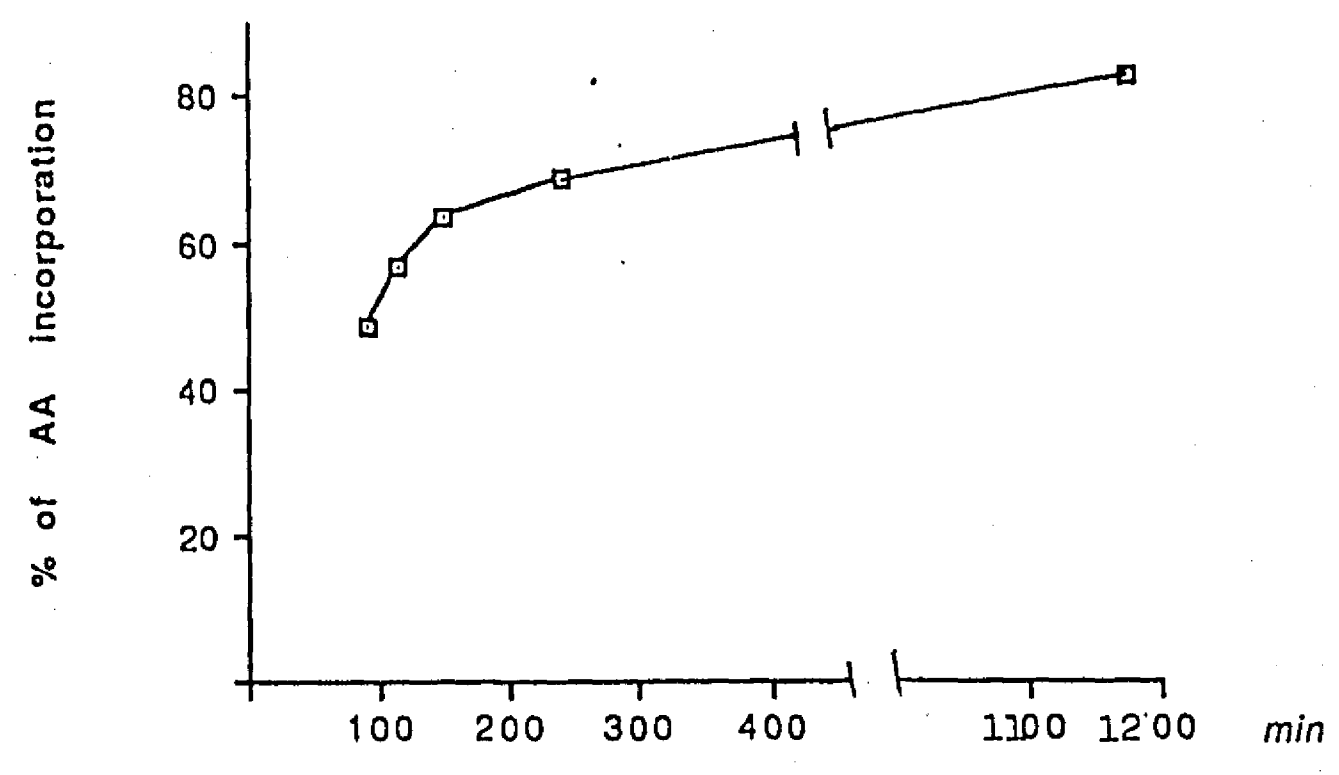


Fig. 1 Incorporación de ácido araquidónico en células adenohipofisarias en cultivo de 5 días. 0.5 μ Ci / ml de 3 H-AA fueron incubados el tiempo indicado, al terminar la incubación las células fueron lavadas 4 veces con RKB y recogidas en NaOH 0.2 M / triton 0.5% y depositados en viales de centelleo líquido.

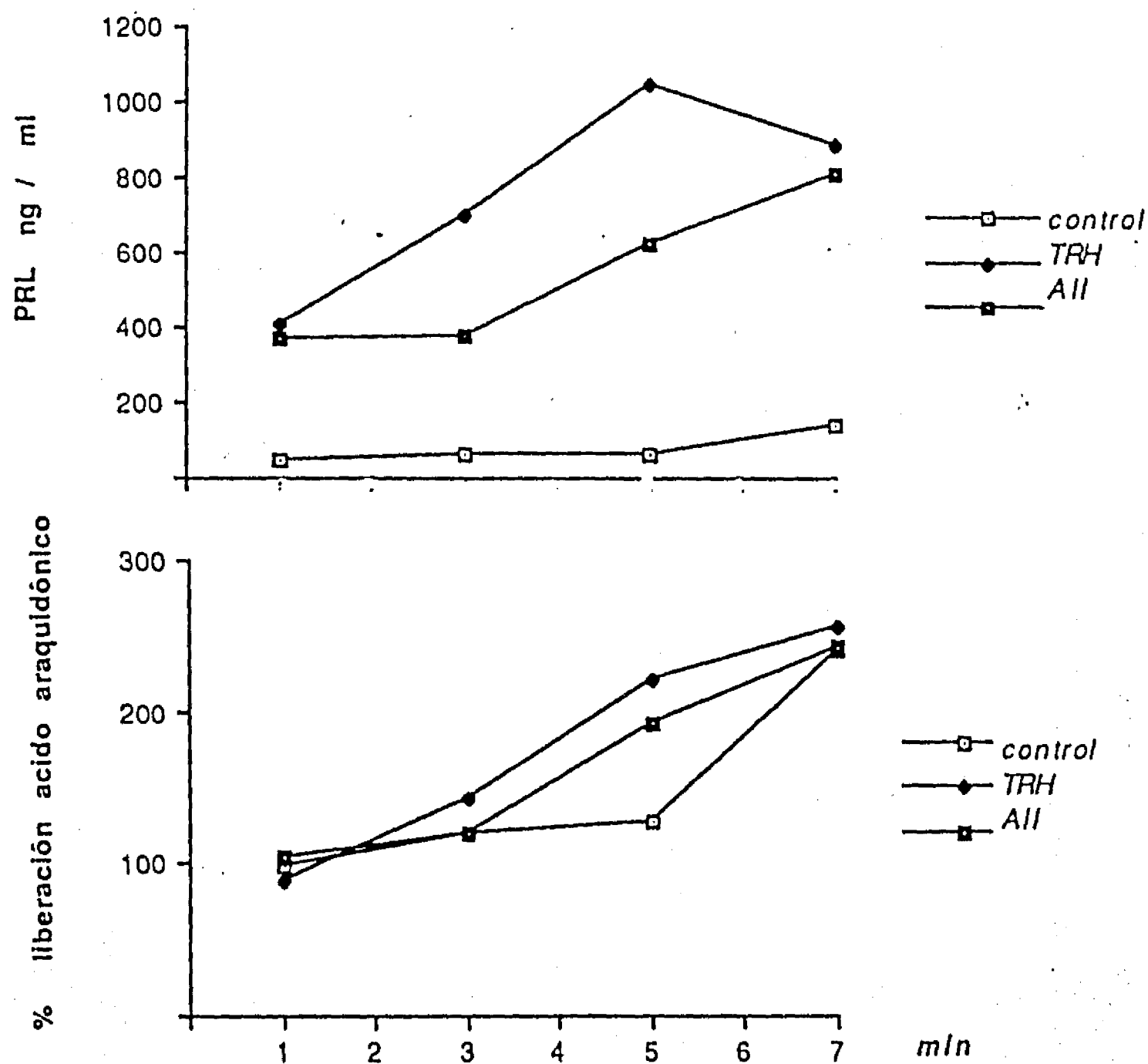


Fig. 2. Liberación de ³H-AA de células hipofisarias en cultivo. El ³H-AA fué incorporado durante 180 min y tras lavados sucesivos fueron incubadas en presencia de los péptidos durante el tiempo indicado. La PRL fué cuantificada por RIA en los mismos medios de incubación.

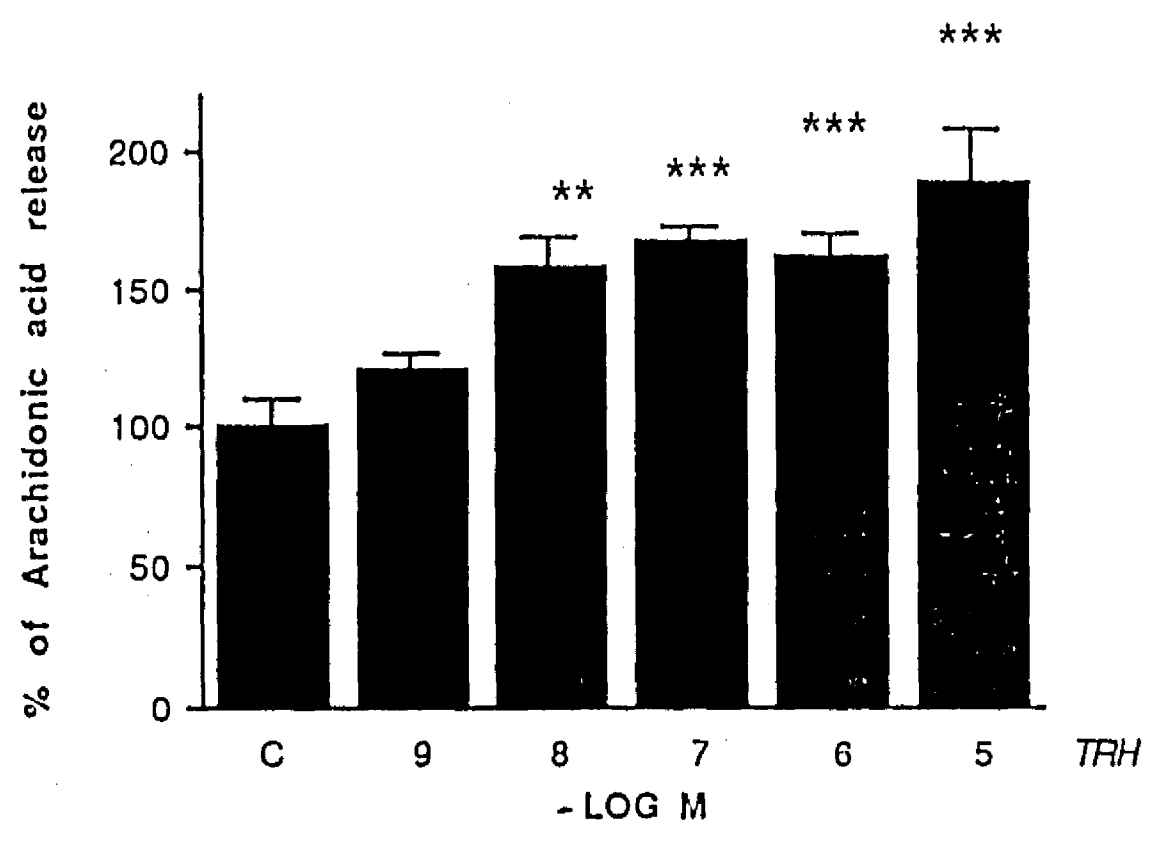


Fig. 3 Curva dosis-respuesta de la liberación de AA por TRH. El medio de incubación fué RKB 0.2 mM Mg^{2+} , 0.1% de BSA (faf). Los datos representan la $\bar{X} \pm SEM$ (n= 6)

% Acido lib.	0.2	0.5	1.26	2.0	mM Mg++	RPMI-1640
CONTROL	102 ± 4(23)	94 ± 3(27)	100 ± 6(18)	100 ± 6(3)		101 ± 3(30)
TRH	141 ± 18(18)*	138 ± 8(19)***	118 ± 6(20)*	98 ± 6(3)		126 ± 6(29)***
A II	141 ± 14(14)**	145 ± 9(21)***	132 ± 7(21)***	106 ± 4(3)		149 ± 5(27)****

PRL ng / ml						
CONTROL	84 ± 10	55 ± 5	66 ± 5	39 ± 9		54 ± 4
TRH	374 ± 49	378 ± 21	392 ± 39	196 ± 11		464 ± 29
A II	375 ± 16	307 ± 37	368 ± 39	370 ± 20		375 ± 34

Tabla 1 LIBERACIÓN DE AA Y PRL EN RKB CON DIFERENTE CONTENIDO DE Mg²⁺ Y RPMI-1640, EN TODOS LOS MEDIOS SE ADICIONÓ BSA (faf) A 0.1%. EL TIEMPO DE INCUBACIÓN FUÉ DE 5 MIN. PARA TODOS LOS MEDIOS LA LIBERACIÓN DE PRL FUÉ ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVA CON $p < 0.01$ LOS DATOS SON LA $\bar{X} \pm SEM$, n SE INDICA ENTRE PARENTESIS.

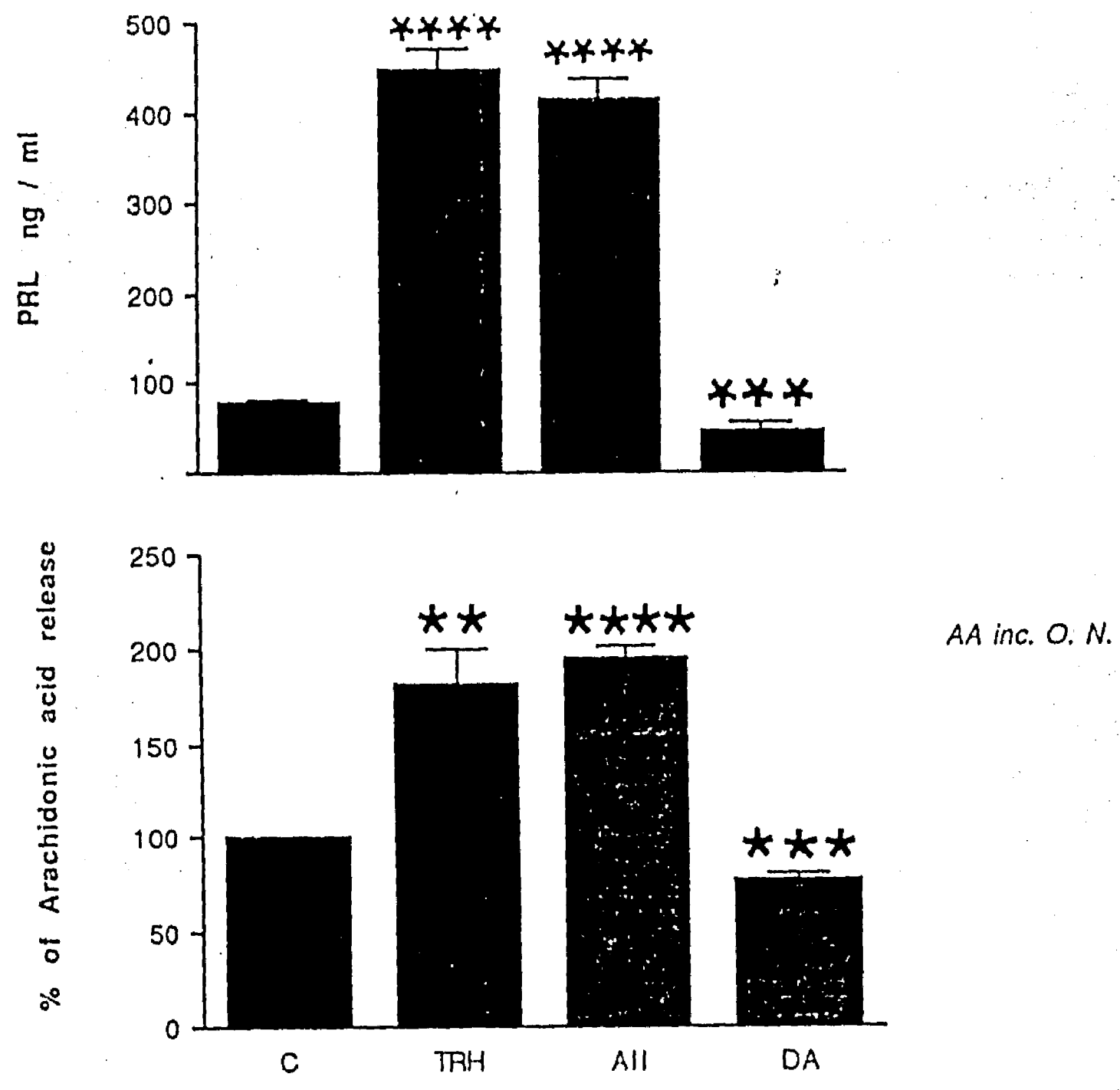


Fig. 4 Liberación de AA y PRL de células hipofisá-
rias. El ácido araquidónico fué incorporado
toda la noche (o.n.) y el tiempo de incubación
con los secretagogos fué de 5 min. Notese que
la respuesta inhibitoria como la estimulada por
los péptidos es similar a la que se produce tras
incorporación del acido graso durante 180 min,
aunque para el último caso las respuestas son li-
geramente menores. Los datos son la X + SEM
(n=6).

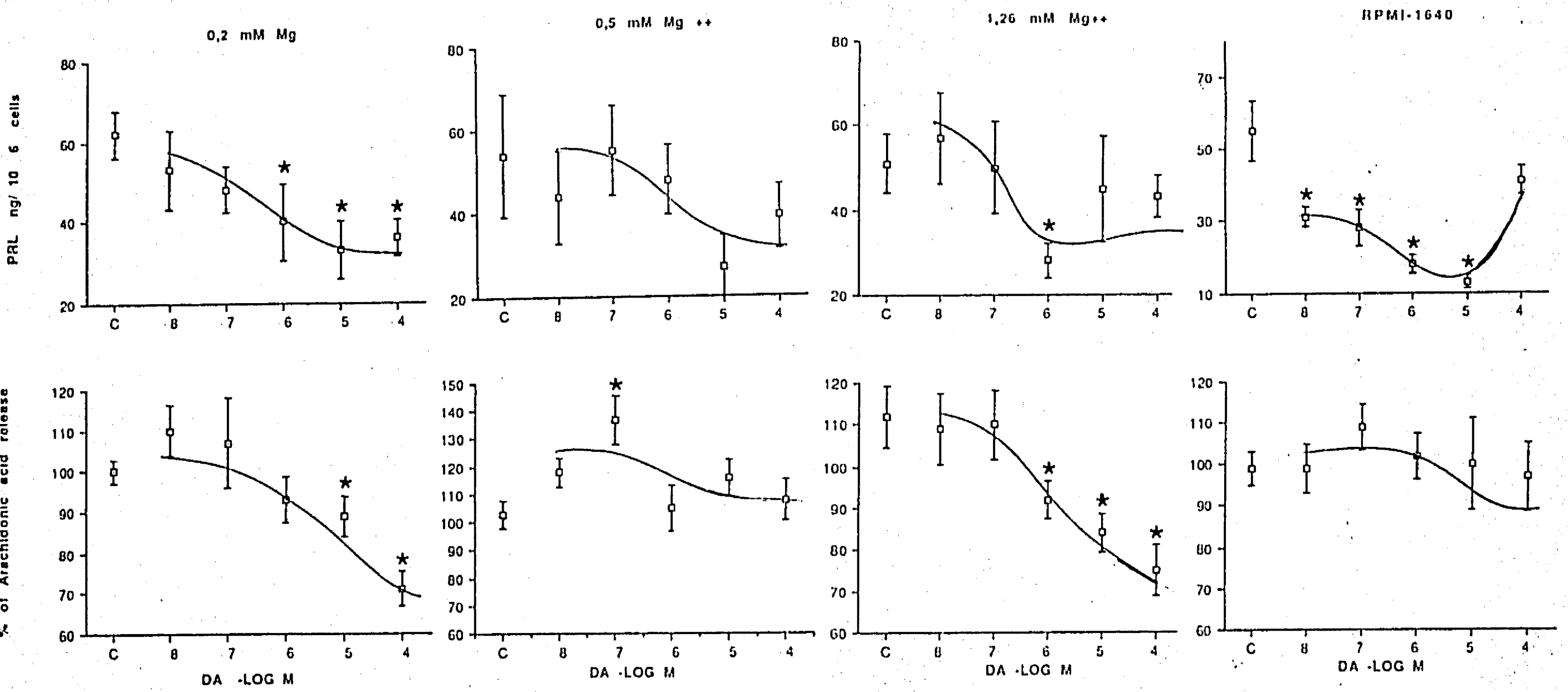
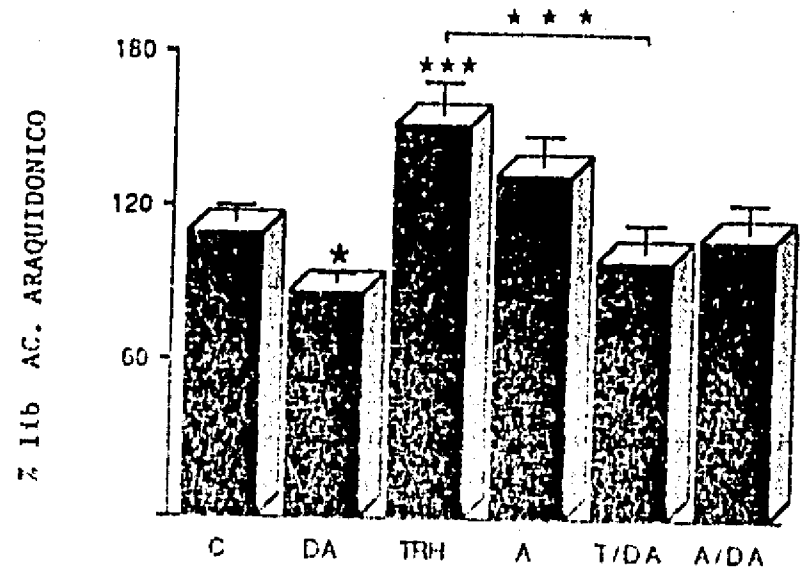
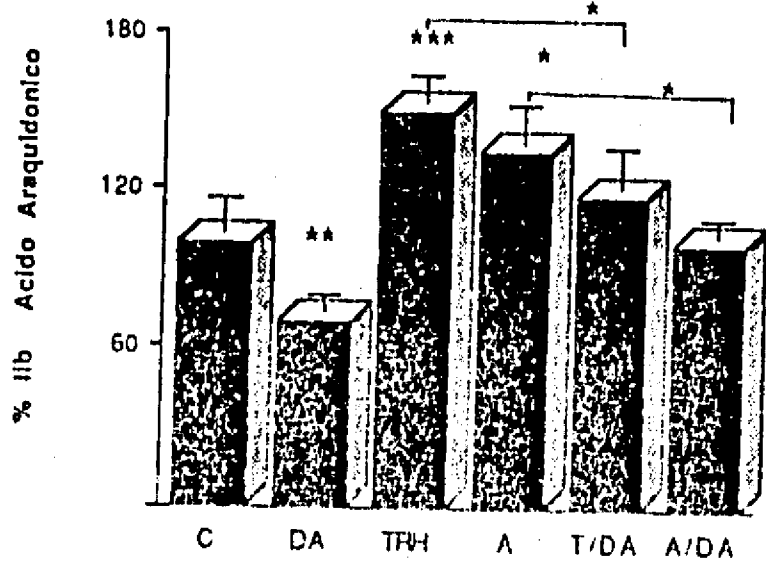
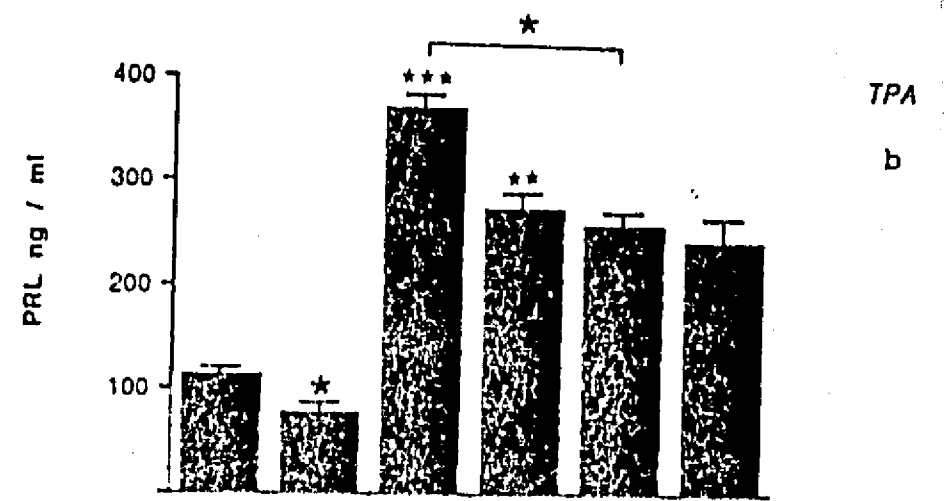
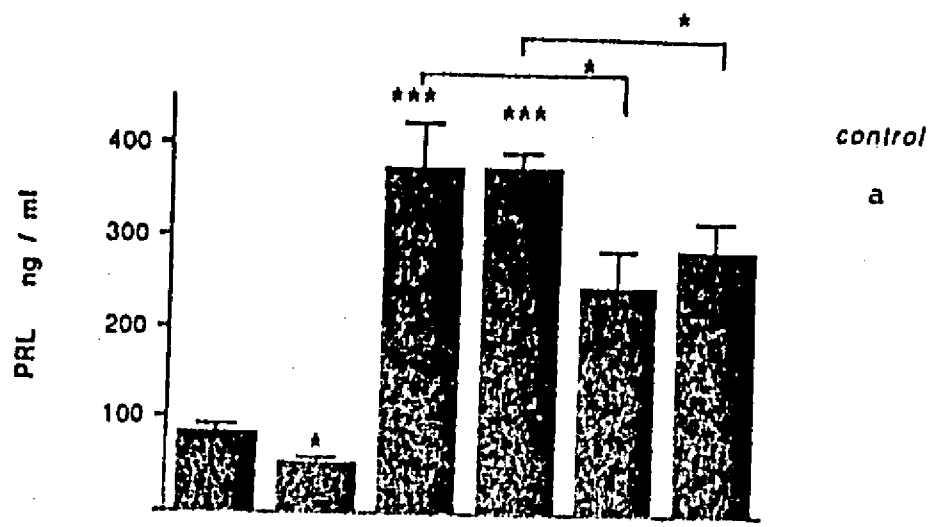


FIG. 5 LIBERACIÓN DE ³H-AA Y PRL . INHIBICIÓN DOPAMINÉRGICA EN RKB CON DIFERENTE CONCENTRACIÓN DE Mg²⁺ y EN RPMI-1640, EN TODOS LOS MEDIOS SE ADICIONÓ 0.1% DE BSA (faf). EL TIEMPO DE INCUBACIÓN FUÉ DE 5 MIN. LA PRL FUÉ CUNATIFICADA POR RIA DE LOS MISMOS MEDIOS DE INCUBACION QUE EL ³H-AA.



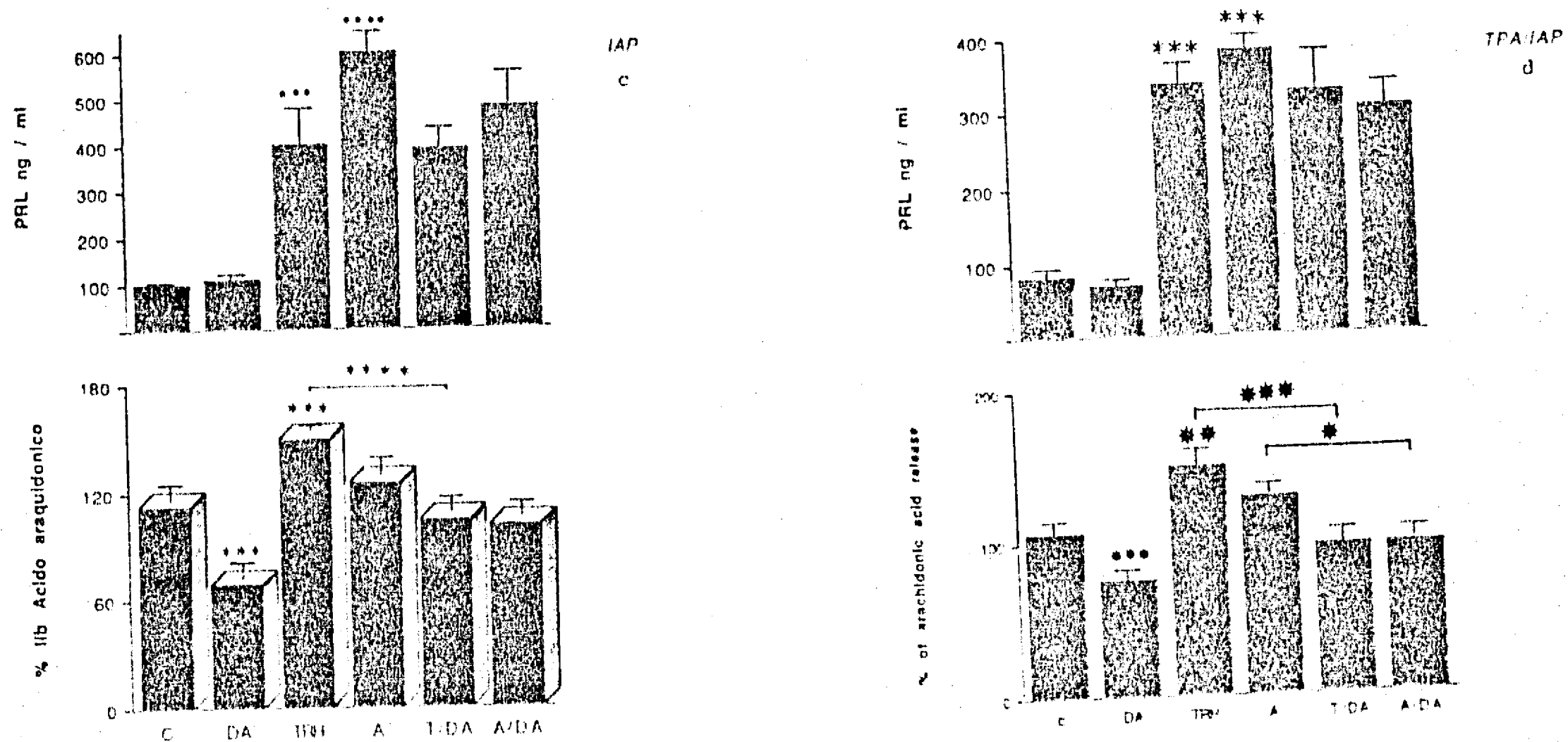
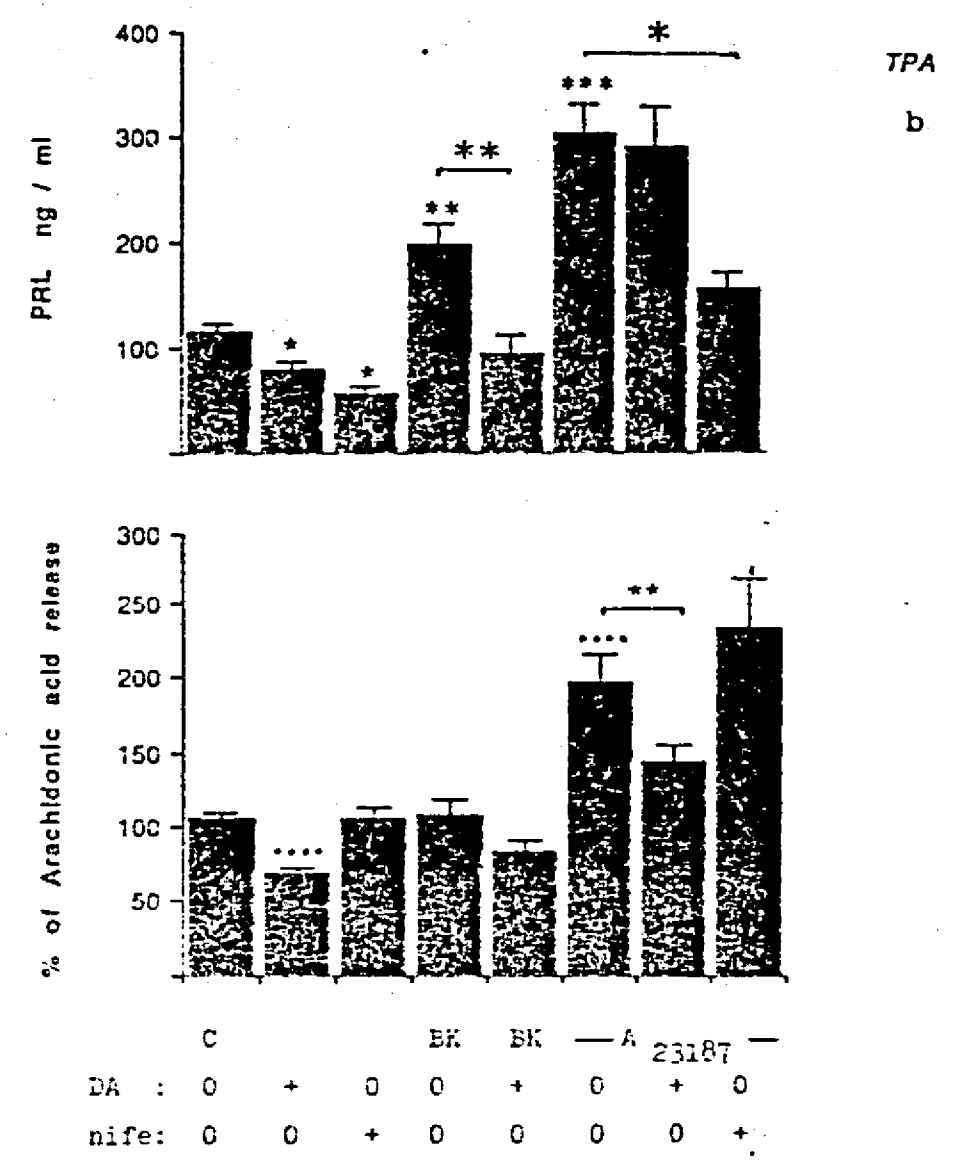
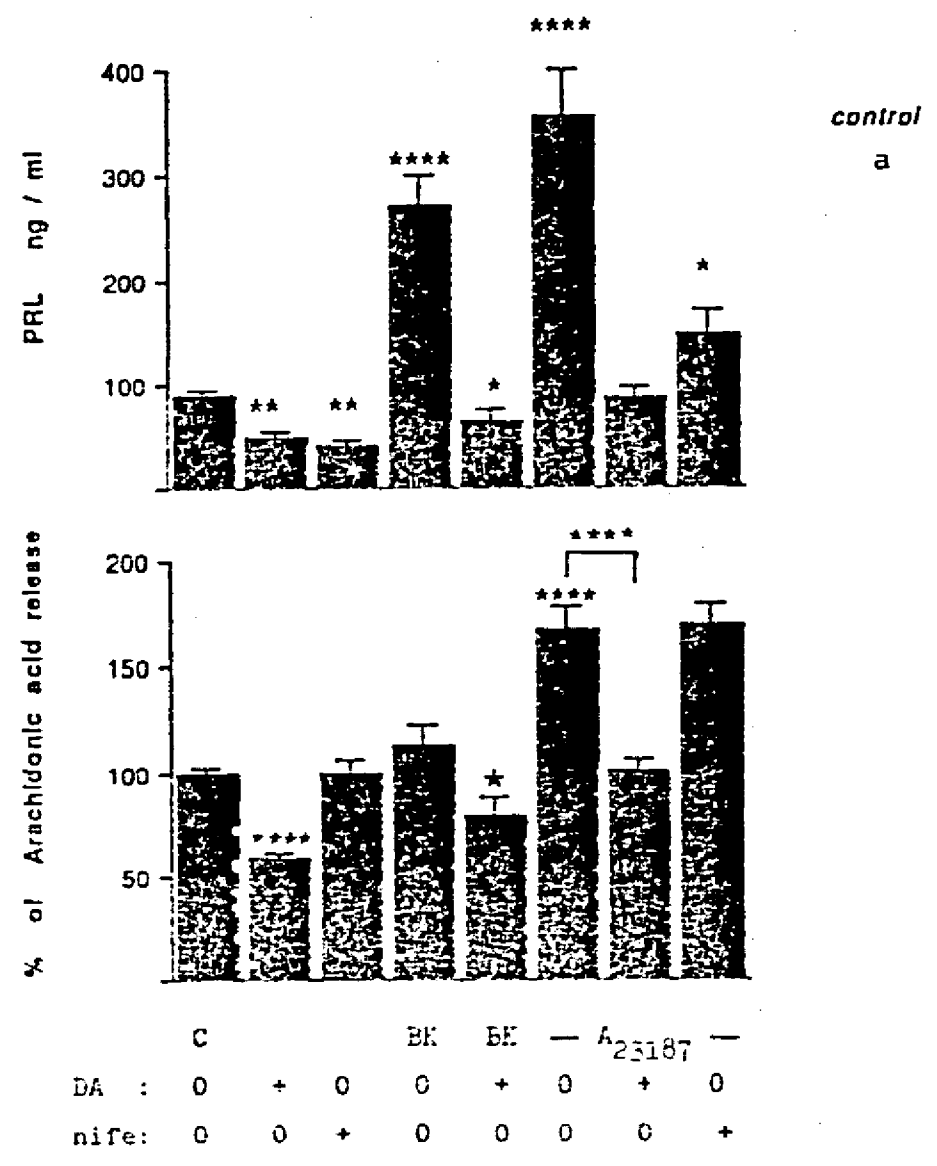


Fig. 6 Liberación de AA y PRL. Inhibición basal por DA e inhibición sobre estímulo por TRH y A II. a: cultivos control; b: pretratados 24h con TPA (1 μ M); c: pretratados durante 24 h con IAP (100 ng/ml); d: pretratados durante 24 h con TPA/IAP. Los datos de AA representan el % con respecto al control sin pretratamiento; los de PRL están expresados en ng/ml. Las alícuotas para la cuantificación de AA y PRL provienen del mismo sobrenadante. Los datos son la \bar{X} + SEM (n=6).



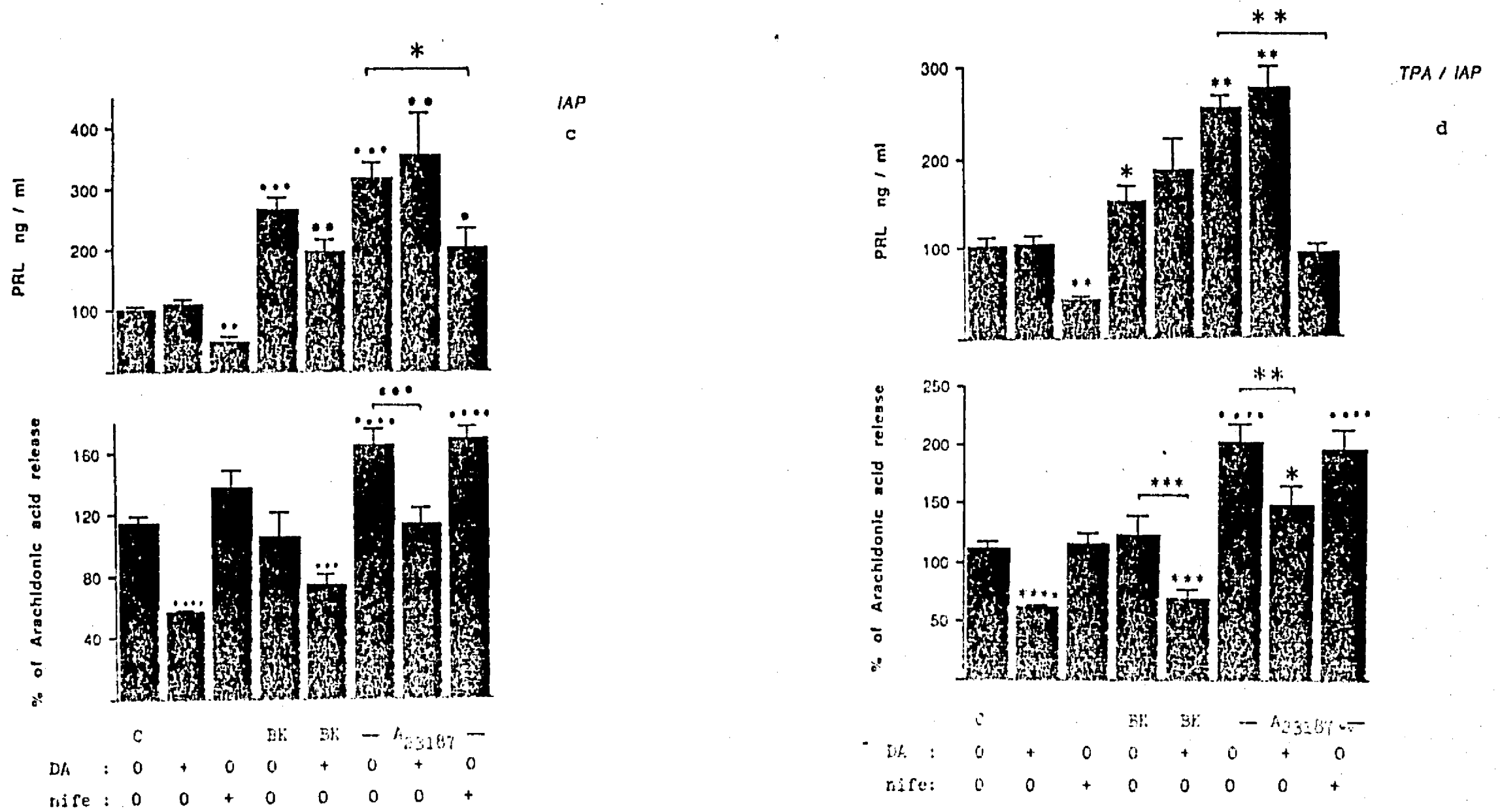
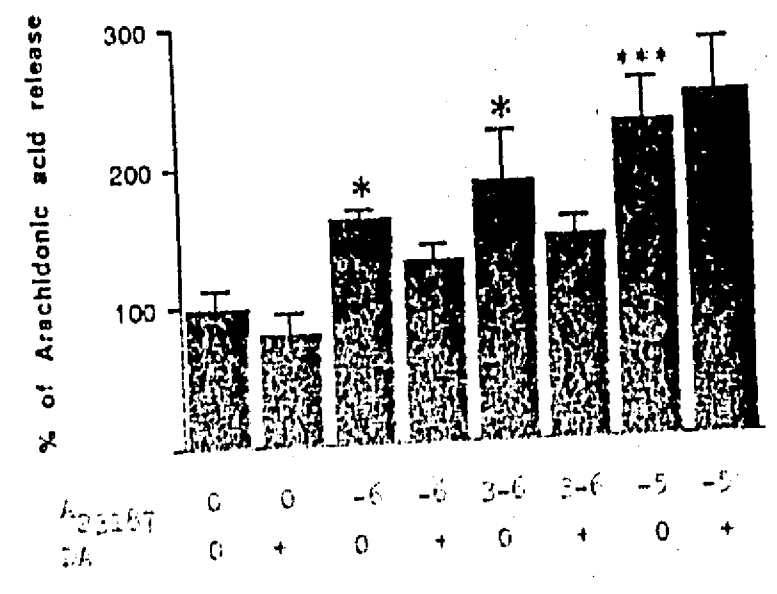
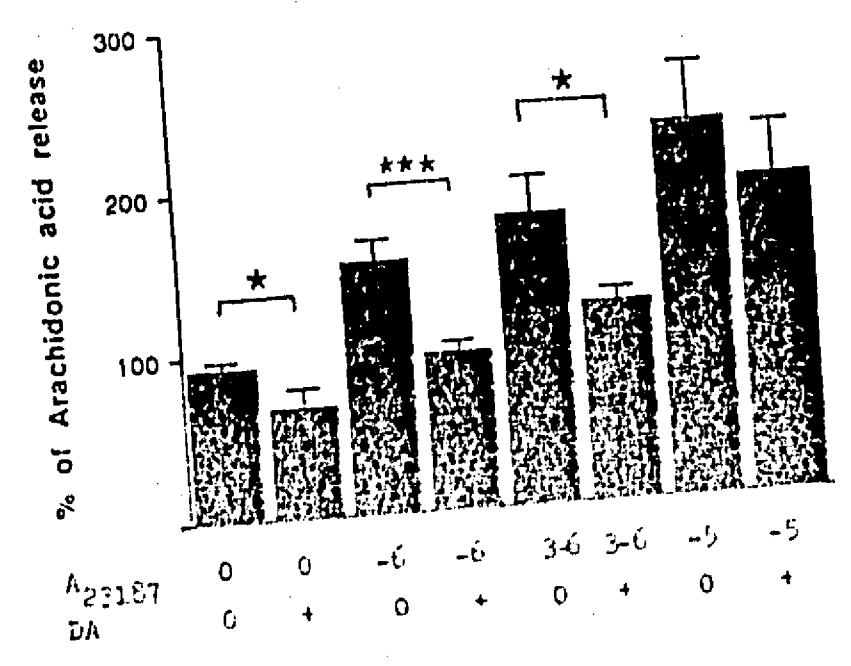
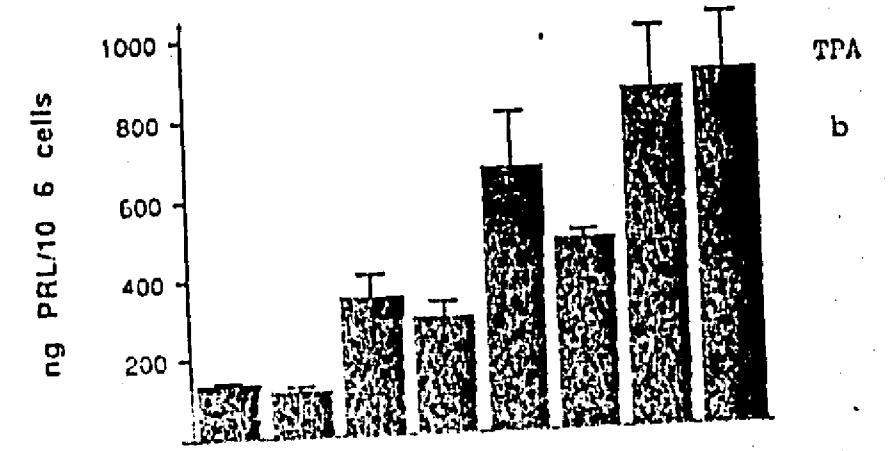
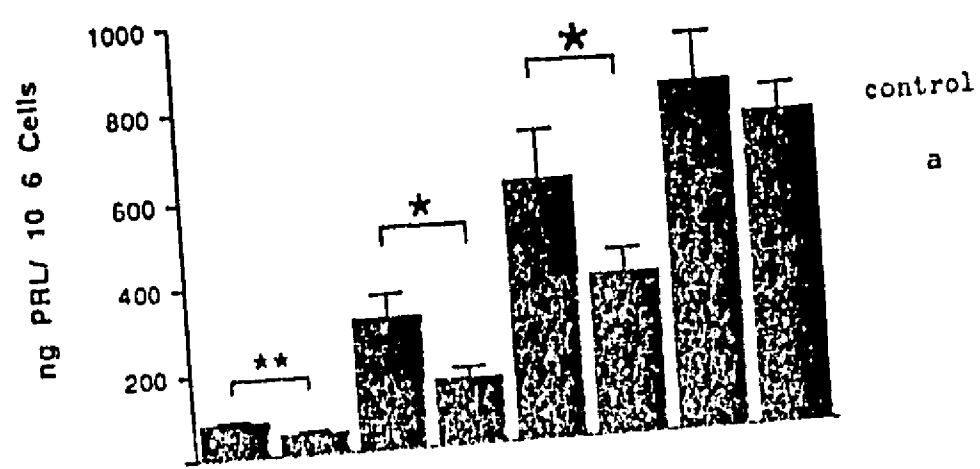


Fig. 7 Liberación de AA y PRL. Inhibición basal por DA y nifedipina (antagonista de los canales cálcicos), así como tras estimulación con Bk (agonista de canales cálcicos) y A 23187 (ionóforo cálcico). Los tratamientos a,b,c y d se indican en la figura 6. Los datos representan la X + SEM (n varia de 9-24).



A ₂₃₁₈₇	0	0	-6	-6	3-6	3-6	-5	-5
DA	0	+	0	+	0	+	0	+

A ₂₃₁₈₇	0	0	-6	-6	3-6	3-6	-5	-5
DA	0	+	0	+	0	+	0	+

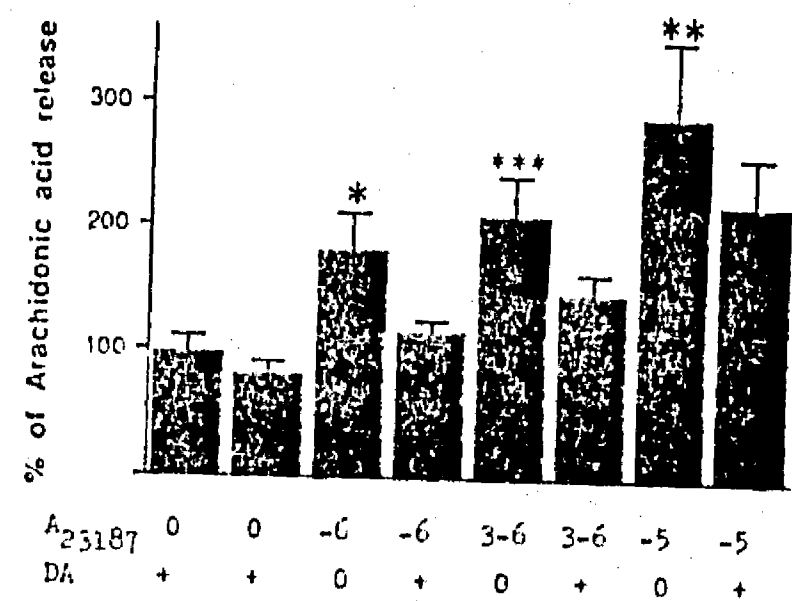
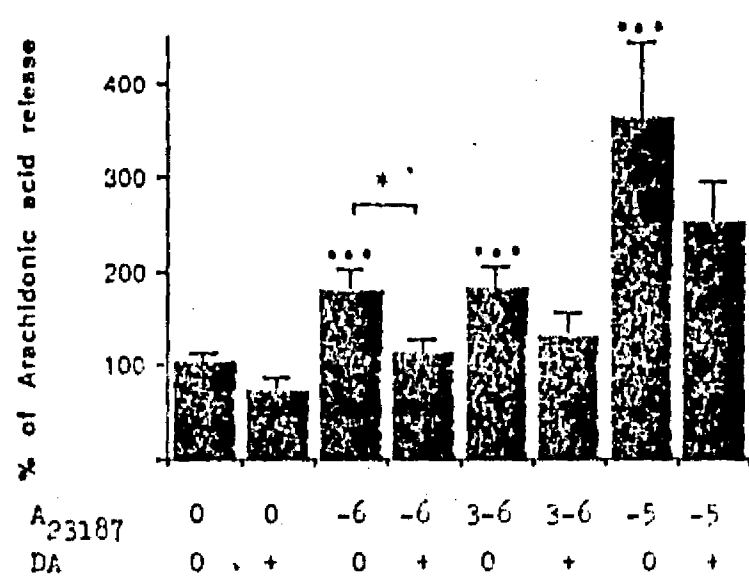
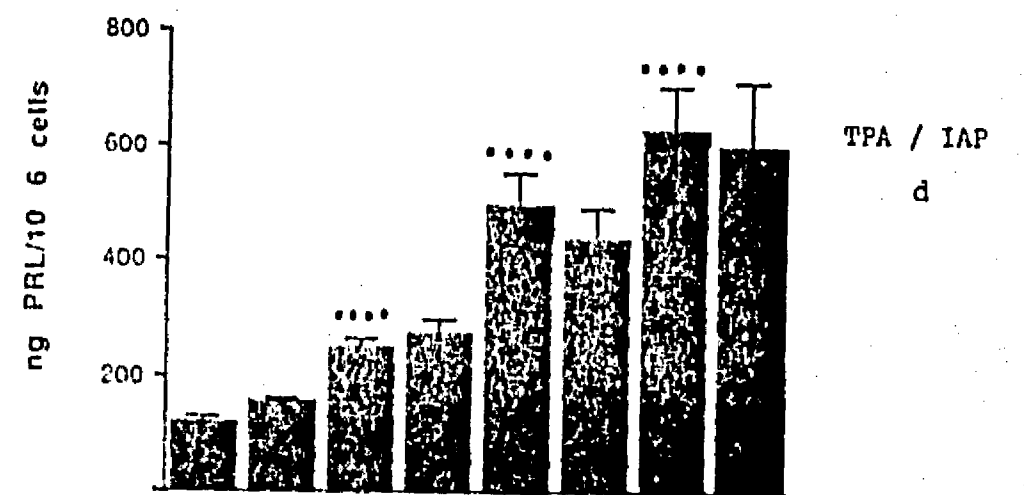
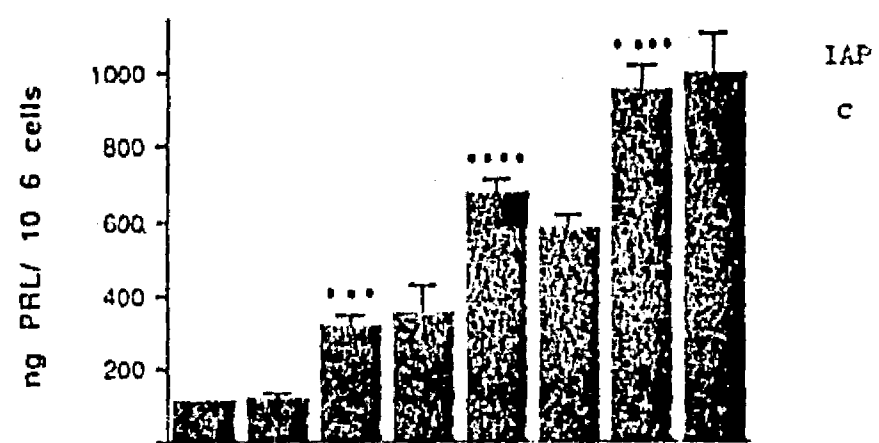


Fig. 8 Curva dosis-respuesta de la liberación de AA y PRL por A 23187 e inhibición dopaminérgica. Los tratamientos a,b,c y d son como se indica en la figura 6. Los datos son la X + SEM (n=6).

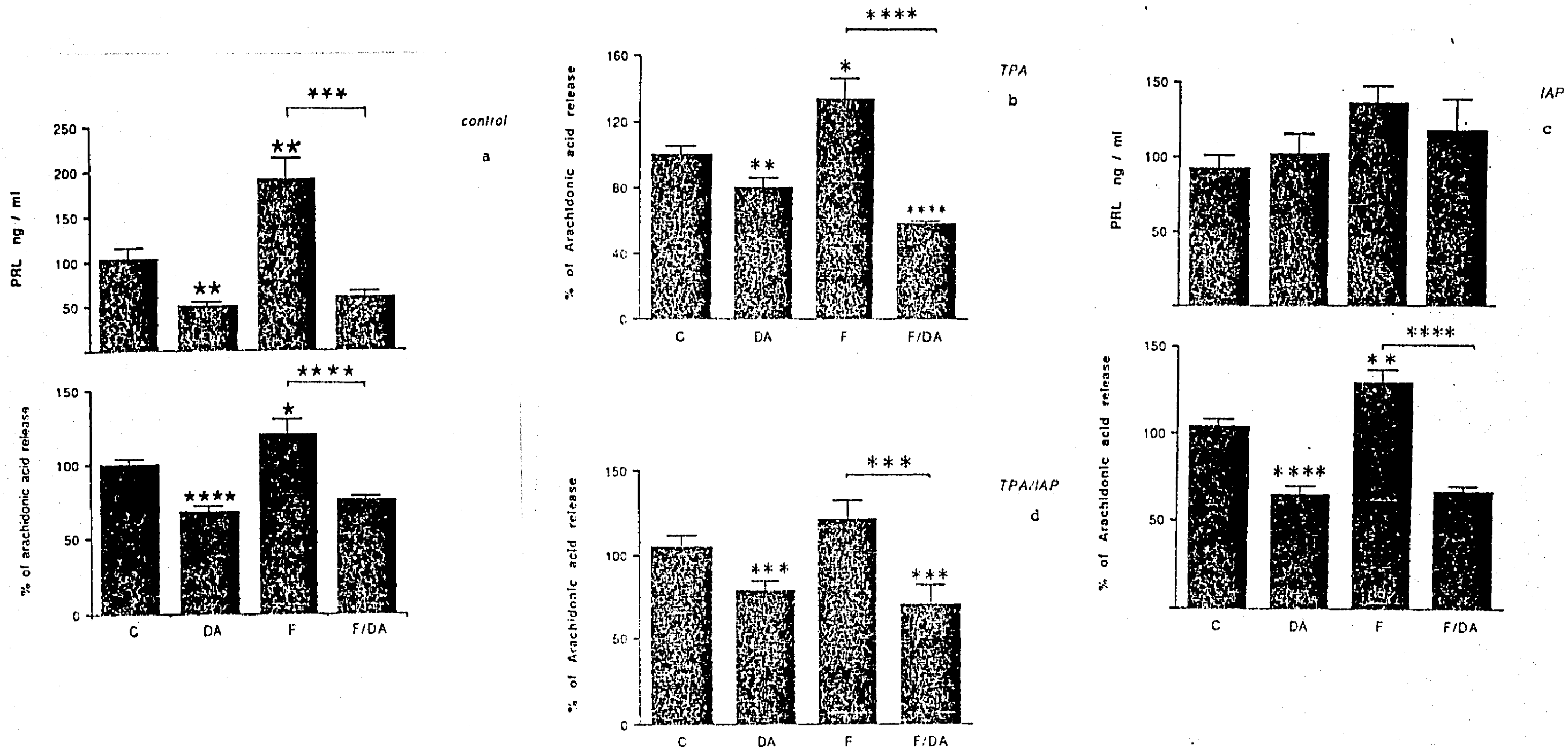


Fig. 9 Liberación de AA y PRL. Efecto de la estimulación del sistema adenilato ciclasa con forskolina (F) e inhibición dopaminérgica. Los tratamientos a,b,c y d son como se indica en la fig. 6. Los datos representan la X + SEM (n varía de 6-20).

	CONTROL	PTX PRETREATED
C	101 ± 8 (9)	72 ± 4 (9)
DA	60 ± 8 (9) ^{***}	88 ± 6 (9)
F	1452 ± 76 (6) ^{***}	1071 ± 62 (6)
F/DA	994 ± 90 (6) ^{***}	1291 ± 60 (6)

Tabla 2 Acumulación de AMPc. Inhibición dopaminérgica basal y estimulada por forrskolina. Efecto del pretratamiento con IAP(24h) notese que el tratamiento provoca la pérdida de la inhibición dopaminérgica. Los datos representan el porcentaje de estimulación con respecto al control(100%) $\bar{X} \pm \text{SEM}$ (n se indica entre paréntesis).

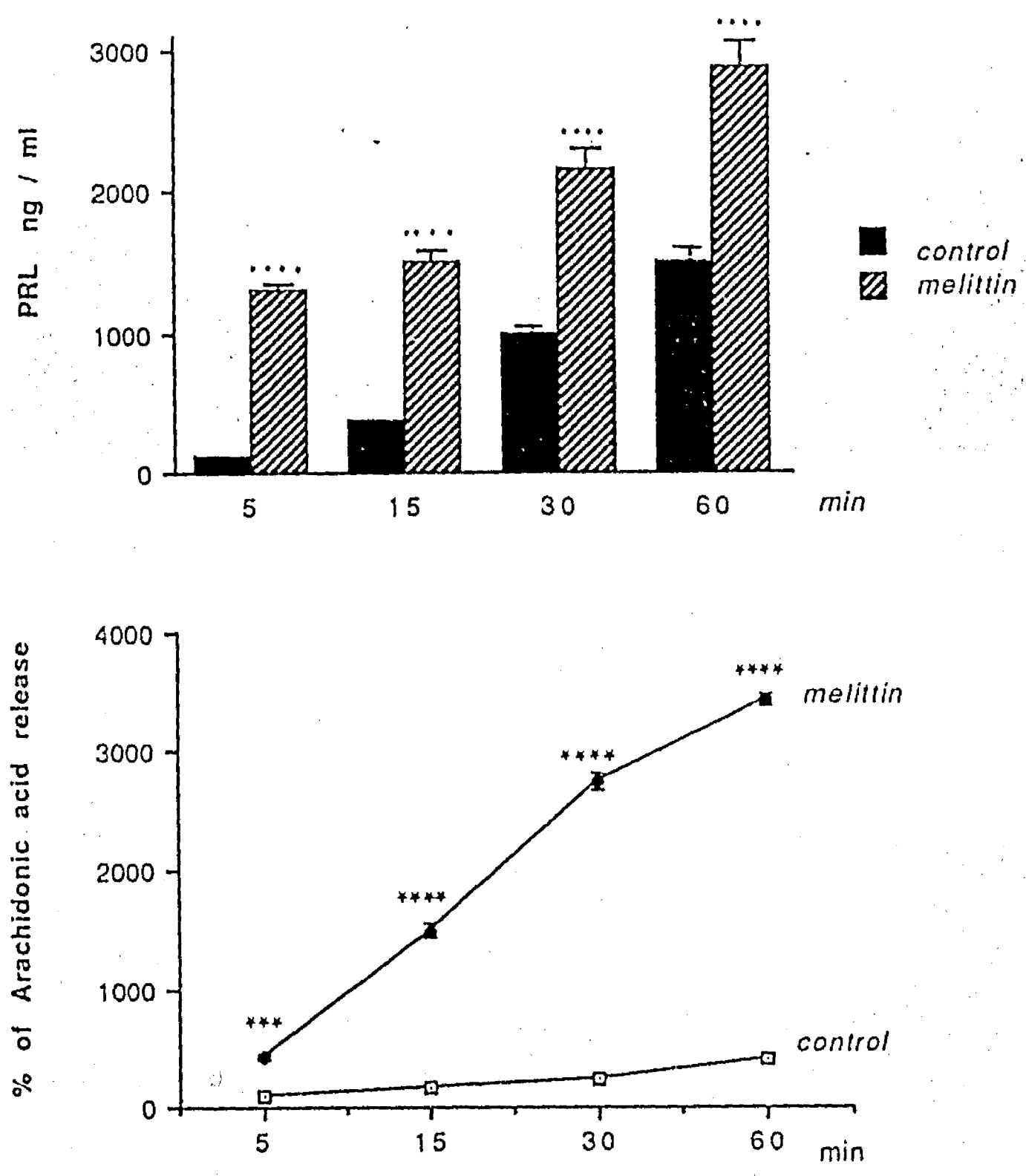


FIG. 10 LIBERACIÓN DE AA Y PRL. CINÉTICA DE LIBERACIÓN EN PRESENCIA DE MELITINA (1 μ g / ml) . EL ÁCIDO ARACHIDÓNICO FUÉ INCORPORADO EN LAS CELULAS DURANTE 180min Y LAS CELULAS FUERON ESTIMULADAS CON LA MELITINA DURANTE EL TIEMPO INDICADO. LOS DATOS SON LA X \pm SEM (n=6)

Tabla 3 Liberación de H-AA de células hipofisarias
dosis-respuesta de melitina, efecto de DA

Dosis	% lib.	AA	PRL ng/ ml
0.1	126 + 6	(9)**	131 + 21 (7)
0.2	135 + 9	(9)**	250 + 34 (9)*
+DA	119 + 8	(9)	200 + 41 (3)
0.5	147 + 14	(9)***	280 + 53 (9)**
+DA	148 + 8	(6)	310 + 45 (3)
1.0	279 + 16	(9)****	615 + 36 (6)****
+DA	289 + 21	(6)	N D
C	100 + 3	(12)	118 + 5 (6)
DA	77 + 1	(6)****	55 + 8 (6)****

Las células fueron incubadas durante 5 min con las diferentes concentraciones de melitina en presencia o ausencia de DA. Los datos son la X + SEM. Los resultados de AA y PRL en presencia de DA comparados contra los correspondientes sin DA no son significativamente diferentes. ND no determinado

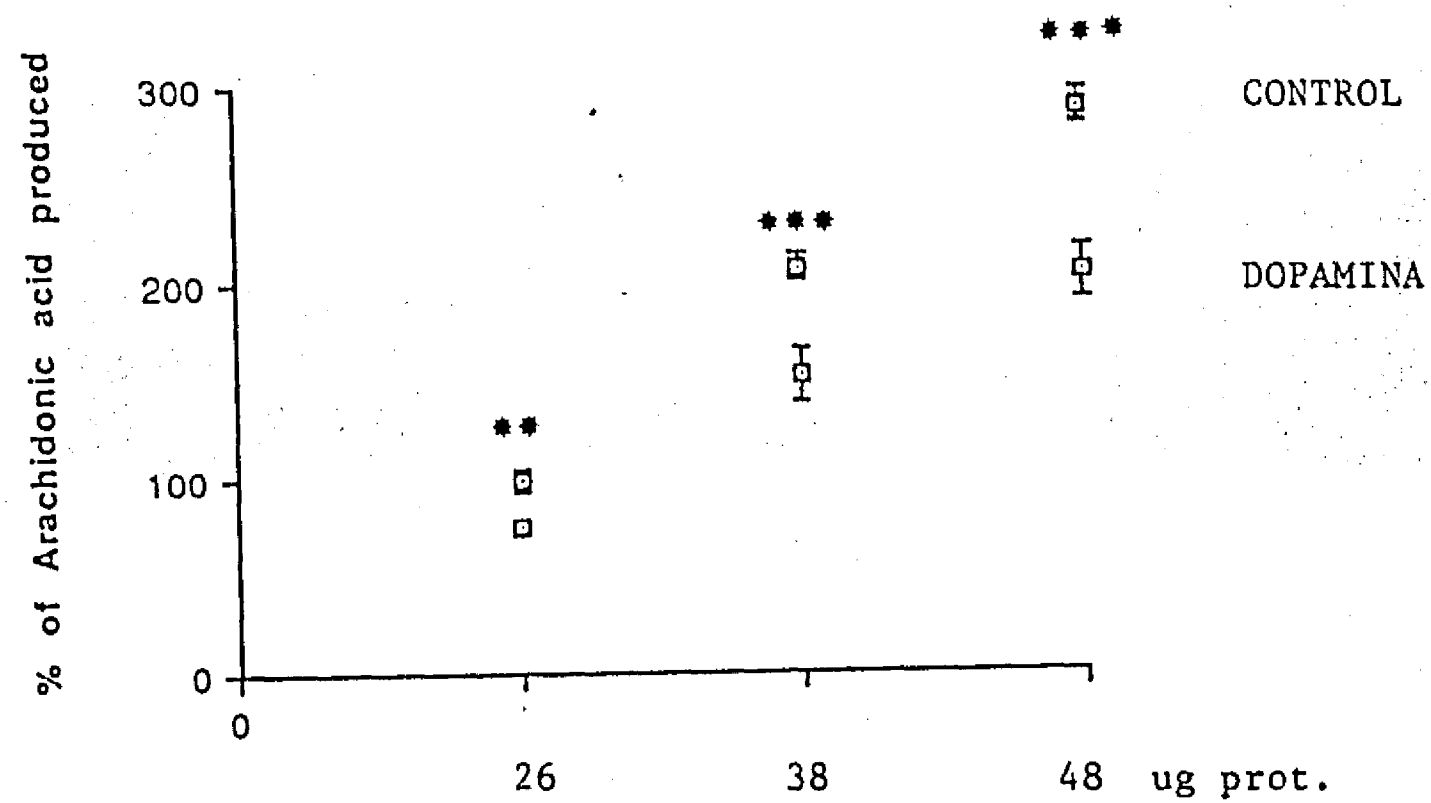


FIG. 11 PRODUCCION DE H-AA A PARTIR DE MEMBRANAS DE CELULAS DE 5 DIAS DE CULTIVO A LAS QUE PREVIAMENTE SE LES INCORPORO EL ACIDO GRASO RADIATIVO (o.n.). EN LA GRAFICA SE MUESTRA LA INHIBICION DOPAMINERGICA. LOS DATOS SON LA $\bar{X} \pm \text{SEM}$ (n=6)

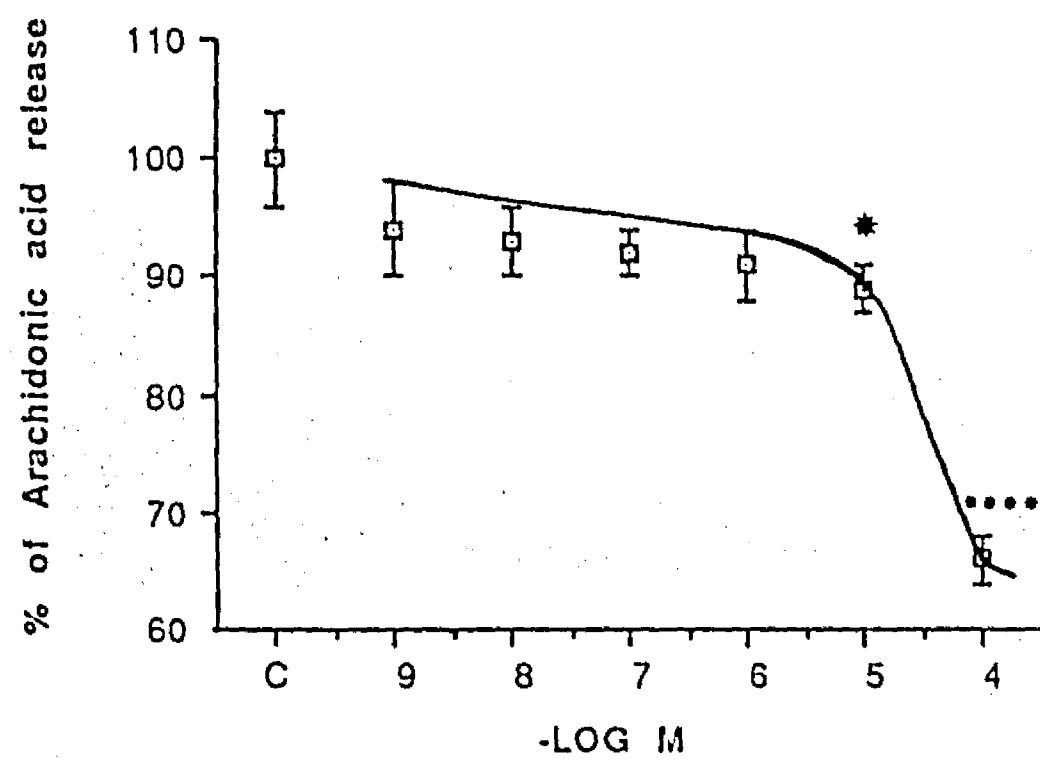


FIG. 12 CURVA DOSIS RESPUESTA DE INHIBICIÓN DOPAMINÉRGICA DE LA PRODUCCIÓN DE ÁCIDO ARAQUIDÓNICO. MEMBRANAS PREPARADAS A PARTIR DE CELULAS EN LAS QUE PREVIAMENTE SE INCORPORO EL ³H-AA FUERON INCUBADAS DURANTE UNA HORA EN PRESENCIA DE DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA AMINA. LOS DATOS SON LA X ± SEM

DISCUSION

La principal función del lactotrofo es la síntesis y liberación de PRL. Esto se lleva a cabo en respuesta a múltiples efectores, tanto hipotalámicos como periféricos, que modifican diversos mensajeros intracelulares. Entre ellos se estudió a dos efectores estimulantes y uno inhibitorio. El efecto estimulador del TRH y la angiotensina II (AII) sobre la liberación de PRL, como se mencionó en la introducción, estaría mediado por la activación de las fosfolipasas PLC (Gershengorn y col. 1985, Simmonds y col. 1985, Canonico y col. 1986, Enjalbert y col. 1986, Kolesnick y col. 1986) y/o PLA2 (Canonico y col. 1985, MacLeod y col. 1986, Judd y col. 1986, 1988) así como por el calcio (Albert y col. 1984, Gershengorn y col. 1984, Schlegel y col. 1984, Enjalbert y col. 1988, y en prensa 1991). La dopamina es el principal inhibidor de la secreción de PRL por el efecto inhibitorio que presenta sobre los niveles de AMPc, PLC y canales iónicos; estos efectos están mediados por proteínas G sensibles a la toxina pertussis (Canonico y col. 1983, Cronin y col. 1983, Enjalbert y col. 1986).

La participación de la cascada araquidónica en la secreción de PRL se sugiere por el efecto que tiene el ácido araquidónico administrado exógenamente o bien por el efecto que produce la inhibición de su producción (Canonico y col. 1983, 1985, Grandison y col. 1984, Camorato y col. 1985, Koike y col. 1985, Judd y col. 1988, Ross y col. 1988); sin embargo, el mecanismo por el cual actúa es desconocido.

El objetivo central de este trabajo consistió en estudiar los eventos intracelulares que median la respuesta del lactotrofo en la liberación de PRL relacionados con la producción de AA.

Los resultados obtenidos en este trabajo, utilizando cultivos de células dispersas de hipófisis, muestran una inhibición en la liberación de ácido araquidónico por dopamina. Este efecto es resistente al tratamiento con la toxina pertussis, lo que sugiere que no está mediado por AMPc, calcio o PLC, como se describió para el efecto de dopamina sobre la secreción de PRL.

El papel del AMPc como mediador del efecto de DA en la liberación de PRL se ha sugerido entre otros paradigmas, por el tratamiento con forskolina que estimula la secreción de PRL e incrementa el nivel de AMPc los cuales se revierten por tratamiento con PTX (Cronin y col. 1983, Enjalbert y col. 1986, Journot y col. 1987). Nuestros resultados muestran este efecto en PRL, a diferencia de los que ocurre con la liberación de AA, descartando así la participación del AMPc en el efecto de DA sobre AA.

Uno de los mecanismos participantes en la inhibición dopaminérgica sobre la secreción de PRL involucra los flujos

cálcicos (Taraskevich y col. 1978, Smith y col. 1982, Schofield y col. 1983, Israel y col. 1985, 1987, Enjalbert y col. 1988). Manipulaciones sobre los niveles de calcio intracelular causaron los efectos esperados en la liberación de PRL. La liberación de ácido araquidónico no fue susceptible al tratamiento con el agonista de canales de calcio (sensibles a DHP-nifedipina) o al agonista (Bk). Si se observó un incremento en la liberación de AA a consecuencia del tratamiento con A 23187 que incrementa fuertemente los niveles intracelulares de calcio. Esto pudiera interpretarse como un efecto mediado a través de la PLA 2 requiriendo concentraciones de calcio mayores que las que se obtienen con Bk; esta interpretación queda como especulación ya que no se determinaron las concentraciones de calcio. El efecto inhibitorio de dopamina es reversible por PTX para la PRL pero no así para la producción de AA.

La PLC produce IP3 y DG, éste último activa la PKC la cual ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la PLC. Nuestra estrategia para definir el papel de la PLC fue desensibilizar las células en PKC mediante tratamiento prolongado con TPA. El efecto inhibitorio de DA se observa tanto en la liberación de PRL como en AA en células pretratadas con TPA. Asimismo, la respuesta de calcio o forskolina no se vio afectada por dicho tratamiento descartando así la posible participación de la PLC en la respuesta a DA.

Los agentes estimuladores de la secreción de PRL, el TRH y la AII, causan también liberación de AA. PTX no tuvo ningún efecto tanto para el TRH como para la AII en la liberación de PRL y AA. Sin embargo, el pretratamiento con TPA, que no afecta la respuesta de PRL ni AA a TRH disminuye la respuesta de PRL y AA a A II. La falta de participación de la PLC sugiere que el receptor de TRH esta acoplado a la fosfolipasa A2 como ha sido propuesto en otros trabajos (Ohmichi y col. 1990).

La estimulación provocada por el TRH en la secreción de PRL es inhibida por DA (Fagin y col. 1982). De los mensajeros intracelulares caracterizados a la fecha, que median la este efecto, la inhibición de la PLC y de los flujos cálcicos ha sido fuertemente involucrada (Israel y col. 1985, 1987, Simmonds y col. 1985, Enjalbert y col. 1986, Martin y col. 1986, Journot y col. 1987, Vallar y col. 1988). El efecto inhibitorio dopaminérgico se observa también en la liberación de AA (nuestros resultados, Judd y col. 1988, Canonico 1989 y col. Omichi y col. 1990). La falta de efecto con los tratamientos con PTX, TPA, ionóforos cálcicos y AMPc en la respuesta de AA sugiere que la producción de otros mensajeros intracelulares que la DA inhibe, no participan en la respuesta.

El conjunto de estos datos permiten proponer que la liberación de AA es un efecto inhibible por DA y estimulable por TRH a través de la activación de la PLA2, mientras que la respuesta a AII estaría mediada por la PLC. Esto constituiría la primer evidencia en la cual la PLA 2 es regulada negativamente vía receptor.

Uno de los intereses en identificar vías alternativas involucradas en la liberación de PRL viene de la observación de que el efecto inhibitorio de la DA no es completamente revertido por PTX. Nos hubiera gustado proponer al ácido araquidónico como responsable del efecto remanente, sin embargo, en nuestras condiciones sí logramos obtener reversión total de la inhibición de PRL por DA aunque no así de AA, en contradicción con otros autores (Canonico y col. 1989, Ohmichi y col. 1990). Dicha discrepancia pudiera deberse a diferencias experimentales

tales como:

1. Diferentes medios de cultivo utilizados (RPMI-1640 vs DMEM-GIBCO), uso de suero de caballo vs fetal bovino.

2. Tiempos de incubación en presencia de DA o de incorporación de AA radiactivo. En este trabajo se utilizó una dosis de DA muy alta (10^{-4}), sin embargo quizá exista menor cantidad efectiva de la amina en las preparaciones ya que no se utilizó ácido ascórbico como antioxidante. Por otro lado aunque en sangre portal se detecte una concentración mucho menor de DA, la concentración local (al- rededor de la célula) podría ser muy superior, como ocurre en el caso de la acetilcolina en la unión neuromuscular durante la estimulación (Matthews y col. 1978). Aunque a tiempos de incorporación corto se observa incorporación de AA en todos los fosfolípidos (Dudley y col. 1986) no es claro si ellos pertenecen a pozas igualmente accesibles a los factores inhibitorios o estimulantes.

3. Tiempo de pretratamiento con PTX, ya que se han descrito dos fases en dichos tratamientos; uno que involucra la ADP-ribosilación de GI,Go (4-5h) y otro, el decremento en el G beta (12-48h). Nosotros utilizamos 24h por lo que estamos en la segunda fase y por lo tanto al afectar la relación de las subunidades de las proteínas G la respuesta podría diferir (Watkins y col. 1989).

Para aclarar si las diferencias mencionadas son el origen de los resultados, es necesario ensayar las condiciones reportadas en otros trabajos y sobre todo extremar las precauciones en el uso de la toxina ya que podría provocar efectos que en condiciones fisiológicas no ocurren.

En conclusión existe un mecanismo dopaminérgico de inhibición de la liberación de AA. Este mecanismo es insensible al tratamiento con la toxina pertussis y de los mecanismos intracelulares conocidos que la DA inhibe, ninguno parece estar involucrado en esta inhibición.

CONCLUSIONES GENERALES

En esta tesis se demuestra que la inactivación del TRH interviene en el proceso de retroalimentación del sistema neuroendócrino. La actividad de las peptidasas específicas del TRH cambia de acuerdo al estado tiroideo. Este cambio ocurre únicamente en la adenohipófisis, participando así en la regulación de la actividad del péptido a nivel de la célula blanco.

El efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad de la PGA II y la tiroliberinasa sérica, implica síntesis de proteínas, ya que se requiere de un tiempo largo antes de observar cualquier cambio y la adición de T3 "in vitro" no tiene efecto sobre la actividad de la PGA II. La carencia de estas hormonas disminuye la actividad enzimática. Otros grupos han mostrado que los estrógenos antagonizan el efecto de las hormonas tiroideas sobre la PGA II (Bauer 1990).

Hasta este momento, la PGA II ha sido localizada casi exclusivamente sobre los lactotrofos, utilizando preparaciones enriquecidas en un tipo celular. Sin embargo es necesario aplicar técnicas que permitan obtener resultados concluyentes, por ejemplo, la purificación de la enzima permitiría la obtención del DNA complementario facilitando la localización "in situ" de la misma, que acompañado de técnicas inmunohistoquímicas para identificar el tipo celular, ayudaría a resolver la aparente carencia de la PGA II en el tirotropo.

De las células hipofisarias el lactotropo se muestra como la célula hiperactiva de sistema, éste se encuentra constantemente bajo el tono inhibitorio de la DA. Esta hiperactividad esta quizá relacionada a la mayor actividad espontánea observada en los lactotrofos comparada con la menor actividad presente en los somatotrofos y la casi inexistente en los tirotrofos (Drouva y col 1988, Musset, 1990). Estas observaciones avalan la relevancia fisiológica de la PGA II preferencialmente sobre el lactotropo.

La presencia de una enzima específica, para degradar al TRH sobre el tirotropo, contribuiría a modular la actividad del péptido en condiciones en las que se secreta gran cantidad del mismo (stress por frío, hipotiroidismo). De otra manera, si solo existe sobre el lactotropo, la actividad de PGA II sería parte del grupo de factores que regula la actividad de esta célula; las hormonas tiroideas, inhiben también la síntesis y liberación de PRL (Maurer 1982, Wood y col 1987), mientras que los estrógenos incrementan su síntesis, almacenamiento y liberación (Agustine y col 1975, Vician y col 1979, Kiino y col 1981, Maurer y col 1977).

Entre los múltiples factores que controlan la secreción de PRL se encuentra el TRH (estimulador) y la dopamina (inhibidor) cuyos mecanismos de acción involucran principalmente a la PLC, el calcio y el AMPc. De éstos, el TRH y el análogo DAnérgico bromocriptina, inhiben la actividad de la PGA II, efecto posiblemente mediado por la vía del calcio y /o PLC. El tratamiento con estrógenos amortiguó el efecto inhibitorio de los ésteres de forbol, apoyando la participación de estas hormonas en el incremento de PKC (Drouva y col 1990).

En la segunda parte de este trabajo se estudiaron los mecanismos intracelulares relacionados con la secreción de la PRL, principalmente aquel que involucra la formación de ácido araquidónico (AA). El TRH

estimula y la DA inhibe la producción de AA a través de mecanismos resistentes a la toxina pertussis y a la disminución de los niveles de PKC. Estas observaciones apoyan la proposición del acoplamiento de los receptores del TRH y DA a la PLA2.

Los factores involucrados en la respuesta a TRH y DA son múltiples, sin embargo es de llamar la atención que aquellos que afectan la actividad de la PGA II afectan también la secreción de PRL. Se podría proponer que el TRH activando su receptor a nivel membranar, estimula la actividad de la PLC, PLA2 y los flujos cálcicos, lo cual mediante un mecanismo aún desconocido afectaría la actividad enzimática de manera local y específica ya que la angiotensina II aún cuando estimula la PLC no cambia la actividad de la PGA II. Si bien la DA inhibe los mecanismos de transducción que el TRH estimula (la liberación de AA incluida), en el caso de la PGA II, ambos factores tienen el mismo efecto inhibitorio.

Con nuestros resultados podemos proponer que el mecanismo por el cual se afecta la actividad enzimática, no parece ser la fosforilación (si se descartan los problemas metodológicos) ya que estas son reacciones rápidas (y además reversibles) que no observamos en nuestros experimentos; efecto similar al que ocurre con el receptor del TRH. Los ésteres de forbol disminuyen la cantidad de receptores a TRH vía síntesis de proteína o cambian la afinidad del receptor (a tiempos cortos) sin que éste se fosforile (Hinkle 1989).

Se percibe que el lactotrofo es una compleja maquinaria en la que varios mensajeros decodifican la señal de un efector que ejerce diversas acciones (TRH: incrementa el RNAm de PRL y su liberación; disminuye la actividad de PGA II y el número de sus receptores) y varios efectores hormonales o peptídicos pueden actuar sobre un mismo mecanismo (TRH y DA sobre PLC, flujos cálcicos y PLA2)

Es necesaria la evaluación de la relevancia fisiológica de la actividad de la PGA II sobre la secreción hipofisaria tanto del lactotrofo como del tirotrofo ya que si bien, el tirotrofo parece una célula muy discreta, es posible que la pequeña cantidad de PGA II que se detecta en ellos participe en el control de su actividad. Afortunadamente existe un inhibidor de la actividad de PGA II (CPHNA) que ayudará al estudio de los mecanismos secretorios en condiciones de inhibición enzimática.

En la figura 7 se resumen los principales factores que regulan la actividad de las células hipofisarias. En lo que podríamos clasificar como efectos a largo plazo, las hormonas tiroideas retroalimentan negativamente la síntesis de TRH a nivel hipotalámico y de TSH y PRL en la hipófisis; ellas modulan negativamente los receptores y positivamente la PGA II. Los estrógenos estimulan tanto la síntesis como la secreción de PRL y favorecen los mecanismos que llevan a la estimulación del lactotrofo ya que desacoplan al receptor DAnérgico de la proteína G que media la respuesta inhibitoria e incrementa el número de receptores a TRH; a largo plazo disminuyen la actividad de PGA II. El TRH estimula la síntesis y secreción de TSH y PRL, efectos que son inhibidos por la DA la cual, a su vez, inhibe la actividad de PGA II.

Todo parece indicar que la actividad del lactotrofo debe regularse de manera concertada, ya que si bien algunos efectores provocan eventos que son paralelos en la dirección de la modulación (por ejemplo la modulación negativa por ésteres de forbol de los receptores a TRH y de la actividad de PGA II) estas coincidencias no explicarían claramente la respuesta fisiológica del lactotrofo. Es quizá más importante la secuencia en la que ocurren los cambios en la célula, la latencia y

duración de éstos. De los mediadores intracelulares que hemos estudiado, el calcio y la melitina (producción de AA) estimulan la actividad de PGA II, sin embargo ellos median la respuesta de diversos factores hipotalámicos por lo que no podemos responsabilizar a uno solo de la actividad del lactotrofo, aunque sí es posible remarcar la importancia que el TRH y la DA tienen en esta actividad.

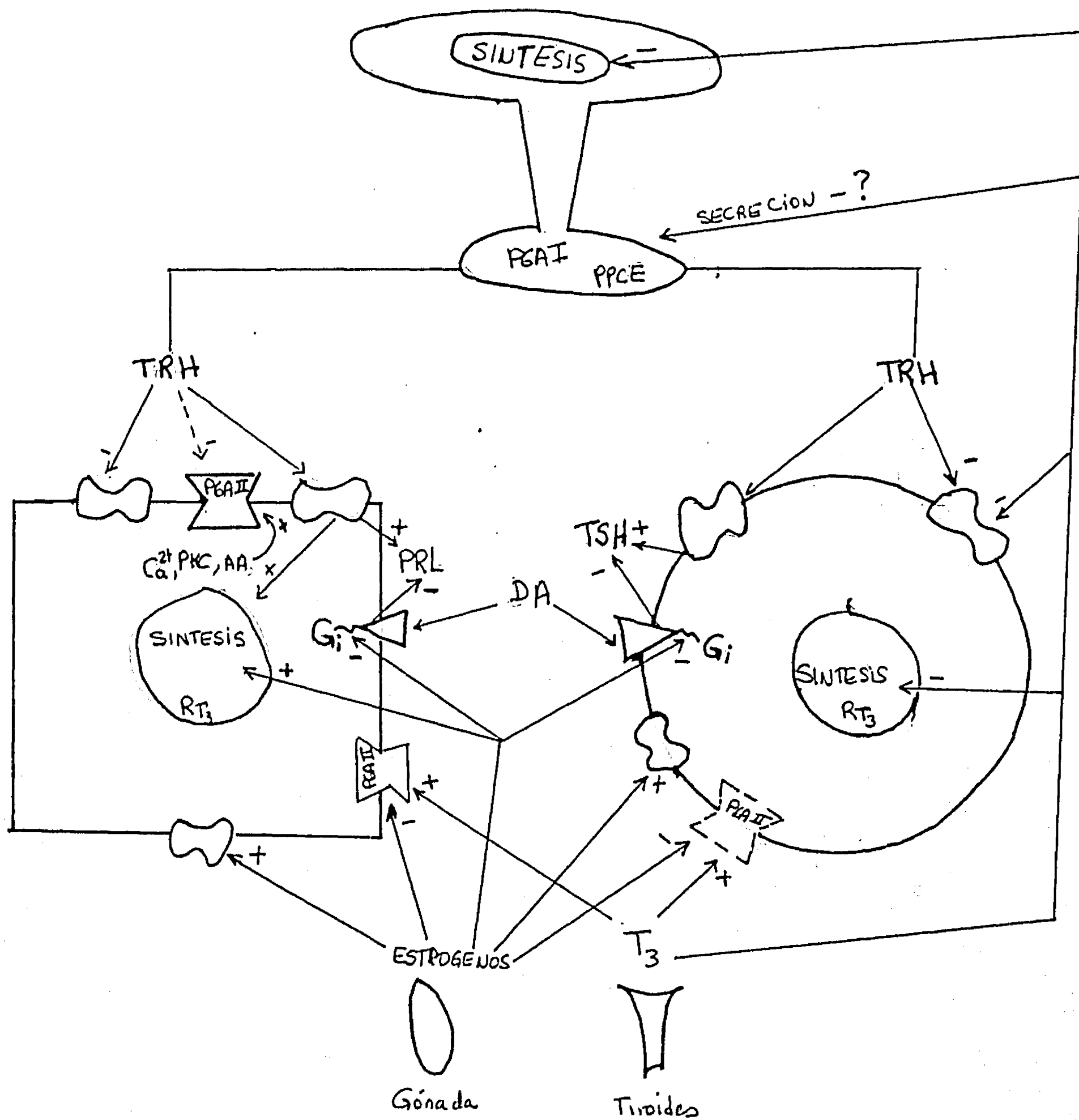
Los resultados de esta tesis invitan a plantear varias alternativas para la continuación del proyecto:

Se requiere evaluar la presencia de la PGA II utilizando otras técnicas que permitan obtener resultados concluyentes. Para la localización celular de la PGA II en la adenohipófisis, Bauer y col. 1990 utilizaron la técnica de separación de células a través de gradientes de albúmina que proporciona fracciones enriquecidas (no puras) en los diferentes tipos celulares, razón por la cual existe siempre una proporción de células que "contamina" la fracción separada.

Es necesario evaluar la actividad secretora del lactotrofo y del tirotrofo en condiciones de inhibición de la PGA II, posiblemente en estas condiciones la actividad sintética de las células también se modifique.

Nosotros hicimos un análisis general de los factores hipotalámicos y periféricos que afectan la actividad de la PGA II en la adenohipófisis, es necesario profundizar en estos estudio con la perspectiva de explorar los mecanismos de acción que median las respuestas.

El TRH tiene otras acciones a nivel del sistema nervioso, resultaría interesante saber si alguna de estas se afecta al inhibir la degradación del TRH por la enzima que lo degrada en la terminal sináptica. El tripeptido ha sido involucrado en los efectos que provocan mejoría en la enfermedad conocida como esclerosis lateral amiotrópica y aunque se desconoce su mecanismo de acción es importante saber si la inhibición de la degradación del péptido optimiza las acciones del TRH en esta enfermedad.



Receptor de TRH



Receptor de dopamina



Receptor de hor. tiroideas

Fig 7 Acciones de TRH sobre el órgano blanco Retroalimentación del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides por las hormonas periféricas y por el TRH. Participación de la PGA II

El presente trabajo fue realizado en su mayoría en el laboratorio de Neuroendocrinología Molecular del CIIGB en Cuernavaca, Mor., bajo la dirección de la Dra. P. Joseph-Bravo. La primera parte de este trabajo: "Estudio de la actividad de PGA II in vivo e in vitro" resultó en la publicación No 1:

"Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones".

Con la aprobación del comité tutorial integrado por los Drs. Patricia Joseph-Bravo, Alfonso González y Carlos Valverde se realizó una estancia de un año en el laboratorio de Dinámica de los Sistemas Endócrinos U-159 del INSERM en Paris, con el objetivo de aprender la técnica de cultivo de células hipofisarias y los mecanismos intracelulares que regulan la función del lactotrofo. Esto permitió realizar los estudios orientados a definir que segundos mensajeros y factores hipotalámicos afectan la actividad de la PGA II.

El conjunto de estos resultados constituye el 70% de trabajo realizado en México requerido para la obtención del grado. La segunda parte, representa el estudio de la producción de ácido araquidónico en la secreción de prolactina, realizado en el Laboratorio del Dr. C. Kordon bajo la supervisión del Dr. A. Enjalbert, que produjo la publicación No 2 (sometida) que se incluye en el apéndice. Se incluye además, la publicación No 3 (en colaboración con la Dra R. Uribe) solo para facilitar la lectura del trabajo de tesis, ya que no se le toma como crédito.

Tissue-Specific Regulation of Pyroglutamate Aminopeptidase II Activity by Thyroid Hormones

Georgina Ponce^a, Jean-Louis Charli^a, Jorge A. Pasten^a, Carmen Aceves^b, Patricia Joseph-Bravo^a

^aDepartamento de Bioquímica, Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, y ^bDepartamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, México

Key Words. TRH catabolism · Pyroglutamate aminopeptidase II · Thyroid status · Thyroliberinase · Adenohypophysis

Abstract. Among the enzymes capable of degrading thyrotropin-releasing hormone (TRH) *in vitro*, two pyroglutamate aminopeptidases (PGA) are specific for TRH: thyroliberinase, a seric enzyme and PGAI, a membrane-bound peptidase. The effect of thyroid hormone status on the activity of these enzymes was evaluated in serum and various tissues. Only in adenohypophysis, triiodothyronine treatment increased PGAI to 376% of control; hypothyroidism produced the reverse effect (decrease to 23% of control). As previously reported, similar changes were observed for thyroliberinase. TRH degradation at the adenohypophysis level may participate in the negative feedback control of thyroid hormones.

Thyroid hormones inhibit thyrotropin (TSH) secretion [14], gene transcription of α and β subunits of TSH [18] and regulate thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptors in adenohypophysis [10]. Regulation of hypophysiotropic factors' metabolism is also involved in feedback effects: thyroid hormones decrease TRH mRNA levels in paraventricular nucleus of hypothalamus [17] and affect TRH degradation in serum [1, 16].

Several enzymes degrade TRH: prolyl endopeptidase (PE; EC 3.4.21.26) and pyroglutamate aminopeptidase I (PGAI; EC 3.4.11.8), two soluble enzymes [2], and a recently characterized [9, 15] membrane-bound PGA activity (PGAI; EC 3.4.11) that, in contrast to PE and PGAI, is highly specific for TRH [15, 21]. PGAI is mainly present in brain and adenohypophysis [8], is enriched in the plasma membrane of nerve terminals [15, 19] as an ectoenzyme [4] and is probably present on the plasma membrane of adenohypophyseal cells [11]. Another PGA activity exists in serum, with similar biochemical properties to PGAI, named thyroliberinase [2].

Thyroid hormones increase thyroliberinase activity in the rat [1, 7] and PGAI activity in GH₃ cells [5], while no effect is observed in either PGAI or PGAI activity of whole brain in rats with altered thyroid status [7]. Since PGAI is not homogeneously distributed in brain [20], we

studied the effect of thyroid hormones on PGAI activity in some brain regions and organs.

Materials and Methods

Male Wistar rats (90-120 days old), fed *ad libitum*, maintained on a 12-hour light-dark cycle, were used in all experiments. Animals were made hyperthyroid by one daily (at 9 a.m.) subcutaneous injection with T₃ (20 μ g/100 g b.w.) for 7 days; control animals received only the vehicle (corn oil); experiments were performed 1 h after the last T₃ injection. Animals were made hypothyroid by feeding them on a low iodide diet for 2 weeks before an intraperitoneal injection of 200 μ Ci ¹³¹I/100 g b.w.; experiments were performed 2 weeks after injection of ¹³¹I; controls were maintained on normal iodine diet. Animals were sacrificed by decapitation at 10 a.m.; trunk blood was collected, stored 2 h at 4 °C, serum separated for T₃ measurement by RIA [6] and thyroliberinase activity determination. Tissues (adenohypophysis, arcuate nucleus-median eminence, rest of hypothalamus, nucleus accumbens-lateral septum, kidney and lungs) were dissected, sonicated in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (10% w/v), centrifuged at 1,000 g for 15 min and supernatants centrifuged at 12,000 g for 15 min. Pellets were used to measure PGAI activity essentially as described [20]; membranes were preincubated (5 min) at 37 °C in 50 mM sodium phosphate buffer pH 7.4, containing 2.5 mM bacitracin and N-ethylmaleimide (final concentrations) and incubated at 37 °C with 100,000 cpm of [³H-pro]TRH (NEN) (10⁻⁶ M TRH final concentration), in 50 μ l final volume. Five-microliter aliquots were taken at the beginning and end of incubation, and assayed as described [20]. Membrane pro-

Received: July 30, 1987

Accepted after revision: May 4, 1988

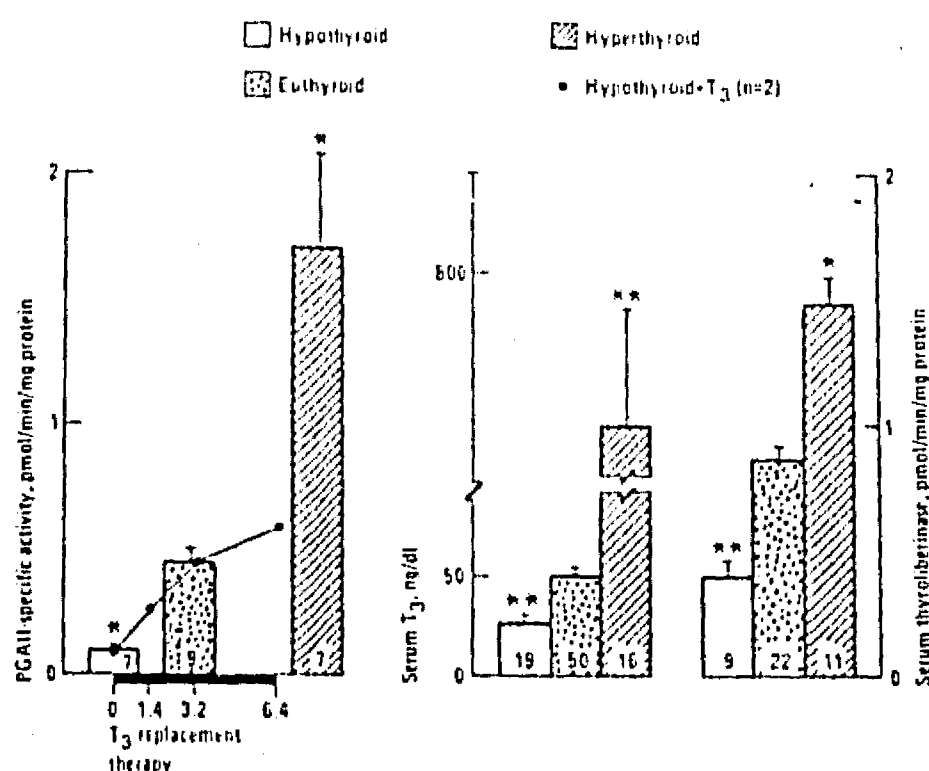


Fig. 1. Effects of thyroid status on PGAI and thyroliberinase specific activities. For T₃ replacement therapy, the number in the x axis is the T₃ dose administered (in µg/100 g b.w.). Results are the mean ± SEM of the number of independent determinations shown inside the histogram. *p < 0.001; **p < 0.01 vs. euthyroids.

tein concentrations (mg/ml): 3.78 ± 0.32 for adenohypophysis; 0.57 ± 0.04 , arcuate nucleus-median eminence; 6.48 ± 0.15 , rest of hypothalamus; 3.44 ± 0.36 , nucleus accumbens-lateral septum. Thyroliberinase activity was measured as described for PGAI except that serum was diluted 1:3 with Tris-HCl 0.1 M, pH 7.4 (7.0 ± 0.3 mg protein/ml). Activities were linear during incubation; depending on the tissue, incubation varied from 15 to 60 min. Lactate dehydrogenase (LDH) activity [12] and protein [13] were determined.

Results

As previously reported [1, 7], thyroliberinase activity was increased by T₃ and decreased by hypothyroidism (fig. 1). After T₃ treatment, PGAI activity was significantly increased only in adenohypophyseal membranes (fig. 1) and it remained unchanged in kidney, lungs (results not shown) and various brain areas. Expressing values as percent of control taken as 100%, mean ± SEM for hypothyroidism and hyperthyroidism were respectively: arcuate nucleus-median eminence, 198 ± 46 (5) and 177 ± 48 (5); rest of hypothalamus, 107 ± 10 (6) and 74 ± 11 (5); nucleus accumbens-lateral septum, 75 ± 19 (6) and 104 ± 6 (5). Maximal T₃ effects on adenohypophyseal PGAI activity were observed as soon as 12 h after one injection, while thyroliberinase activity increased only after several daily injections; hypothyroidism produced a significant decrease (fig. 1). No ef-

fect of T₃ was observed in vitro (not shown). Neither adenohypophysis' weights nor LDH activity were affected by thyroid status.

Discussion

The effect of thyroid status was tissue specific, affecting TRH degradation only in serum and at its target site in the axis: PGAI activity localized on adenohypophyseal membranes. High doses of T₃ were used to induce hyperthyroidism; however, the physiological relevance of the effect was supported by the opposite behavior of PGAI in hypothyroidism, the effect of restitutive therapy with T₃ and absence of effect on LDH activity, demonstrating a strict control of adenohypophyseal PGAI by thyroid hormones. Our results are in agreement with a similar report [3], published while these were submitted for publication, and by studying several brain regions and other organs we corroborated the specificity of the effect. If PGAI is an ectoenzyme in adenohypophysis as in brain, our data suggest that degradation of TRH on adenohypophyseal plasma membranes plays a role in the rapid negative feedback control, more than the delayed changes in thyroliberinase, or in PGAI [5] whose contact with TRH in adenohypophysis has not been demonstrated. The picture which emerges from recent studies is that negative feedback by thyroid hormones involves multiple levels of regulation: TRH metabolism (biosynthesis, release and inactivation), TRH receptors and TSH secretion.

Acknowledgements

The authors wish to acknowledge the technical assistance of Miguel Angel Vargas, Miguel Cisneros and Elizabeth Mata, and the skilful typing of the manuscript by Veronica Aldama. Supported in part by grant No. ICCBXNA-021044 from CONACyT.

References

- 1 Bauer, K.: Regulation of degradation of thyrotropin-releasing hormone by thyroid hormones. *Nature, Lond.* 259: 591-593 (1976).
- 2 Bauer, K.: Biochemical properties of TRH-inactivating enzymes. In: *Thyrotropin-releasing hormone*, Griffiths, E.C.; Bennet, G.W., editors, pp. 103-107 (Raven Press, New York 1983).
- 3 Bauer, K.: Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature, Lond.* 330: 375-377 (1987).
- 4 Charli, J.L.; Cruz, C.; Vargas, M.A.; Joseph-Bravo, P.: The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. int.* (in press, 1988).

- 5 Chen-Shian, S.; Wilk, S.: Regulation of a TRH degrading enzyme in GH₃ cells: induction of pyroglutamylpeptidase I by T₃. *Endocrinology* 121: 770-775 (1987).
- 6 Dutrem, M.T.; Bolaños, F.; Maisterrena, T.; Valverde, R.C.: Utilidad de las determinaciones radioinmunométricas de las hormonas tiroideas en el manejo del hipotiroidismo. *Revta Invest. clin., Méx* 30: 231-240 (1978).
- 7 Emerson, C.; Wu, C.F.: Thyroid status influences rat serum but not brain TRH pyroglutamylaminopeptidase activities. *Endocrinology* 120: 1215-1217 (1987).
- 8 Friedman, T.C.; Wilk, S.: Delineation of a particulate thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J. Neurochem.* 48: 1231-1239 (1986).
- 9 Garat, B.; Miranda, J.; Charli, J.L.; Joseph-Bravo, P.: Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6: 27-40 (1985).
- 10 Hinkle, P.M.; Goh, K.B.C.: Regulation of thyrotropin releasing hormone receptors and responses by L-triiodothyronine in dispersed rat pituitary cells cultures. *Endocrinology* 110: 1725-1731 (1982).
- 11 Horsthemke, B.; Leblanc, P.; Kordon, C.; Wattiaux, C.S.; Wattiaux, R.; Bauer, K.: Subcellular distribution of particle-bound neutral peptidases capable of hydrolyzing gonadoliberin, thyroliberin, enkephalin and substance P. *Eur. J. Biochem.* 139: 315-320 (1984).
- 12 Johnson, N.K.; Whittaker, V.P.: Lactate dehydrogenase as a cytoplasmic marker in brain. *Biochem. J.* 88: 404-409 (1963).
- 13 Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
- 14 Martin, J.B.; Boshans, R.; Reichlin, S.: Feedback regulation of TSH secretion in rats with hypothalamic lesions. *Endocrinology* 87: 1032-1037 (1970).
- 15 O'Connor, B.; O'Cuinn, G.: Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea pig brain. *Eur. J. Biochem.* 144: 271-278 (1984).
- 16 Prasad, C.: Thyrotropin releasing hormone. In: *Handbook of Neurochemistry*, Volume 8, Lajtha, A., editor, pp. 175-200 (Plenum Publ., New York 1985).
- 17 Segerson, T.P.; Kauer, J.; Wolfe, H.C.; Mobtaker, H.; Wu, P.; Jackson, I.M.D.; Lechan, R.M.: Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238: 78-80 (1987).
- 18 Shupnik, M.A.; Chin, W.W.; Habener, J.F.; Ridgway, E.C.: Transcriptional regulation of the thyrotropin subunit genes by thyroid hormone. *J. biol. Chem.* 260: 2900-2903 (1986).
- 19 Torres, H.; Charli, J.L.; Gonzalez, A.; Vargas, M.A.; Joseph-Bravo, P.: Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochemistry int.* 9: 103-110 (1986).
- 20 Vargas, M.A.; Mendez, M.; Cisneros, M.; Joseph-Bravo, P.; Charli, J.L.: Regional distribution of the membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading TRH in rat brain. *Neurosci. Lett.* 79: 311-314 (1987).
- 21 Wilk, S.: Neuropeptide specific peptidase: Does brain contain a specific TRH degrading enzyme? *Life Sci.* 39: 1487-1492 (1986).

Dr. P. Joseph-Bravo
Ceingebi-Unam
AP 510-3
Cuernavaca, Mor. 62270 (Mexico)

BIBLIOGRAFIA

- Abdel-Latif AA (1986) Calcium-mobilizing receptors, polyphosphoinositides and the generation of second messengers. *Pharmacological Rev.* 38:227
- Aguilera G, Harwood JP, Wilson JX, Morell J, Brown JH, Catt KJ (1983) Mechanisms of action of corticotropin-releasing factor and other regulators of corticotropin release in rat pituitary cells. *J Biol Chem* 255:8039
- Albert PR, Tashjian AH Jr. (1984) Thyrotropin-releasing hormone - induced spike and plateau in cytosolic free Ca^{2+} concentrations in pituitary cells. *J Biol Chem.* 259:5827
- Albert PR, Tashjian AH. (1985) Dual actions of phorbol esters on cytosolic free Ca^{2+} concentrations and reconstitution with ionomycin of acute thyrotropin-releasing hormone responses. *J Biol Chem* 260:8746
- Albert PR, Wolfson G, Tashjian AH Jr (1987) Diacylglycerol increases cytosolic free Ca^{2+} concentration in rat pituitary cells. *J Biol Chem.* 262:6577
- Anderson WB, Estival A, Tapiovaara H, Gopalakrishna R (1985) Altered subcellular distribution of protein kinase C (a phorbol ester receptor). Possible role in tumor promotion and the regulation of cell growth: relationship to changes in adenylate cyclase activity. *Adv in Cycl Nucl and Prot Phosph Res.* 19:287
- Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I and Astier H (1983) Direct evidence of short term cold induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 37:225
- Augustine EC, MacLeod RM. (1975) Prolactin and growth hormone synthesis: effects of perphenazine, alpha-methyl-tyrosine and estrogen in different thyroid state. *Proc Soc Exp Biol Med.* 150:551
- Axelrod J, Burch RM, Jelsema CL (1988) Receptor-mediated activation of phospholipase A2 via GTP-binding proteins: arachidonic acid and its metabolites as second messengers. *TINS* 11:117
- Asakawa T, Takenoshita M, Uchida S, Tanaka S (1978) Activation of guanylate cyclase in synaptic membranes of cerebral cortex by free fatty acids. *J Neurochem.* 30:161
- Baes M, Allaerts W, Deneef C (1987) Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 120:685
- Baes M, Deneef C (1987) Evidence that stimulation of growth hormone release by epinephrine and vasoactive intestinal peptide is based on cell-to-cell communication in the pituitary. *Endocrinology* 120:280
- Bauer K (1976) Regulation of degradation of thyrotropin releasing hormone by thyroid hormones. *Nature* 259:591

- Bauer K, Novak P (1979) Characterisation of a thyroliberin degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyroliberin at the pyroglutamy-histidine bond. *Eur. J Biochem.* 99:239
- Bauer K, Kleinkauf H (1980) Catabolism of thyroliberin by rat adenohypophyseal tissue extract. *Eur J Biochem* 106:107
- Bauer K, Novak P, Kleinkauf H (1981) Specificity of a serum peptidase hydrolysing thyroliberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur J Biochem* 118:173
- Bauer K (1987) Adenohypophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormone. *Nature* 330:375
- Bauer K (1988) Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 70:69
- Bauer K, Schulz M (1988) Inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH) by a hormonally regulated ectoenzyme of anterior pituitary. *Biol Chem Hoppe Seyler* 269:1195
- Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Deneef C. (1990) Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 127:1224
- Baird A, Bohlen P, Ling N, Guillemin R (1985) Radioimmunoassay for fibroblast growth factor (FGF): release by the bovine anterior pituitary in vitro. *Regulatory peptides* 10:309
- Ballou LR, Cheung WY (1985) Inhibition of human platelet phospholipase A2 activity by unsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci USA* 82:371
- Barbour B, Szatkowski M, Ingledew N, Attwell D (1989) Arachdonic acid induce a prolonged inhibition of glutamate uptake into glial cells. *Nature* 342:918
- Barnea A, Ben-Jonathan N, Porter JC (1976) Characterization of hypothalamic subcellular particles containing luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin releasing hormone. *J Neurochem.* 27:477
- Beach JE, Smallridge RC, Chiang PK, Fein HG (1988) Reversal of inhibition of prolactin secretion in cultured pituitary cells by muscarinic antagonists. *J Pharmacol Exper Therap* 246:548
- Bean BP (1989) Classe of calcium channels in vertebrate cells. *Ann Rev Physiol.* 51:367
- Bell JD, Brunton LL (1986) Enhancement of adenylate cyclase activity in 649 lymphoma cell by phorbol esters. *J Biol Chem* 261:12036
- Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter JC (1977) Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* 100:452

- Benn-Jonathan N, Neill MA, Arbogast LA, Peters LL, Hoefler MT. (1980) Dopamine in hypophyseal portal blood: relationship to circulating PRL in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* 106:690
- Bennet GW and Keelung M (1981) H2 mediated histamine induced release of thyrotropin releasing hormone from hypothalamic synaptosomes: a neuroendocrine role for histamine. *Br J Pharmacol* 72:151
- Berridge MJ (1985) Les molécules de la communication dans la cellule. *Pour la Science* 98:134
- Berridge MJ, Irvine RF (1989) Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341:197
- Bethea CL, Sprangers SA, West NE, Brenner RM. (1988) The effect of simultaneous versus sequential estradiol and progesterone treatments on prolactin production in monkey pituitary cell cultures. *Endocrinology* 122:1786
- Billah MM, Lapetina EG, Cuatrecasas P (1980) Phospholipase A2 and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, Ca⁺ requirement, pH dependence, and cellular localization. *J Biol Chem* 255:10227
- Birnbaumer L (1990) G proteins in signal transduction. *Ann Rev Pharmacol Toxicol.* 30:675
- Bonney RC, Qizilbash ST, Franks S (1987) Endometrial phospholipase A2 enzymes and their regulation by steroid hormones. *J Steroid Biochem* 27:1057
- Bonney RC, Franks S (1988) Hydrolysis of phosphatidylinositol by human endometrium: modulating effects of steroid on arachidonic acid and 1,2-diacylglycerol release. *J Endocr* 117:309
- Borgundvaag B, George SR (1988) Estrogen regulation of anterior pituitary adenylate cyclase. *Mol Cell Endocrinol.* 59:35
- Brandi AM, Joannidis S, Peillon F, Joubert D (1990) Changes of prolactin response to dopamine during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology* 51:449
- Erabant G, Wickings EJ, Nieschlag E (1981) The TRH metabolic histidyl-proline-diketopiperazine (DK) inhibits prolactin secretion in male rhesus monkeys. *Acta Endocrinol.* 98:189
- Brock TA, Rittenhouse SE, Powers CW, Ekstein LS, Gimbrone MA Jr, Alexander RW (1985) Phorbol ester and 1-oleoyl-2-acetylglycerol inhibit angiotensin activation of phospholipase C in cultured vascular smooth muscle cells. *J Biol Chem.* 260:14158
- Brockes JP, Lemke GE, Balzer DR, Jr (1980) Purification and preliminary characterization of a glial growth factor from the bovine pituitary. *J Biol Chem.* 255:8374
- Browne P, Phelan J, O'Cuinn G (1981) TRH pyroglutamate aminopeptidase

activity in two different subcellular fractions of guinea-pig brain. *Ir J Med Sci.* 150:348

Browne P, O'Cuinn G (1983) An evaluation of the role of a pyroglutamyl peptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidyl aminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of thyroliberin. *Eur J Biochem.* 137:75

Brownstein MJ, Palkovits M, Saavedra JM, Bassiri RM, Utiger RD (1974) Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of the brain. *Science* 185:269

Brunet N, Gourdj D, Tixier-Vidal A, Pradelles PH, Morgat JL, Fromageot P (1974) Chemical evidence for associated TRF with subcellular fractions after incubation of intact rat prolactin cells (GH3) with 3H-labeled TRF. *FEBS Letts.* 38:129

Burch RM, Luini A, Axelrod J. (1986) Phospholipase A2 and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to 1-adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.*83:7201

Burch RM, Axelrod J. (1987) Dissociation of bradikinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc.Natl.Acad.Sci.*84:6374

Buttner N, Siegelbaum SA, Volterra A. (1989) Direct modulation of Aplysia S-K⁺ channels by a 12-lipoxygenase metabolite of arachidonic acid. *Nature* 342:553

Camoratto AM, Grandison L (1985) Evidence supporting a correlation between arachidonic acid release and prolactin secretion from GH3 cells. *Endocrinology* 116:1506

Canonico PL, Schettini G, Valdenegro CA, MacLeod RM. (1983) Arachidonic acid metabolism and prolactin secretion in vitro: a possible role for the lipoxygenase products. *Neuroendocrinology* 37:212

Canonico PL, Valdenegro CA, MacLeod RM (1983b) *Endocrinology* 113:7

Canonico PL, Judd AM, Kioke K, Valdenegro CA, MacLeod RM. (1985) Arachidonate stimulates prolactin release in vitro a role for the fatty acid and its metabolites as intracellular regulator(s) in mammatrophs. *Endocrinology* 116:218

Canonico PL, MacLeod RM (1986) Angiotensin peptides stimulate phosphoinositide breakdown and prolactin release in anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 118:233

Canonico PL; Speciale C, Sortino MA, Cronin MJ, MacLeod RM (1986b) Growth hormone releasing factor (GRF) increases free arachidonate levels in the pituitary: a role for lipoxygenase products. *Life Sci.* 38:267

Canonico PL. (1989) D-2 Dopamine receptor activation reduces free 3H-

Arachidonate release induced by hypophysiotropic peptides in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 125:1180

Capdevila J, Snijder GD, Falck JR (1984) Epoxygenation of arachidonic acid by rat anterior pituitary microsomal fraction. *FEBS* 178:319

Carmeliet P, Deneef C (1988) Immunocytochemical and pharmacological evidence for an intrinsic cholinomimetic system modulating prolactin and growth hormone release in rat pituitary. *Endocrinology* 123:1128

Caron MG, Beaulieu M, Raymond V, Gagne B, Drouin J, Lefkowitz RJ, Labrie F. (1978). Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J. Biol. Chem.* 104:307

Carroll PT, Smith LK (1990) Effect of phospholipase C from *Bacillus cereus* on the release of membrane-bound choline-O-acetyltransferase from rat hippocampal tissue. *J Neurochem.* 54:1047

Cashman JR, Hanks D, Weiner RI. (1987) Epoxy Derivates of arachidonic acid are potent stimulators of prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 46:246

Channon JY, Leslie CC (1990) A calcium-dependent mechanism for associating a soluble arachidonoyl-hydrolysing phospholipase A2 with membrane in the macrophage cell line RAW 264.7. *J Biol Chem* 265:5409

Charli JL, Rotsztein WH, Pattou E, Kordon C (1978) Effect of neurotransmitters on in vitro release of luteinizing-hormone-releasing hormone from the mediobasal hypothalamus of male rats *Neurosci. Lett* 10:159

Charli JL, Ponce G, McKelvy JF, Joseph-Bravo P (1984) Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J Neurochem* 42:981

Charli JL, Méndez M, Joseph-Bravo P, Wilk S (1987) Specific inhibitors of pyroglutamyl peptidase I and prolyl endopeptidase do not change TRH in vitro release of TRH or its content in rodent brain. *Neuropeptides* 9:373

Charli JL, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P (1988) The narrow specificity pyroglutamate amino peptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem Int.* 13:237

Charli JL, Méndez M, Vargas MA, Cisneros M, Assai M, Joseph-Bravo P, Wilk S (1989) Pyroglutamyl peptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 14:191

Chen CL, Meites J. (1970) Effects on estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 86:503

Childs GV, Yang HY, Tobin RB, Wilber JF, Kubek M (1981) Effects of thyroidectomy, propylthiouracil and thyroxine on pituitary content and immunocytochemical staining of thyrotropin (TSH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *J Histochem. Cytochem.* 29:357

- Codina J, Grenet D, Yatani A, Birbaumer L, Brown AM. (1987) Hormonal regulation of pituitary GH3 cells K⁺ channels by G is mediated by its alfa-subunit. FEBS lett. 216:104
- Cockle SM, Smyth DG (1988) Processing of thyrotropin releasing hormone-related peptides in rabbit hypothalamus and prostate. Biochemical Society Transactions 626th Meeting, Sheffield, p. 784
- Conklin BR, Burch RM, Steranka LR, Axelrod J (1988) Distinct bradykinin receptors mediate stimulation of prostaglandin synthesis by endothelial cells and fibroblast. J Pharmacol Exp Ther 244:646
- Corbin JD, Cobb CE, Beebe SJ, Ganner DK, Koch SR, Gattys TW, Blackmore PF, Francis SH, Wells JN (1988) Mechanism and function of cAMP and cGMP-dependent protein kinases. Adv in second messenger and phosphoprotein Res. 21:75
- Covarruvias L, Uribe RM, Méndez M, Charli JL and Joseph-Bravo P. (1988) Neuronal TRH synthesis: Developmental and circadian TRH mRNA levels. Biochem Biophys Res Comm 151:615
- Covarruvias L, Charli JL, Vargas MA, Redondo JL and Joseph-Bravo P. TRH release responsiveness to high potassium in vitro correlates with mRNA levels in vivo (en preparación)
- Croxtton TL, Ben-Jonathan N, McD. Armstrong W (1988) Gonadotropin-releasing hormone induces oscillatory membrane currents in rat gonadotropes. Endocrinology 123:1783
- Curran T, Franza BR (1988) Fos and Jun: The AP-1 connection. Cell 55:395
- Cronin MJ, Roberts JM, Weiner RI (1978) Dopamine and dihydroergocryptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. Endocrinology 103:302
- Cronin MJ, Myers GA, MacLeod RM, Hewlett EL (1983) Pertussis toxin uncouples dopamine receptor mediated inhibition of prolactin release. Am. J. Physiol. 244:E499
- Cruz C, Charli JL, Joseph-Bravo P (1990) Neuronal localization of pyroglutamyl peptidase II. sometido
- Cruz LJ, Olivera BM (1986) Calcium channel antagonists. J Biol Chem. 261:6230
- Davis MH, Pieringer J (1987) Regulation of dipeptidyl aminopeptidase I and angiotensin converting enzyme activities in cultured murine brain cells by cortisol and thyroid hormone. J Neurochem. 48:447
- De Camilli P, Maconi D, Spada A. (1979) Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin secreting pituitary adenoma. Nature 278: 252
- Delbeke D, Kojima I, Dannies p, Rasmussen H (1984) Synergistic stimulation of prolactin release by phorbol esters, A23187 and forskolin. Biochem Biophys Res Comm. 123:735

De Lean A, Ferland L, Drouin J, Kelly PA, Labrie F (1977) Modulation of pituitary thyrotropin releasing hormone receptor levels by estrogens and thyroid hormones. *Endocrinology* 6:1496

Demarest KT, Moore KE (1981) Sexual differences in the sensitivity of tuberoinfundibular dopamine neurons to the action of prolactin. *Neuroendocrinology* 33:230

Deneef C (1981) LHRH stimulates prolactin release from rat pituitary lactotrophs cocultured with a highly purified population of gonadotrophs. *Ann Endocrinol.* 42:65

Deneef C (1984) Functional interrelationships between pituitary cells. En: Proceedings of the third European workshop on pituitary adenomas. SWJ Lamberts, FJH Tilders, EA Vanderveen, J Assies, eds. Amsterdam: Free University Press, p.25

Deneef C, Andries M (1983) Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 112:813

Deneef C (1986) Paracrine interactions in the anterior pituitary. *Clin Endocrinol Metab.* 15:1

Deneef C, Baes M, Schramme C (1986) Paracrine interactions in the anterior pituitary: role in the regulation of prolactin and growth hormone secretion. En: *Frontiers in neuroendocrinology*, WF Ganong, L Martini, eds. New York, Raven, vol 9, p. 115

Deneef C, Schramme C (1985) Regulation of prolactin release by angiotensin. *Horm Res Basel* 22:135

Deneef C, Robberecht W, Mignon A (1988) Paracrine activity of gonadotrophs in anterior pituitary. New perspectives. En: *The brain and female reproductive behaviour*. En: *Frontiers in gynecological endocrinology series*. AR Genazzani, ed. The Parthenon Publishing Group. p.81

De Reimer SA, Strong JA, Albert KA, Greengard P, Kaczmarek LK (1985) Enhancement of calcium current in *Aplysia* neurones by phorbol ester and protein kinase C. *Nature* 313:313

Deschepper CF, Crumrine DA, Ganong WF (1986) Evidence that the gonadotrophs are the likely site of production of angiotensin II in the anterior pituitary of the rat. *Endocrinology* 119:36

Dorflinger LJ, Schonburnn A (1983) Somatostatin inhibits basal and vasoactive intestinal peptide-stimulated hormone release by different mechanisms in GH pituitary cells. *endocrinology* 113:1551

Dray F, Kouznetzova B, Harris D, Brazeau P (1980) Role of prostaglandins on growth hormone secretion: PGE₂ a physiological stimulator. En: *Adv in prostaglandins and tromboxane Res.* 8:1321

Drouva SV, Enjalbert A, Laplante E, Rerat E, Kordon C (1986a) Estradiol 17 β increases membrane phospholipid methylation of rat anterior

pituitary cells in culture. 6th European Society for Neurochemistry Meeting, Molecular Basis of neural function, Prague Tchecoslovaquie, p. 372

Drouva SV, Laplante E, Leblanc P, Bechet JJ, Clauser H, Kordon C (1986b) Estradiol activates methylating enzyme (s) involved in the conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine in rat pituitary membranes. *Endocrinology* 119:2611

Drouva SV, Rerat E, Leblanc P, Laplante E, Kordon C (1987) Variations of phospholipid methyltransferase(s) activity in the rat pituitary: estrous cycle and sex differences. *Endocrinology* 121:569

Drouva SV, Rerat E, Bihoreau C, Laplante E, Rasolonjanahary R, Clauser H, Kordon C. (1988) Dihydropyridine-sensitive calcium channel activity related to prolactin, growth hormone and luteinizing hormone release from anterior pituitary cells in culture: interaction with somatostatin, dopamine and estrogens. *Endocrinology* 123:2762

Drouva SV, Gorenne I, Laplante E, Rerat E, Enjalbert A (1990) Estradiol modulates protein kinase C (PKC) activity in the rat pituitary in vivo and in vitro. *Endocrinology* 126:536

Duello TM, Nett TM, Farquhar MG (1983) Fate of a gonadotropin-releasing hormone agonist internalized by rat pituitary gonadotrophs. *Endocrinology* 112:1

Dudley DT, Spector AA (1986) Inositol phospholipid arachidonic acid metabolism in GH3 pituitary cells. *Biochem J* 236:235

Dufy B, Jaken S, Barker JL (1987) Intracellular Ca²⁺ dependent protein kinase C activation mimics delayed effects of thyrotropin-releasing hormone on clonal pituitary cell excitability. *Endocrinology* 121:793

Dumuis A, Sebben M, Haynes J-P, Bockaert J. (1988) NMDA receptors activate the arachidonic acid cascade system in striatal neurons. *Nature* 336:68

Dupont A, Labrie F, Levasseur L, Dussault JH, Schally AV (1976) *Clin Endocrinol* 5:323

Dutrem MT, Bolaños F, Maisterrena T, Valverde RC. (1978) Utilidad de las determinaciones radioinmunitarias de las hormonas tiroideas en el manejo del hipotiroidismo. *Revta Invest Clín Méx.* 30:231

Eipper BA, Myers AC, Mains RE (1985) Peptidyl-glycine alpha-amidation activity in tissues and serum of the adult rat. *Endocrinology* 116:2497

Eipper BA, Mains RE (1988) Peptide alpha-amidation. *Ann Rev Physiol.* 50:333

Elmore MA, Griffiths EC, O'Connor B, O'Cuinn G (1989) Further characterisation of the substrate specificity of a TRH hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase from guinea-pig brain. *Neuropeptides en prensa*

Enjalbert A, Ruberg M, Arancibia S, Priam M, Bauer K, Kordon C (1979)

Inhibition of in vitro PRL secretion by histidyl diketopiperazine, a degradation product of TRH. Eur J Pharmacol 58:97

Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg M, Priam M, Bluet-Pajot MT, Rotsztejn W, Kordon C (1980) Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. Neuroendocrinology 31:200

Enjalbert A, Arancibia S, Priam M, Bluet-Pajot MT, Kordon C (1982) Neurotensin stimulation of prolactin secretion in vitro. Neuroendocrinology 34:95

Enjalbert A, Bockaert J. (1983) Pharmacological characterization of D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. Mol. Pharmacol 23:576

Enjalbert A, Bockaert J, Epelbaum J, Moyses E, Kordon C (1984) Modulation of prolactin secretion at the pituitary level: involvement of adenylate cyclase. In: Hormonal control of the hypothalamo-pituitary gonadal axis. Kenneth W, Mac Kerns, ed. Plenum Publishing Corporation.

Enjalbert A, Sladeczek F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, Garcia-Sainz A, Jard S, Lombard C, Kordon C, Bockaert J (1986) Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate production in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion. J Biol Chem. 261:4071

Enjalbert A, Musset F, Chenard C, Priam M, Kordon C, Heisler S. (1988) Dopamine inhibits prolactin secretion stimulated by the calcium channel agonist Bay-k-8644 through a pertussis toxin-sensitive G-protein in anterior pituitary cells. Endocrinology 123:406

Enjalbert A, Guillon G, Mouillac B, Audinot V, Rasolonjanahary R, Kordon C, Bockaert J. (1991) Dual mechanisms of inhibition by dopamine of basal and TRH stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. Evidence for an inhibition not mediated by voltage dependent Ca²⁺ channels. J.Biol.Chem. en prensa.

Enyeart JJ, Aizawa T, Hinkle PM. (1986) Interaction of Dihydropyridine Ca⁺⁺ agonist BAY-K-8644 with normal and transformed pituitary cells. Am.J. Physiol.250:C95

Enyeart JJ, Hinkle PM (1984) The calcium agonist Bay K 8644 stimulates secretion from a pituitary cell line. Biochem biophys Res Commun. 122:991

Enyeart JJ, Aizawa T, Hinkle PM (1986) Interaction of dihydropyridine Ca²⁺ agonist Bay K 8644 with normal and transformed pituitary cells. Am J Physiol, Cell Physiol. 19:C95

Enyeart JJ, Sheu SS, Hinkle PM.(1987) Dihydropyridine modulators of voltage sensitive Ca⁺⁺ channels specifically regulate prolactin production by GH4C1 pituitary tumor cells. J.Biol.Chem.262:3154

Exton JH.(1990) Signaling through phosphatidylcholine breakdown. J.Biol.Chem. 265:1

Faivre-Bauman A, Loudes C, Barret A, Tixier-Vidal A, Bauer K (1986)

Possible role of neuropeptide degrading enzymes on thyroliberin secretion in fetal hypothalamic cultures grown in serum free medium. *Neuropeptides* 7:125

Fagin KD, Neill JD (1982) The effect of dopamine on TRH induced prolactin secretion in vitro. *Endocrinology* 109:1835

Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J. (1990) Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad Sci* 87:2187

Fink G, Koch Y, Aroya NB (1982) Release of thyrotropin releasing hormone into hypophyseal portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res.* 243:186

Findell PR, Weinwr RI (1988) Bovine pituitary folliculo-stellate cells have b-adrenergic receptors positively coupled to adenosine 3',5'-cyclic monophosphate production. *Endocrinology* 123:2454

Foord SM, Peters JR, Dieguez C, Scanlon MF, Hall R (1983) Dopamine receptors on rat anterior pituitary cells in culture: functional correlation with the inhibition of TSH and PRL secretion. *Endocrinology* 112:1567

Foord SM, Peters JR, Dieguez C, Jasani B, Hall R, Scanlon MF (1984) Hypothyroid pituitary cells in culture: an analysis of thyrotropin and prolactin responses to dopanimine (DA) receptor binding. *Endocrinology* 115:407

Foord SM, Peters JR, Dieguez C, Shewring G, Hall R, Scanlon MF (1986) Thyrotropin regulates throtroph responsiveness to dopamine in vitro. *Endocrinology* 118: 1319

Friedman TC, Kline TB, Wilk S (1985) 5-oxoprolinal: transition state aldehyde inhibitor of pyroglutamyl peptide hydrolase. *Biochemistry* 24: 3907

Friedman TC, Wilk S (1986) Delineation of a particulate thyrotropin releasing hormone degrading enzyme in rat brain by the use of specific inhibitors of prolyl endopeptidase and pyroglutamyl peptide hydrolase. *J Neurochem.* 46:1231

Fukuda H, Oshima K, Mori M, Kobayashi I, Greer MA. (1980) Sequential changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat. *Endocrinology* 107:1711

Galizzi JP, Qar J, Fosset M, Van Renterghem C, Lazdunski M (1987) Regulation of calcium channels in aortic muscle cells by protein kinase C activators (diacylglycerol and phorbol esters) and by peptides (vasopressin and bombesin) that stimulate phosphoinositide breakdown. *J Biol Chem* 262:6947

Garat B, Miranda J, Charli JL, Joseph-Bravo P (1985) Presence of a membrane bound pyroglutamyl aminopeptidase degrading thyroliberin

releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 6:27

Gershengorn MC, Marcus-Samuels BE, Geras E (1979) Estradiol increases the number of thyrotropin-releasing hormone receptors on mammotropic cells in culture. *Endocrinology* 105:171

Gershengorn MC, Geras E, Purrello VS, Rebecchi MJ (1984) Inositol triphosphate mediates thyrotropin-releasing hormone mobilization of nonmitochondrial calcium in rat mamotrophic pituitary cells. *J Biol Chem.* 259:10675

Gershengorn MC (1985) Thyrotropin-releasing hormone action: mechanism of calcium-mediated stimulation of prolactin secretion. *Recent Progr horm Res.* 41:607

Goodridge AG, Adelman TG (1976) Regulation of malic enzyme synthesis by insulin, triiodothyronine and glucagon in liver cells in culture. *J Biol Chem.* 251:3027

Gourdji D, Bataille D, Vauckin N, grouselle D, Rosselin G, Tixier-Vidal A (1979) Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates prolactin (PRL) release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GH3/B6). Additive effects of VIP and TRH on PRL release. *FEBS lett.* 104:165

Grant G, Vale W, Guillemin R (1972) Interaction of thyrotropin releasing factor with membrane receptors of pituitary cells. *biochem Biophys Res Commun.* 46:28

Gronich JH, Bonventre JV, Nemenoff RA (1988) Identification and characterization of a hormonally regulated form of phospholipase A2 in rat renal mesangial cells. *J Biol Chem* 263:16645

Grandison L (1984) Stimulation of anterior pituitary prolactin release by melittin, an activator of phospholipase A2. *Endocrinology* 114:1

Gudelsky GA, Porter JC (1981) Sex related differences in the release of dopamine into hypophysial portal blood. *Endocrinology* 109:1394

Guillemette G, Balla T, Bankal AJ, Catt KJ (1987) Inositol 1,4,5-trisphosphate binds to a specific receptor and releases microsomal calcium in the anterior pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci.* 84:8195

Harkness DH, Brownfield MS (1985) Intra and intersegmental distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rat spinal cord: topographical variation and presence in the dorsal horn. *Society of Neuroscience, 15th Annual meeting, Dallas Texas, octubre 20-25, p.349*

Hartzell HC, Fischmeister R (1986) Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca²⁺ current in single heart cells. *Nature* 323:273

Harwood JP, Grewe C, Aguilera G (1984) actions of growth hormone-releasing factor and somatostatin on adenylate cyclase and growth hormone release in rat anterior pituitary. *Mol Cell Endocrinol.* 37:277

Hauger RL, Aguilera G, Bankal AJ, Catt KJ (1982) Characterization of angiotensin II receptors in the anterior pituitary gland. *Mol Cell Endocr.* 25:203

Hefco E, Krulich L, Illner P, Larsen PR (1975) Effect of acute cold exposure on the activity of the hypothalamic-pituitary-thyroid system. *Endocrinology* 97:1185

Heisler S (1985) stimulation of adrenocorticotropin secretion from AtT-20 cells by the calcium channel activator Bay K 8644 and its inhibition by somatostatin and carbachol. *J Pharmacol Ex Therap* 235:741

Hepler JR, Earp HS, Harden TK (1988) Long-term phorbol ester treatment down-regulates protein kinase and sensitizes the phosphoinositide pathway to hormone and growth factor stimulation. *J Biol Chem.* 263:7610

Hermon J, Azrad A, Reiss N, Naor Z (1986) Phospholipid-dependent Ca²⁺ - activated protein kinase (C-kinase) in the pituitary: further characterization and endogenous redistribution. *Mol Cell Endocrinol.* 47:201

Hescheler J, Resenthal W, Wulfern M, Tang M, Yajima M, Trautwein W, Schultz G (1988) Involvement of the guanine nucleotide-binding protein No in the inhibitory regulation of neuronal calcium channels. *Adv in second messenger and phosphoprotein Res.* 21:165

Hinkle PM, Goh KB (1982) Regulation of thyrotropin releasing hormone receptors and responses to by L-triiodothyronine in dispersed rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 110:1725

Hinkle PM, Kinsella PA (1984) Regulation of thyrotropin releasing hormone binding by monovalent cations and nucleotides. *J Biol Chem.* 259:3445

Hinkle PM (1989) Pituitary TRH receptors. *En: Thyrotropin -releasing hormone Biomedical significance. Annals of the New York Academy of Sciences.* G Metcalf, IMD Jackson eds. p 176

Hirata F, Axelrod J (1978a) Enzymatic synthesis and rapid translocation of phosphatidylcholine by two methyltransferases in erythrocyte membranes. *Proc Natl Acad Sci.* 75:2348

Hirata F, Viveros OH, Diliberto EJ Jr, Axelrod J (1978b) Identification and properties of two methyltransferases in conversion of phosphatidylethanolamine to phosphatidylcholine. *Proc Natl Acad Sci.* 75:1718

Hirooka Y, Hollander CS, Suzuki S, Ferdinand P, Juan SI (1978) Somatostatin inhibits release of thyrotropin releasing factor from organ cultures of rat hypothalamus *Proc Natl Acad Sci USA* 75:4509

Hirota K, Hirota T, Aguilera G, Catt KJ (1985) Hormone-induced redistribution of calcium-activated phospholipid-dependent protein kinase in pituitary gonadotrophs. *J Biol Chem.* 260:3243

Ho AK, Klein DC (1987) Activation of alpha 1-adrenoreceptors, protein kinase C, or treatment with intracellular free Ca²⁺ elevating agents increases pineal phospholipase A2 activity *J Biol Chem* 262:11764

Hodin RA, Lazar MA, Wintman BI, Darling DS, Koenig RJ, Larsen PR, Moore

DD, Chin WW (1989) Identification of a thyroid hormone receptor that is pituitary-specific. *Science* 244:76

Hofmann F (1988) Round table on calcium Channels: a summary. *Adv in second messenger and phosphoprotein Res.* 21:175

Hokfelt T, Elde R, Fuxe K, Johansson O, Ljungdahl A, Goldstein M, Luft R, Efendic S, Nilsson G, Terenius L, Gauten D, Jeffcoate SL, Rechfeld J, Said S, Pérez de la Mora M, Possani L, Tapia R, Teran L y Palacios R (1978) Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. En: *The Hypothalamus*. S, Reichlin, RJ, Baldessarini y B, Martin eds. Raven Press, New York, p. 69

Horn AM, Fraser HM, Fink G (1985) Effects of antiserum to thyrotropin releasing hormone on the concentrations of plasma prolactin, thyrotropin and LH in the pro-oestrous rat *J Endocr.* 104:205

Hulting AL, Lingren , Hokfelt , Samuelson (1985) Leukotriene C4 as mediator of LH release from anterior pituitary cells. *Proc Natl Acad Sci.* 82:3834

Iriuchijima T, Mori M (1989) Regional dissociation of cyclic AMP and inositol phosphate formation in response to thyrotropin-releasing hormone in the brain. *J Neurochem.* 52:1944

Irving HR, Exton JH (1987) Phosphatidylcholine breakdown in rat liver plasma membranes. *J.Biol.Chem.* 262:3440

Israel JM, Jacquet P, Vincent JD. (1985) The electrical properties of isolated human prolactin secreting adenoma cells and their modification by dopamine. *Endocrinology* 117:1448

Israel JM, Kirk C, Vincent JD (1987) Electrophysiological responses to dopamine of rat hypophysial cells in lactotroph enriched primary cultures *J.Physiol* 390:1

Izumo S, Mahdavi V. (1988) Thyroid hormone receptor alpha isoforms generated by alternative splicing differentially activate myosin HC gene transcription. *Nature* 334:539

Jarvis WD, Judd AM, MacLeod RM (1988) Attenuation of anterior pituitary phosphoinositide phosphorylase activity by the D2 dopamine receptor. *Endocrinology* 123:2793

Jelsema CL, Axelrod J.(1987) Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the bg subunits of transducin and its inhibition by the a subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84:3623

Johansson O, Hokfelt T, Jeffcoate SL, White N, Spindel E (1983) Light and electron microscopic immunohistochemical studies on TRH in the central nervous system of the rat. En: *Thyrotropin-releasing hormone*. EC, Griffiths, GW, Bennett, eds. Raven Press, New York. p.19

Jones TH, Brown BL, Dobson PRM (1988) Evidence that angiotensin II is a paracrine agent mediating gonadotrophin-releasing hormone-stimulated inositol phosphate production and prolactin secretion in the rat. *J*

Endocr. 116:367

Jones DT, Reed RR. (1989) G_{olf}: a olfactory neuron specific G-protein involved in odorant signal transduction. Science 244:790

Jordan D, Rousset B, Perrin F, Fournier M, Orgiazzi J. (1980) Evidence for circadian variations in serum thyrotropin 3,5,3'-triiodothyronine and thyroxine in the rat. Endocrinology 107:1245

Jordan D, Veisseire M, Borson-Chazot F, Mornex R (1986) In vitro effects of endogenous opiates peptides on thyrotropin function: inhibition of thyrotropin releasing hormone release and absence of effect on thyrotropin release Neurosci Lett 677:289

Journot L, Homburger V, Pantaloni C, Priam M, Eockaert J, Enjalbert A. (1987) An IAP sensitive G protein is involved in dopamine inhibition of angiotensin and TRH stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. J.Biol.Chem. 262:15106

Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, Kordon C (1979) Effect of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. Endocrinology 104:801

Judd AM, Kioke K, MacLeod RM, (1986) A possible role of arachidonate metabolism in the mechanism of prolactin release Am. J. Physiol. 250:E288

Judd AM, Ross PC, Spangelo BL, MacLeod RM (1988) Angiotensin II increases pituitary cell prolactin release and arachidonate liberation. Moll.Cell Endocrinol. 57:115

Judd AM, Login IS, MacLeod RM (1989) Evidence that phorbol diester-sensitive protein kinase-C(s) may not be directly involved in secretagogue-stimulated prolactin release and arachidonate liberation. Endocrinology 125: 1134

Kanterman RY, Feldre CC, Brenneman DE, Ma AL, Fitzgerald S, Axelrod J.(1990) 1- Adrenergic receptor mediated arachidonic acid release in spinal cord neurons independent on inositol phospholipid turnover. J.Neurochem.54:1225

Kardon FC, Winokur A, Utiger RD (1977) Thyrotropin-releasing hormone in rat spinal cord. Brain Res. 122:578

Kebabian JW, Calne DB. (1979) Multiple receptors for dopamine. Nature 277:93

Kiesel L, Catt KJ (1987) Stimulation of luteinizing hormone release and cyclic nucleotide production by arachidonic acid in cultured pituitary gonadotrophs. Neuroendocrinology 46:1

Kiino DR, Dannies P. (1981) Insulin and 17 β -estradiol increase the intracellular prolactin content of GH4C1 cells. Endocrinology 109:1264

Kikkawa U, Ogita K, Go M, Nomura H, Kitano T, Hashimoto T, Ase K,

- Sekiguchi K, Koumoto J, Nishizuka Y, Saito N, Tanaka C (1988) Protein kinase C in transmembrane signaling. *Adv in second messenger and phosphoprotein Res.* 21:67
- Kimura N, Hayafuji C, Konagaya H, Takahashi K. (1986) 17 β -estradiol induces somatostatin (SRIF) inhibition of prolactin release and regulates SRIF receptors in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 119:1028
- Kizer JS, Palkovits M, Tappaz M, Kebabian J, Brownstein MJ (1976) Distribution of releasing factors, biogenic amines and related enzymes in the bovine median eminence. *Endocrinology* 98: 685
- Klee CB (1988) Ca²⁺-Dependent phospholipid-(and membrane-) binding proteins. *Biochemistry* 27:6645
- Koike K, Judd AM, MacLeod RM (1985) 5-Hydroxyeicosatetraenoic acid increase prolactin release from anterior pituitary cells. *Endocrinology* 116:1813
- Kolesnick RN, Musacchio I, Thaw C, Gershengorn MC (1984) Arachidonic acid mobilizes calcium and stimulates prolactin secretion from GH3 cells. *Am. J. Physiol.* 246:E458
- Kolesnick RN, Gershengorn MC (1986) Thyrotropin-releasing hormone stimulation of prolactin secretion is coordinately but not synergistically regulated by an elevation of cytoplasmic calcium and 1,2-diacylglycerol. *Endocrinology* 119:2461
- Kolesnick RN (1987) Thyrotropin releasing hormone and phorbol esters induce phosphatidylcholine synthesis in GH3 pituitary cells. Evidence for stimulation via protein kinase C. *J Biol Chem.* 262:14525
- Kreider MS, Ehgber TM, Nilaver G, Zimmerman EA, Winokur A. (1985) Immunohistochemical localization of TRH in rat CNS: Comparison with RIA studies. *Peptides* 6:997
- Krebs EG. (1986) The enzymology of control by phosphorylation. *En: The enzymes*, PD Boyer, Krebs EG eds. Academic Press, p.3
- Kurachi Y, Ito H, Sugimoto T, Shimizu T, Miki I, Ui M. (1989) Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K⁺ channel. *Nature* 337:55
- Labrie F, Barden N, Poirier G, De Lean A (1972) Binding of thyrotropin releasing hormone to plasma membranes of bovine anterior pituitary gland. *Proc Natl Acad Sci. (USA)* 69:283
- Labrie F, Cagne B, Lefevre G (1983) Growth hormone releasing factor stimulates adenylate cyclase activity in the anterior pituitary gland. *Life Science* 33:2229
- Lamberts SWJ (1988) The role of somatostatin in the regulation of anterior pituitary hormone secretion and the use of its analogs in the treatment of human pituitary tumors. *Endocr Rev.* 9:417
- Lamberts SWJ, MacLeod RM. (1990) Regulation of prolactin secretion at

the level of the lactotroph. *Physiol Rev.* 70:279

Lechan RM, Jackson IMD (1982) Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 111:55

Lechan RM, Wu P, Forte S, Jackson IMD. (1985) Immunolocalization of the TRH prohormone in the rat central nervous system. Society for Neuroscience, 15th Annual Meeting, Dallas, Texas, October 20-25, p.114

Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolfe H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH (1986) Thyrotropin hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science* 231:159

Lee SL, Stewart K, Goodman RH (1988) Structure of the gene encoding rat thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem.* 263:16604

Lee SL, Sevarino K, Roos BA, Goodman RH (1989) Characterization and expression of the gene-encoding rat thyrotropin-releasing hormone (TRH). In: Thyrotropin-Releasing hormone, Biomedical significance. Metcalf G, Jackson IMD eds. *Annals of the New York Academy of Sciences* V. 553 p. 14

Lieberman ME, Maurer RA, Gorki J (1978) Estrogen control of prolactin synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci.* 75:5946

Liposits ZS, Paull WK, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM (1987) Hypophysiotropic thyrotropin releasing hormone (TRH) synthesizing neurons: ultrastructure, adrenergic innervation and putative transmitter action. *Histochemistry* 88:1

Lochrie MA, Hurley JB, Simon MI. (1985) Sequence of the subunit of photoreceptor G protein: Homologies between transducin, ras and elongation factors. *Science* 228:96

Loeffler JP, Demeneix BA, Kley NA, Holtt V (1988) Dopamine inhibition of proopiomelanocortin gene expression in the intermediate lobe of the pituitary. *Neuroendocrinology* 47:95

Lohman SM, Walter U (1984) Regulation of the cellular and subcellular concentrations and distribution of cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Adv in cyclic nucleotide and protein phosph. Res.* 18:63

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193:265

Lyall F, Balmforth AJ, Morton JJ (1988) Specific binding of natriuretic peptide increases cyclic GMP levels in human astrocytoma cells. *J Endocr.* 117:315

Maeda K, Frohman LA (1980) Release of somatostatin and thyrotropin releasing hormone from rat hypothalamic fragments in vitro. *Endocrinology* 106:1837

MacLeod RM, Lehmeyer JE (1974) Studies on the mechanism of the dopamine mediated inhibition of prolactin secretion. *Endocrinology* 94:1077

MacLeod RM, Judd AM, Jarvis WD, Canonico PL, Login IS (1986) Receptor and postreceptor mechanisms for hypothalamic peptides at the pituitary level. En: Neuroendocrine perspectives. Muller EE, MacLeod RM, eds. Elsevier Science, Amsterdam p 45

Mains RE, Dickerson IM, May V, Stoffers DA, Perkins SN, Ouafik LH, Husten EJ, Eipper BA (1990) Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis. En: Frontiers in Neuroendocrinology, Raven Press, New York, p. 52

Makowske M, Birnbaum MJ, Ballestre R, Rosen DM (1986) A cDNA encoding protein kinase C identifies two species of mRNA in brain and GH3 cells J Biol Chem. 261:13389

Marcano de Cotte, De Menezes CEL, Bennett GW, Edwardson (1980) Dopamine stimulates the degradation of gonadotropin releasing hormone by rat synaptosomes. Nature 283:487

Marie J, Gaillard RC, Schoenberg P, Jard S, Boskaert J (1985) Pharmacological characterization of angiotensin receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary gland. Endocrinology 116:104

Martin TFJ, Bajjalieh S, Lucas DO, Kowalchuk JA. (1986) Thyrotropin-releasing hormone stimulation of phosphoinositide hydrolysis in GH3 cell membranes is GTP dependent but insensitive to cholera or pertussis toxin. J Biol Chem. 261:10041

Martinez de la Escalera G, Weiner RI, (1988) Effect of dopamine withdrawal on activation of adenylate cyclase and phospholipase C in enriched lactotrophs. Endocrinology 123:1682

Martino E, Seo H, Lernmark A, Refetoff S (1980) Ontogenic patterns of thyrotropin-releasing hormone-like material in rat hypothalamus, pancreas and retina: selective effect of light deprivation. Proc Natl Acad Sci USA 77:4345

Martin JB, Durand D, Gurd W, Faille G, Audet J, Brazeau P (1978) Neuropharmacological regulation of episodic growth hormone and prolactin secretion in the rat. Endocrinology 102:106

Matthews-Bellinger J, Salpeter MM. (1978) J Physiol Lond. 279:197

Maurer RA, Gorski J. (1977) Effect of estradiol-17 β and pimozide on prolactin synthesis in male and female rats. Endocrinology 101:76

Maurer RA. (1982) Thyroid hormone specifically inhibits prolactin synthesis and decreases prolactin messenger ribonucleic acid levels in pituitary cells. Endocrinology 110:1507

Maus M, Bertrand P, Drouva S, Rasolonjanahary R, Kordon C, Glowinski J, Premont J, Enjalbert A (1989) Differential modulation of D1 and D2 dopamine sensitive adenylate cyclases by 17 β -oestradiol in cultures striatal neurones and anterior pituitary cells J Neurochem. 52:410

Memo M, Castelletti L, Missak C, Valerio A, Carruba M, Spano PF (1986) Dopaminergic inhibition of prolactin release and calcium influx induced

by neurotensin in anterior pituitary is independent of cyclic APM system. J Neurochem. 47:1689

Méndez M, Joseph-Bravo P, Cisneros M, Vargas MA, Charli JL (1987) Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. Peptides 8:291

Méndez M (1989) Tesis de doctorado: Relevancia de las enzimas que degradan al TRH en sinapsis, UNAM

McDonald WM, Sibley DR, Kilpatrick BE, Caron MG (1984) Dopaminergic inhibition of adenylate cyclase correlates with high affinity agonist binding to anterior pituitary D2 dopamine receptors. Mol. Cell Endocrinol 36:201

Morel G, Gourdji D, Grouselle D, Brunet N, Tixier-Vidal A, Dubois PM (1985) Immunocytochemical evidence for in vivo internalization of thyroliberin into rat pituitary target cells. Neuroendocrinology 41:312

Mori M, Yamada M (1987) Thyroid hormones regulate the amount of thyrotropin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. J Endocrinol. 114:443

Munemura M, Agui T, Sibley DR (1989) Chronic estrogen treatment promotes a functional uncoupling of the D2 dopamine receptor in rat anterior pituitary gland. Endocrinology :346

Musset , Bertrand P, Kordon C, Enjalbert A. Differential coupling with Pertussis toxin sensitive G proteins of dopamine and somatostatin receptors involved in regulation of adenohipophyseal secretion. Mol. and Cell Endocrinol. in press

Musset F (1990) Tesis de doctorado: Les recepteurs de la dopamine et de la somatostatine dans L'adenohipophyse de rat: comparaison des mecanismes d'action associes, mis en jeu dans les secretions de prolactine, hormone de croissance et hormone thyreotrope. Université Paris XI.

Nakamura T, Ui M. (1985) Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, Pertussis toxin. J.Biol.Chem.260:3584

Naor Z (1986) Phosphoinositide turnover, Ca²⁺ mobilization, protein kinase C activation and leukotriene action in pituitary signal transduction: effect on gonadotropin releasing hormone. Adv in Prostaglandin, Thromboxane and leukotriene Res. 16:255

Naor Z (1990) Further characterization of protein kinase-C subspecies in the hypothalamo-pituitary axis: differential activation by phorbol esters. Endocrinology 126:1521

Navaro J (1987) Modulation of 3H-dihydropyridine receptors by activation of protein kinase C in chick muscle cells. J Biol Chem 262:4649

Neer EJ, Clapham DE (1988) Roles of G protein subunits in transmembrane

signalling. *Nature* 333:129

Nikodem VM, Mitsushashi T (1989) Thyroid hormone receptor related mRNAs. En: Iodine and the brain. DeLong GR, Robbins J, Condliffe PG, eds. Plenum Press, p 19

Nishizuka Y, Takai Y, Kishimoto A, Kikkawa U, Kaibuchi K (1984) Phospholipid turnover in hormone action. *Res Progress in Hormone res.* 40:301

Nishiyama T, Kawana H, Tsuruo Y, Maggawa M, Hisano S, Adachi T, Daikoku S, Suzuki M (1985) Hypothalamic TRH-containing neurons involved in the hypothalamic-hypophysial-thyroid axis. Light microscopic immunohistochemistry. *Brain Res.* 345:205

O'Connor B, O'Cuinn G (1984) Localization of a narrow specificity thyroliberin hydrolysing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea-pig brain. *Eur J Biochem.* 144:271

O'Connor B, O'Cuinn G. (1985) Purification and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane pyroglutamate aminopeptidase from guinea pig brain. *Eur J Biochem.* 150:47

Ogawa N, Yamawaki Y, Kuroda H, Nukina I, Ota Z, Fujino M, Yanaihara N (1982) Characteristics of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptors in rat brain. *Peptides* 3:669

Ohmichi M, Hirota K, Kioke K, Kadowaki K, Yamaguchi M, Miyake A, Tanizawa O. (1990) Dopamine inhibits the arachidonate and prolactin release stimulated by thyrotropin-releasing hormone through an islet-activating protein-sensitive GTP-binding protein in anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 52:75

Djeda SR, Naor Z, Negro-Vilar A (1979) The role of prostaglandins in the control of gonadotropin and prolactin release. *Prostaglandins and Medicine* 5:249

Onalli J, Schwartz JP, Costa E (1981) Dopaminergic modulation of adenylate cyclase stimulation by vasoactive intestinal peptide in anterior pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6531

Oppenheimer JH, Samuels HH (1983) Molecular basis of thyroid hormone. Academic Press, New York.

Pacheco MF, Woodward DJ, McKelvy JF, Griffin WA (1981) TRH in the rat cerebellum II. Uptake by cerebellar slices. *Peptides* 2:283

Palkovits M (1984) Topography of chemically identified neurons in the central nervous system: Progress in 1981-1983. En: *Neuroendocrine Perspectives v. 3.* EE, Muller, RM MacLeod eds. Elsevier Science Publishers, Amsterdam p.1

Parker J, Daniel LW, Waite Moseley (1987) Evidence of protein kinase C involvement in phorbol diester-stimulated arachidonic acid release and prostaglandin synthesis. *J Biol Chem* 262:5385

Parker PJ, Kour G, Marias R, Mitchell F, Pears C, Schaap D, Stabel S,

Webster C (1989) Protein kinase C- A family affair. Mol Cell Endocrinol. 56:29

Piomelli D, Volterra A, Dale N, Siegelbaum SA, Kandel ER, Schwartz JH, Belardetti F (1987) Lipoxigenase metabolites of arachidonic acid as second messengers for presynaptic inhibition of Aplysia sensory cells. Nature 328:38

Pilote S, Vallerand P, Borgeat P (1982) Transformation of arachidonic acid in the rat anterior pituitary. Biochem Biophys Res Commun. 104:867

Pozzan T, Fatti G, Dozio N, Vicentini LM, Meldolesi J (1984) Ca²⁺-dependent and independent release of neurotransmitters from PC 12 cells: a role for protein kinase C activation?. J Biol Chem 99:628

Prasad C, Edwards RM (1981) Synthesis of phosphatidylcholine from phosphatidylethanolamine by at least two methyltransferases in rat pituitary extracts. J Biol Chem 256:13000

Quian Z, Drewes LR (1990) A novel mechanism for acetylcholine to generate diacylglycerol in brain. J.Biol.Chem 265:3607

Qian Z, Reddy PV, Drewes LR (1990) Guanine nucleotide-binding protein regulation of microsomal phospholipase D activity of canine cerebral cortex. J Neurochem 54:1632

Rabier M, Chavis C, Crastes de Paulet A, Damon M (1987) Arachidonic acid metabolism in a cloned strain of rat pituitary tumor cells: correlation between 15-hydroxyeicosatetraenoic acid release and the prolactin secretory process. Prost Leu Med 27:27

Rajendra SR, Lowell EH.(1990) Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. Physiol. Rev. 70:115

Raymond V, Beaulieu M, Labrie F, Boissier J (1978) Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. Science 200:1173

Riskind PN, Kolodny JM, Larsen PR (1987) The regional hypothalamic distribution of type II 5'-monodeiodinase in euthyroid and hypothyroid rats. Brain Res. 420:194

Ross P, Judd A, MacLeod RM (1988) The dynamics of arachidonic acid liberation and prolactin release: a comparison of thyrotropin-releasing hormone, angiotensin II and neurotensin stimulation in perfused anterior pituitary cells. Endocrinology 123:2445

Rostene WH, Morgat JL, Dussailant M, Rainbows TC, Sarrieau A, Vial M, Rosselin G (1984) In vitro biochemical characterization and autoradiographic distribution of 3H-Thyrotropin releasing hormone binding sites in rat brain. Neuroendocrinology 39:81

Ruberg M, Rotsztejn WH, Arancibia S, Besson J, Enjalbert A (1978) Stimulation of prolactin release by vasoactive intestinal peptide (VIP). Eur J Pharmacol. 51:319

Rudnick MS, Dannies PS (1981) Muscarinic inhibition of prolactin

production in cultures of rat pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 101:689

Safei R, Timiras PS (1985) Thyroid hormone binding and regulation of adrenergic enzymes in two neuroblastoma cell lines. *J Neurochem* 45:1405

Salomon Y, Londos C, Rodbell M (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58:541

Sasaki K, Sato M (1987) A single GTP-binding protein regulates K⁺-channels coupled with dopamine, histamine and acetylcholine receptors. *Nature* 325:259

Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Moltaker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM (1987) Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 238:78

Setty BNY, Graeber JE, Stuart MJ (1987) The mitogenic effect of 15- and 12-hydroxyeicosatrienoic acid on endothelial cells may be mediated via diacylglycerol kinase inhibition. *J Biol Chem.* 262:17613

Schlegel W, Wollheim CB (1984) Thyrotropin-releasing hormone increases cytosolic free Ca²⁺ in clonal pituitary cells (GH3 cells). *J Cell Biol.* 99:83

Schofield JG (1983) Use of a trapped fluorescent indicator to demonstrate effects of thyroliberin and dopamine on cytoplasmic calcium concentrations in bovine anterior pituitary cells. *FEBS Lett.* 159:79

Sharif NA (1989) Quantitative autoradiography of TRH receptors in discrete brain regions of different mammalian species. En: Thyrotropin-releasing hormone Biomedical significance. *Annals of the New York Academy of Sciences.* G Metcalf, IMD Jackson eds. p 147

Sibley DR, Benovic JL, Caron MG, Lefkowitz RJ (1988) Phosphorylation of cell surface receptor: a mechanism for regulating signal transduction pathways. *Endocr Rev.* 9:38

Simmons SH, Strange PG, (1985) Inhibition of inositol phospholipid breakdown by D2 dopamine receptors in dissociated bovine anterior pituitary cells. *Neurosci. Lett.* 60:267

Simpkins J W (1982) Regulation of thyroid stimulating hormone secretion. En: *Handbook of endocrinology.* GH, Gass y HM, Kaplan, eds. CRC Press p. 61

Smith S, Bicknell RJ, Schofield JG (1982) Effect of dopamine on Rb flux in anterior pituitary. *FEBS Lett.* 148:27

Snider RM, McKinney M, Forray C, Richelson E (1984) Neurotransmitter receptor mediate cyclic GMP formation by involvement of arachidonic acid and lipoxygenase. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3905

Snyder GD, Capdevila J, Chacos N, Manna S, Falck JR (1983) Action of luteinizing hormone-releasing hormone: involvement of novel arachidonic acid metabolites. *Proc Natl Acad Sci.* 30:3504

Steele MK, Negro-Vilar A, McCann SM (1981) Effect of angiotensin II on

in vivo and in vitro release of anterior pituitary hormones in the female rat. *Endocrinology* 109:893

Straub RE, Gershengorn MC (1986) Thyrotropin-releasing hormone and GTP activate inositol triphosphate formation in membranes isolated from rat pituitary cells. *J Biol Chem* 261:2712

Strittmatter WJ, Hirata F, Axelrod J (1981) Regulation of the β -adrenergic receptor by methylation of membrane phospholipids. *Adv in cyclic nucleotide Res.* 14:83

Suen CS, Wilk S (1987) Regulation of thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in GH3 cells: induction of pyroglutamyl peptidase I by 3,5,3'-triiodotironine. *Endocrinology* 121:770

Suen CS, Wilk S (1989) Regulation of thyrotropin releasing hormone degrading enzyme in rat brain and pituitary by L-3,5,3'-triiodothyronine. *J Neurochem.* 52:884

Suen CS, Wilk S (1990) Rapid inactivation and phosphorylation of pyroglutamyl peptidase II in Y-79 human retinoblastoma cells after exposure to phorbol ester. *Endocrinology*, en prensa

Tam SW, Dannies PS (1981) The role of adenosine 3',5'-monophosphate in dopaminergic inhibition of prolactin release in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 109:403

Tapia-Arancibia L, Astier H (1983) Opiate inhibition of K⁺ induced TRH release from superfused mediobasal hypothalamus in rats. *Neuroendocrinology* 37:166

Taraskevich PS, Douglas WW (1978) Catecholamines of supposed inhibitory hypophysiotropic function suppress action potentials in prolactin cells. *Nature* 276:832

Tashjian AH Jr, Barousky NJ, Jensen DK (1971) Thyrotropin-releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 43:516

Taylor WL, Dixon JE (1978) Characterisation of a pyroglutamyl aminopeptidase from rat serum that degrades thyrotropin releasing hormone. *J Biol Chem.* 253:6934

Taylor RL, Burt DR (1981) Guanine nucleotides modulate TRH receptor binding in sheep anterior pituitary. *Mol Cell Endocrinol.* 21:85

Taylor RL, Burt DR (1982) Species difference in the brain regional distribution of receptor binding for thyrotropin-releasing hormone. *J Neurochem.* 38:1649

Terry LC (1986) Regulation of thyrotropin secretion by the central epinephrine system. *Neuroendocrinology* 42:102

Titeler M, De Souza EB, Kuhar MJ (1985) (3H) Nitrendipine binding to calcium channels in bovine and rat pituitary. *J Neurochem.* 44:1955

Toumisto J and Mannisto P (1985) Neurotransmitter regulation of

anterior pituitary hormones. Pharmacol Rev. 37:249

Torres H, Charli JL, González-Noriega A, Vargas MA, Joseph-Bravo P (1986) Subcellular distribution of the enzyme degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. Neurochem Int.9:103

Tsien RW (1987) Calcium currents in heart cells and neurons. En: Neuromodulation, The biochemical control of neuronal excitability. LK Kaczmarek, IB Levitan Eds. Oxford University Press p.206

Ui M, Okajima F, Katada T, Murayama T (1988) Roles of GTP regulatory proteins, the substrates of islet-activating protein, in receptor-mediated adenylate cyclase inhibition, phospholipase C activation and cell proliferation. Adv in second messenger and phosphoprotein Res. 21:39

Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L and Charli JL. TRH Metabolism in lactating and cyclic rats. sometido a J Neurochem 1991

Vale W, Rivier C, Erazeeau P, Guillemin R (1974) Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin. Endocrinology 95:968

Vallar L, Vicentini LM, Meldolesi J (1988) Inhibition of inositol phosphate production ia a late, Ca²⁺ dependent effect of D2 dopaminergic receptor activation in rat lactotroph cells. J Biol Chem. 263:10127

Valverde C, Aceves C (1989) Circulating thyronines and peripheral monodeiodination in lactating rats. Endocrinology 124:1340

Vanderhoek JY, Kiesel L, Naor Z, Bailey JM, Catt KJ (1984) Arachidonic acid metabolism in gonadotroph-enriched pituitary cells. Prost Leu Med. 15:375

Vargas M, Méndez M, Cisneros M, Joseph-Bravo P, Charli JL (1987) Regional distribution of the membrane bound pyroglutamate aminopeptidase-degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. Neurosci Lett. 79:311

Vera MN, Mitsuhashi T. (1989) Thyroid hormone receptor related mRNA. En: Iodine and the brain. RG DeLong, J Robbins, PG Condliffe eds. Plenum Press, p.19

Vician LM, Shupnik MA, Gorski J. (1979) Effects of oestrogen on primary ovine pituitary cells cultures: stimulation of prolactin secretion, synthesis and proprolactin messenger ribonucleic acid activity. Endocrinology 104:736

Vincent JD, Israel JM, Brigant JL (1985) Ionic channels in hormone release from adenohypophyseal cells and electrophysiological approach. Neurochem Int. 7:1007

Warberg J (1982) Studies on the release mechanism for hypothalamic hormones. Acta Endocrinol. Suppl. 250: 7

Watkins DC, Northup JK, Malbon CC.(1989) Pertussis toxin treatment in

vivo is associated with a decline in G-protein b-subunits. J. Biol. Chem. 264:4186

Weinberg MB, Utter MF (1979) Effect of thyroid hormone on the turnover of rat liver pyruvate carboxylase and pyruvate dehydrogenase. J Biol Chem. 254:9492

Weiner RJ, Findell PR, Kordon C (1988) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En: The physiology of reproduction, E. Knobil, Neill J, eds. Raven Press, New York, cap. 28

Weintraub ED, Gesundheit N, Taylor T, Gyves PW (1989) Effect of TRH on TSH glycosylation and biological action. En: Thyrotropin-releasing hormone Biomedical significance. Annals of the New York Academy of Sciences. G Metcalf, IMD Jackson eds. p.205

Weithmann KU, Peterson H, Sevanian A (1989) Incorporation of arachidonic, dihomogamma linolenic and eicosapentaenoic acids into cultured V 79 cells. Lipids 24:173

West B, Dannies P (1980) Effects of estradiol on prolactin production and dihydrocypine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. Endocrinology 106:1108

White N, Jeffcoate SL, Griffiths EC, Hooper KC (1976) Effect of thyroid status on the thyrotropin-releasing hormone-degrading activity of rat serum. J Endocrinol. 71:13

Wiklund J, Wertz W, Gorki J (1981) A comparison of estrogen effects on uterine and pituitary growth and PRL synthesis in F344 and Holzman rats. endocrinology 108:1700

Wilber JF, Siebel MJ (1973) Thyrotropin-releasing hormone interactions with an anterior pituitary receptor. Endocrinology 92:888

Wilk S (1983) Prolyl endopeptidase. Life Sci. 33:2149

Winokur A, Utiger RD (1974) Thyrotropin-releasing hormone: Regional distribution in rat brain. Science 185:265

Winokur A, Davis R, Utiger RD (1977) Subcellular distribution of thyrotropin releasing hormone (TRH) in rat brain and hypothalamus. Brain Res. 120:423

Wisner-Provost A, Gerozissis K, Bommelaer MC, Renard CA, Rougeot C, Levi FA, Dray F (1986) Eicosanoid in relation with LHRH secretion. Adv Prostaglandin, Thromboxane and Leukotriene Res. 16:235

Wolf Ba, Turk J, Sherman W, McDaniel ML (1986) Intracellular Ca²⁺ mobilization by arachidonic acid. J Biol Chem 261:3501

Wood DF, Docherty K, Ramsden DE, Shennan KIJ, Sheppard MC. (1987) Thyroid status affects the regulation of prolactin mRNA accumulation by tri-iodothyronine and thyrotrophin release hormone in cultured rat anterior pituitary cells. J. Endocrinol. 115:497

Yajima Y Akita Y, Saito T (1988) Effects of cholera toxin on the coupling of thyrotropin-releasing hormone to a guanine nucleotide-binding protein in cultured GH3 cells. Mol Pharmacol 33:592

Yasuf AH, Robert MB (1990) Rat brain protein kinase C. J Biol Chem 265:2962

Yatani A, Codina J, Imoto Y, Reeves JP, Birnbaumer L, Brown AM. (1987) A G protein directly regulates mammalian cardiac calcium channels. Science 238:1288

Zeytin FN, Rusk SF (1988) Fibroblast growth factor is a permissive factor mediating the cellular action of rat hypothalamic growth hormone-releasing factor. Endocrinology 122:1129

APENDICE

Publicación No 2

Ponce G., Priam M., Kordon C., Enjalbert A. "Dopamine inhibition of Arachidonic Acid Release is not a Pertussis toxin Sensitive Process in Cultured Pituitary Cells" (sometido a Endocrinology).

Publicación No 3

Uribe R., Joseph-Bravo P., Pasten J., Ponce G., Méndez M., Covarrubias L., Charli JL. "Some events of TRH metabolism are regulated in lactating and cycling rats" (sometido a Endocrinology)

P-2

Dopamine inhibition of Arachidonic Acid release is not a pertussis toxin sensitive process in cultured pituitary cells

Foucault B, Priam M, Kordon C and Enjalbert A. U-159 INSERM Centre Paul Broca de l'INSERM, 2 ter rue d'Alésia 75014 Paris (France)

ABSTRACT

Dopamine inhibits PRL secretion and arachidonic acid release from adenohypophyseal cells under basal or stimulated conditions. DA inhibition of AA release depends on medium Mg^{2+} concentration, this inhibition does not depend on Ca^{2+} entrance because nifedipine (an antagonist of VSCC) is not able to mimic DA effect on AA release; nor on AMPc decrease. We have found that DA inhibition is not a pertussis sensitive process.

INTRODUCTION

PRL release is elicited by a large set of neurohormones and neurotransmitters with different action mechanisms (1,4-6,8-15). One of the best known inhibitor of PRL release is dopamine acting through D2 dopaminergic receptor located on lactotrops (1-3). The activity of these DA receptors have been associated with inhibition of adenylate cyclase

(1,4-6), activation of K^+ channels (7,8) and consequent inhibition of Ca^{2+} channels (9). Finally a negative coupling to phospholipase C (PLC) is proposed (10-12).

All these actions of DA receptor activation on transduction mechanisms involve several G proteins (G_i , G_o) and are pertussis toxin sensitive (12-15).

Some phospholipids (PL) contain in the 2n position arachidonic acid; AA and AA metabolites have multiple actions on different models (16-18); arachidonic acid can be produced from PL in several ways: by activity of PLC on phosphoinositides (IP) and successive action of diacylglycerol lipase (DGA lipase) and monoacylglycerol lipase (MAG lipase) (19), or phosphorylation of phosphatidic acid (PA) via diacylglycerol kinase and subsequent activity of phospholipase A2 (PLA2); The source of AA could also be phosphatidylcholine (PC), phosphatidyl-ethanolamine (PE) and phosphatidylserine (PS).

The participation of AA and / or its metabolites in the mechanisms of PRL release has been demonstrated in normal cells (16,20-22,25) as well as in GH3 cells (23,24). Metabolites of lipoxygenase and epoxygenase pathways seem to be mainly responsible for these effects (16,21,26). D2-DA receptor activation has also been associated with inhibition of arachidonic acid release induced by TRH, AI1 and NI from pituitary cells previously loaded with the labelled acid (27-30).

The aim of this work was to study the mechanisms (components) of dopaminergic inhibition. We studied the effect of drug affecting: intracellular calcium concentration such as A23187 calcium ionophore, Bay-K and nifedipine, DPH agonist and antagonist of VSCC respectively and AMPc concentration by forskolin on AA production in normal or pertussis toxin pretreated cells. The role of PKC on dopaminergic inhibition was studied in cultures missing largely of PKC activity by long term treatment with phorbol ester TPA.

MATERIAL AND METHODS

TRH was obtained from Neosystem, S.A. (Strasbourg, France); All (angiotensinell), A23187, nifedipin, TPA (phorbol12-myristate-13-acetate) were obtained from Sigma

(St. Louis MO) Forskolin and dopamine were obtained from Calbiochem (La Jolla, CA); pertussis toxin was obtained from Mallet Labs (West Haven, CT) and Bay-K-8644 methyl-1,4-dihydro-2,6-dimethyl-3-nitro-4-(2-trifluoromethyl-phenyl)-pyridine-5-carboxylate was generously provided by Dr A. Scriabine of the Miles Institute (West Haven, CT).

Cell culture

The anterior pituitaries were obtained rapidly after decapitation of female rats (200-250 g, Sprague-Dawley, Charles River Breeding Laboratories, St. Aubin les Elbeuf, France). Cell dispersion was performed as already described.

(10). Anterior pituitaries were dissected in small pieces and incubated for 15 min with 0.5% trypsin in Dulbecco's minimal essential medium (DMEM) at 37 °C. DNase (2 ug/ml) was then added for 1-2 min to the medium. After enzymatic digestion, the medium was removed and anterior pituitaries were incubated for 5 min in DMEM with trypsin inhibitor (1mg/ml). Medium was changed and pituitaries were incubated in Ca^{++} , Mg^{++} free medium containing EDTA (2 mM) for 5 min followed by 15 min incubation in the same medium containing EDTA (1 mM). Cells were then mechanically dispersed in Ca^{++} , Mg^{++} free medium containing 0.3% BSA (fraction V). Cells were counted using a Coulter counter 2B1 (Coultronics, Hialeah, FL) and plated in multiwell plates (6 wells, Nunc, Roskilde, Denmark). Cells were maintained in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum pretreated with charcoal (1%), dextran (0.1%) and with antibiotics (penicillin 1%, streptomycin 5mg/ml) for 4-5 days.

Arachidonic acid incorporation

Anterior pituitary cells were incubated in RPMI-1640 medium in presence of 0,5 μ Ci/ml/well of 3H -Arachidonic acid (s.a. 240 Ci/mM NEN Boston Mass. USA) during 180 min. Cells were rinsed four times with 1 ml of 0,1% BSA fatty acid free RBE 0,2 mM Mg^{2+} (or Mg^{2+} concentration as indicated). Finally cells were incubated with 1 ml 0,1% BSA-RBE for 5 min in the presence of the drug to be tested; Medium was recovered and one third was frozen at -20 °C until PRL assay. PRL was assayed in

duplicated for each sample as previously described (31); the other 2/3 were put into vials for liquid scintillation counting. Cells were recovered in 1 ml of NaOH 0,2 M/ triton x 100 0,5%. We worked with cell that had incorporated 50-60% of labelled AA incorporated; results are expressed as % of 3H-AA release in control conditions (non preteated).

PIX and TPA pretreatment

24 h before experiment, cells were preteated with 100 ng/ml of PIX and /or 10⁻⁶ M TPA; 24 h later 3H-AA was incorporated as described before.

AMPC accumulation by 3H-adenine incorporation

Evaluation of adenylate cyclase activity in cells was done by the methode described in (32) adapted to the hypophysis; briefly culture medium was changed for 1 ml RPMI-1640, 1mM 3-isobutyl-1-methylxantine (IBMX), 5uCi/well 3H-adenine (s.a. 20,7 Ci/ mmol NEA) and 2.2 nM arachidonic acid and cells were incubated for 3 h at 37°C; Culture medium was then substituted by 1 ml of RKB 0.2 mM Mg²⁺, 1 mM IBMX with the substances to be tested; incubation time was 5 min then medium was removed and frozen at -20° C until assay of PRL by RIA. Reaction was stoped by additon of 1 ml TCA 5% ; separation of 3H-AMPC and 3H-ATP was achieved on Dowex (3H-ATP) and alumina (3H-AMPC) columns. Results were expressed as % of 3H-AMPC/3H-ATP formed as compared to control conditions without pretreatment.

Membrane preparation

Cells were seeded at 10 x 10⁶ in petri dish (diam) and cultivated during 4-5 days. 24 h before experiment 3H-AA was incorporated into cells. The day after cells were rinsed with PBS solution and placed on ice glass during 5 min in presence of 2 ml 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA pH 7.4 buffer, scraped and homogenized with glass potter 10 times. After homogenization the same volume of 10 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, 20% sucrose was added. The preparation was centrifugated 5 min at 1000 rpm. Sn was recovered and centrifugated during 60 min at 15 000 rpm; pellet was resuspended in 700 ul 100 mM Tris-HCl, 1 mM Ca⁺⁺, 0.1% BSA buffer and maintained at 4 C until assay. Vehicle or DA were added and incubated during 60 min; reaction was stoped by addition of 40 ul 0.1 N HCl. Supernatant was recovered after centrifugation at 14,000 rpm and put into vials for liquid scintillation counting. Protein was quantified by Lowry (33). Results were expressed as % of control 3H-AA production (c= 100%).

Statistical Analysis

Data of 3H-AA release were calculated from the radioactivity released by well control (without pretreatment); they were standardized to facilitate comparison. Data from dose-response curves were submitted to one factor analysis of variance (ANOVA). Data are $\bar{x} \pm$ SEM (n) and were compared by t-student test.

RESULTS

DA inhibition of AA release and PRL secretion

Arachidonic acid release was inhibited in a dose-response manner by DA (fig 1), inhibition was dependent on Mg⁺⁺ (0.2 and 1.26 mM). We were unable to inhibit 3H-AA release in RKB 0.5 mM Mg⁺⁺ nor in RPK1 whose Mg⁺⁺ concentration is 0.406 mM, however in last medium, DA inhibition of PRL looked clear (fig 1). Subsequent studies were performed in RKB 0.2 mM Mg⁺⁺ and 10⁻⁴ M DA in order to obtain a maximal effect. 1RH and A11 stimulated 3H-AA release in all Mg²⁺ concentrations, although in 1.26 mM Mg²⁺ 1RH evoked a smaller response (table 1). DA was able to block 3H-AA release caused by peptides; the effect had the same magnitude as under basal conditions (1RH/DA, A11/DA, DA: 26-30%) (fig 2). Time of 3H-AA incorporation as longer as 24 h increased the radioactivity released by peptides but did not change DA response (data not shown).

We explored the involvement of the coupling mechanisms to the second messenger systems known to be affected in the DA response. In order to induce changes in intracellular Ca²⁺ concentration we tested the effect of Bay-k, Nifedipine, A23187 ionophore on 3H-AA release at concentrations affecting PRL secretion. Nifedipine and BK had no effect on 3H-AA release under basal or stimulated conditions, while they inhibited and stimulated PRL secretion respectively. Increase in intracellular Ca⁺⁺ evoked by A23187 increased 3H-AA release 67% over the control with a consequent increase in PRL secretion (fig 3). DA in presence of BK induced a smaller effect than under basal conditions and in presence of A23187 was able to inhibit completely 3H-AA release caused by the ionophore (fig 3). When we increased A23187 concentration, DA was still able to block 3H-AA release, the same happened to PRL secretion (fig 4).

The involvement of AC activity in DA inhibitory 3H-AA effect was looked. Incubation with forskoline 10⁻⁵ M induced a small increase in 3H-AA release; under these conditions of AC activation, DA was able to inhibit 3H-AA release as under basal conditions. PRL secretion was inhibited in basal as well as in stimulated conditions (fig 5).

PKC desensitization and 3H-AA release

Once explored some of the possible components of the DA effect on 3H-AA release, we were interested in the effect of desensitization of PKC by TPA. The profile of 3H-AA response to different substances was very similar to control conditions. However in some cases AA response to ionophore A23187 was increased in TPA pretreated cells (fig 6). DA

inhibition of 3H-AA release was sometimes reduced but always present. PRL secretion was inhibited in incubation with DA, nifedipine and DA / Bk but in presence of the ionophore only nifedipine was still able to block PRL secretion while DA inhibition was lost under A 23187 stimulation (fig 6).

PTX pretreatment and 3H-Arachidonic acid release

Cell pretreatment with PTX 100 ng/ml for 24 h was unable to revert DA inhibition of 3H-AA release while DA inhibition of PRL secretion (fig 7) and AMPc were totally suppressed in the same culture (table 2). PTX pretreatment did not change 3H-AA release after Bay-k, nifedipine or A23187 addition (fig 8). In conditions of AC activation by Fk, DA was able to inhibit 3H-AA release (fig 9). PTX pretreatment was unable to block DA inhibition of 3H-AA release in any condition.

TRH 3H-AA release in basal and inhibition by DA was as in control cultures, on the other hand 3H-AA release to A II stimulation was small and its inhibition by DA was not significant (fig 10).

PKC desensitization / PTX treatment and 3H-AA release

In these cultures 3H-AA release in control groups was slightly major, this increase in fatty acid release was not significantly different to control cultures. 3H-AA response to A II was smaller than in control cultures, however DA inhibition after stimulation by TRH or A II was still present (fig 11). After treatment with TPA / PTX we observed DA inhibition in basal and stimulated by Bk or A 23187 conditions. Nifedipine was without effect on this parameter. DA and nifedipine inhibition of PRL secretion observed (fig 12).

3H-AA production from membranes

Fig 13 shown 3H-AA production from membranes from 5 days cultured cells. DA inhibited 3H-AA production in all protein concentration tested.

DISCUSSION

Dopamine inhibits arachidonic acid release from cells previously loaded with the fatty acid (27-30). In these papers DA inhibition was very small and a major effect was revealed after stimulation by peptides. In contrast, we obtain a largest effect in basal conditions (30-40 % inhibition), one explanation could be differences in Mg⁺⁺ concentration which only affects DA inhibition and without effect on peptides evoked responses.

Bay-K stimulates PRL secretion acting on L-type calcium channels and increasing in inward calcium current; nifedipine a calcium channel antagonist block this inward current with a inhibitory effect on PRL release (34,35). In our model Bay-k nor nifedipine have any effect on 3H-AA release but they confirmed their action on PRL secretion.

Calcium sensitivity of phospholipases which are able to produce AA (PLC, PLA2) is different: PLC needs lower calcium concentration to get activation than does PLA2 (36); calcium entrance provoked by Bay-K seems not be enough to activate any phospholipase. Ionophores have shown to be potent activators of PLA2 (37), in this study A23187 10⁻⁶ M and 3x 10⁻⁶ M have a significant effect on 3H-AA release and in both cases DA inhibits 3H-AA release and PRL secretion. The mechanism of DA inhibition remains to be elucidated. A23187 increases AA release from dorsal root ganglion neurons, data in this paper suggest that AA is produced by PLC, DGL and MGL activity (38).

Increase of AMPc by forskoline 10⁻⁵ M provoked a little increase in 3H-AA release, this effect could be to Ca⁺⁺ increase consequence of AC activity (39) however DA inhibits this increase. Decrease in AMPc level does not seem to be involved in 3H-AA inhibition by DA because it is present in cells pretreated with PTX where DA inhibition of AC is completely reversed.

In anterior pituitary cells TPA induce AA release

(40) this fact can be explained by PKC participation on AA release. In cells depleted of PKC by treatment with TPA, and treated with PTX, TRH release 3H-AA and PRL in the same manner as in control cultures; in contrast A II 3H-AA release was only significant compared to 3H-AA release in control conditions (without treatment). It is possible that PKC have different contribution on TRH and A II fatty acid release; however it has been suggested that AA released by A II comes principally from PLC, DGL activity (26).

Cells incubated in presence of A23187 shown an increased 3H-AA release this effect could reflect suppression of negative PKC feedback on Ca⁺⁺ induced AA release process.

It is known that Pertussis toxin ADP-rybosilates a subunit of G-proteins related to coupling of different DA receptor process (12-15). Once ADP-rybosilated this subunit, it do not intervene any more with negative response. Pretreatment of cells with PTX was ineffective to block DA inhibition of 3H-AA release in basal condition as well as in the presence of Bay-K, A23187, TRH, A II and Fk. In these conditions DA inhibition of PRL secretion was reversed. If inhibition of PLC activity by DA is a PTX sensitive process its participation is eliminated in cultures treated with PTX, however in conditions of short incubation time and high DA dose it was not observed any change in DA inhibition of fatty acid release.

Receptors coupled to PLA2 has been found in other models, it has been reported process PTX sensitive in neutrophils, mast cells, thyroid cells FRTL5 and in rod outer segments of retina (41-44) and PTX insensitive in Swiss 3T3 fibroblast stimulated by bradykinin, in hippocampal neurons stimulated by serotonin and possibly in spinal cord neurons after alpha-1-adrenergic receptor activation

(45-47). It is possible that in hypophysial cells DA-D2 receptor could be coupled to PLA2 by one G protein. PTX insensitive, however we need adenohypophysial permeabilized cells to introduce GTP analogs or characterize this process in a cell-free system. We have found DA inhibition of 3H-AA release in membrane preparations, this fact means that all the components are present in these preparations. Experiences are in course to try to discern between different enzymatic activities producing AA release and their GTP dependence.

The results shown that exists an AA release inhibitory DA mechanism not sensitive to P1X in contrast to recent papers (29,29), this controversy could be explained by differences in the protocols of 3H-AA incorporation or in P1X treatment; long term treatment with P1X provoke effects on the G1P binding protein synthesis (4E) and recently it has been shown that dose of 33 ng /ml P1X provoke a maximal effect of the toxin(49). Whatever the DA inhibitory mechanism of AA release it could be part of multicomponent system of DA control of PRL secretion.

Acknowledgments

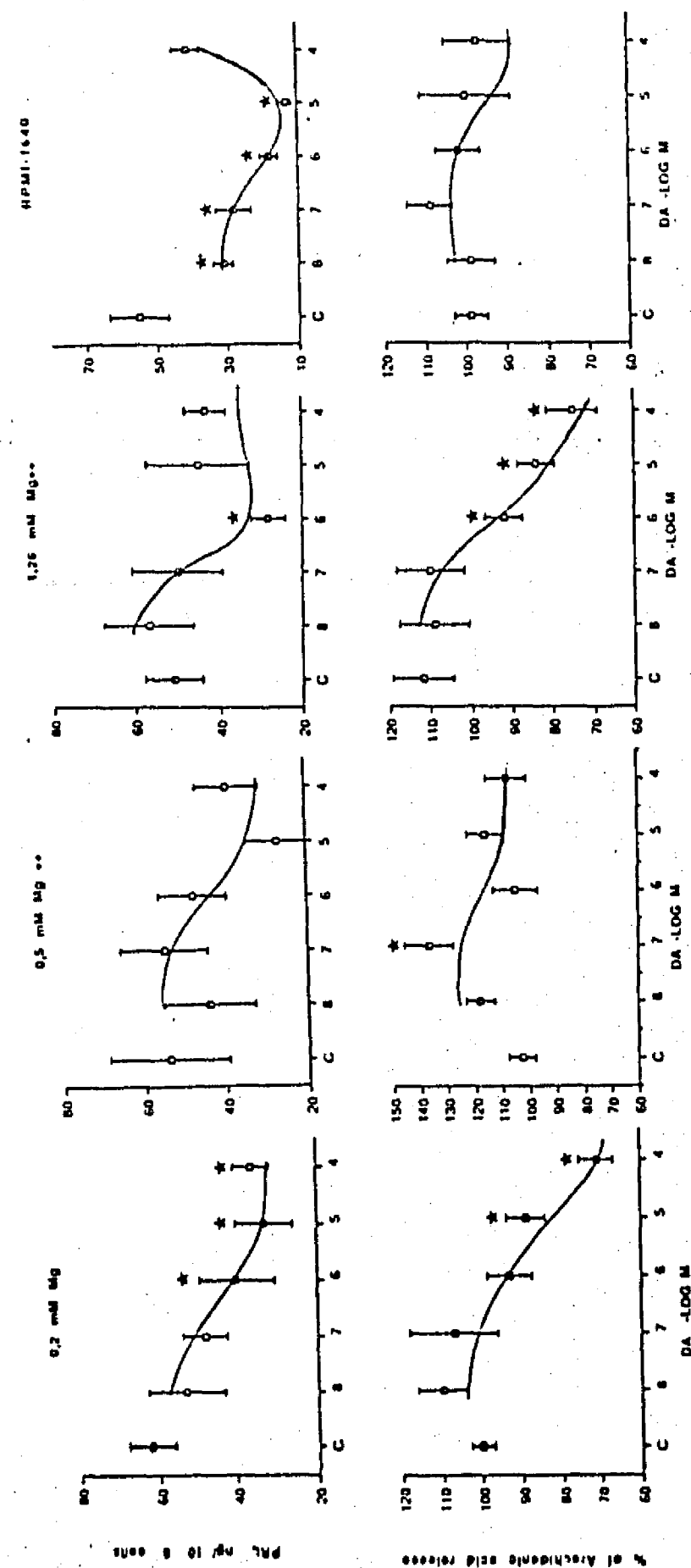
Ponce G. has received a CONACyT fellowship for the development of this work.

BIBLIOGRAPHY

- 1- Enjalbert A, Bockaert J. (1983) Pharmacological characterization of D2 dopamine receptor negatively coupled with adenylate cyclase in rat anterior pituitary. *Mol. Pharmacol* 23:576
- 2- Kebabian JW, Calne DB. (1979) Multiple receptors for dopamine. *Nature* 277:93
- 3- Caron MG, Beaulieu M, Raymond V, Gagne B, Drouin J, Leikowitz RJ, Labrie F. (1978). Dopaminergic receptors in the anterior pituitary gland. *J. Biol. Chem.* 104:307
- 4- De Camilli P, Maconi D, Spada A. (1975) Dopamine inhibits adenylate cyclase in human prolactin secreting pituitary adenoma. *Nature* 278:252
- 5- Orsatti J, Schwartz JP, Costa E (1981) Dopaminergic modulation of adenylate cyclase stimulation by vasoactive intestinal peptide in anterior pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78:6531
- 6- McDonald WM, Sibley DR, Kilpatrick BE, Caron MG (1984) Dopaminergic inhibition of adenylate cyclase correlates with high affinity agonist binding to anterior pituitary D2 dopamine receptors. *Mol. Cell Endocrinol* 36:201
- 7- Sasaki K, Sato M (1987) A single GTP-binding protein regulates K⁺ channels coupled with dopamine, histamine and acetylcholine receptors. *Nature* 325:259
- 8- Israel JM, Jacquet F, Vincent JD. (1985) The electrical properties of isolated human prolactin secreting adenoma cells and their modification by dopamine. *Endocrinology* 117:1448
- 9- Israel JM, Kirk C, Vincent JD (1987) Electrophysiological responses to dopamine of rat hypophysial cells in lactotroph enriched primary cultures *J. Physiol* 390:1
- 10-Enjalbert A, Sladeczek F, Guillon G, Bertrand P, Shu C, Epelbaum J, Garcia-Sainz A, Jard S, Lombard C, Kordon C, Bockaert J (1986) Angiotensin II and dopamine modulate both cAMP and inositol phosphate production in anterior pituitary cells. Involvement in prolactin secretion. *J. Biol. Chem.* 261:4071
- 11-Simmons SH, Strange PG, (1985) Inhibition of inositol phospholipid breakdown by D2 dopamine receptors in dissociated bovine anterior pituitary cells. *Neurosci. Lett.* 60:167
- 12-Journat L, Homburger V, Fantalon C, Friam M, Bockaert J, Enjalbert A. (1987) An IAF sensitive G protein is involved in dopamine inhibition of angiotensin and TRH stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 262:15106

- 13-Cronin MJ, Myers GA, MacLeod RM, Hewlett EL (1983) Pertussis toxin uncouples dopamine receptor mediated inhibition of prolactin release. *Am. J. Physiol.* 244:E494
- 14-Codina J, Grenet D, Yatani A, Birbaumer L, Brown AM. (1987) Hormonal regulation of pituitary GH3 cells K⁺ channels by G_i is mediated by its alpha-subunit. *FEBS Lett.* 216:104
- 15-Enjalbert A, Musset F, Chenard C, Friam M, Kordon C, Heisler S. (1988) Dopamine inhibits prolactin secretion stimulated by the calcium channel agonist Bay-k-8644 through a pertussis toxin-sensitive G-protein in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 123:406
- 16-Canonica PL, Schettini G, Valdenegro CA, MacLeod RM. (1983) Arachidonic acid metabolism and prolactin secretion in vitro: a possible role for the lipoxygenase products. *Neuroendocrinology* 37:212
- 17-Buttner N, Siegelbaum SA, Volterra A. (1989) Direct modulation of Aplysia S-K⁺ channels by a 12-lipoxygenase metabolite of arachidonic acid. *Nature* 342:553
- 18-Kuarchi Y, Ito H, Sugimoto T, Shimizu T, Miki I, Ui M. (1985) Arachidonic acid metabolites as intracellular modulators of the G protein-gated cardiac K⁺ channel. *Nature* 337:55
- 19-Rajendra SR, Lowell EH. (1990) Role of phosphoinositides in transmembrane signaling. *Physiol. Rev.* 70:115
- 20-Grandison L (1984) Stimulation of anterior pituitary prolactin release by melittin, an activator of phospholipase A₂. *Endocrinology* 114:1
- 21-Canonica PL, Judd AM, Kioke K, Valdenegro CA, MacLeod RM. (1985) Arachidonate stimulates prolactin release in vitro a role for the fatty acid and its metabolites as intracellular regulator(s) in mammoth. *Endocrinology* 116:218
- 22-Judd AM, Kioke K, MacLeod RM. (1986) A possible role of arachidonate metabolism in the mechanism of prolactin release. *Am. J. Physiol.* 250:E288
- 23-Kolesnick RN, Musacchio I, Thaw C, Gershengorn MC (1984) Arachidonic acid mobilizes calcium and stimulates prolactin secretion from GH3 cells. *Am. J. Physiol.* 246:E458
- 24-Camoratto AM, Grandison L (1985) Evidence supporting a correlation between arachidonic acid release and prolactin secretion from GH3 cells. *Endocrinology* 116:1506
- 25-Koike K, Judd AM, MacLeod RM (1985) 15-Hydroxyicosatetraenoic acid increase prolactin release from anterior pituitary cells. *Endocrinology* 116:1813
- 26-Cashman JR, Hanks D, Weiner RJ. (1987) Epoxy Derivates of arachidonic acid are potent stimulators of prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 48:246
- 27-Ross P, Judd A, MacLeod RM (1988) The dynamics of arachidonic acid liberation and prolactin release: a comparison of thyrotropin-releasing hormone, angiotensin II and neurotensin stimulation in perfused anterior pituitary cells. *Endocrinology* 123:2445
- 28-Judd AM, Ross PC, Spangelo BL, MacLeod RM (1988) Angiotensin II increases pituitary cell prolactin release and arachidonate liberation. *Mol. Cell Endocrinol.* 57:115
- 29-Canonica PL. (1989) D-2 Dopamine receptor activation reduces free 3H-Arachidonate release induced by hypophysiotropic peptides in anterior pituitary cells. *Endocrinology* 125:1160
- 30-Ohmichi M, Hirota K, Kioke K, Kadowaki K, Yamaguchi M, Miyake A, Tanizawa D. (1990) Dopamine inhibits the arachidonate and prolactin release stimulated by thyrotropin-releasing hormone through an islet-activating protein-sensitive GTP-binding protein in anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 52:75
- 31-Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg M, Friam M, Eluet-Fajot MT, Rotstein W, Kordon C (1980) Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 31:200
- 32-Salomon Y, Londos C, Rodbell M (1974) A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58:541
- 33-Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265
- 34-Enyeart JJ, Aizawa T, Hinkle PM. (1986) Interaction of Dihydropyridine Ca⁺⁺ agonist BAY-K-8644 with normal and transformed pituitary cells. *Am. J. Physiol.* 250:C95
- 35-Enyeart JJ, Sheu SS, Hinkle PM. (1987) Dihydropyridine modulators of voltage sensitive Ca⁺⁺ channels specifically regulate prolactin production by GH4C1 pituitary tumor cells. *J. Biol. Chem.* 262:3154
- 36-Billah MM, Lapetina EG, Cuatrecasas P (1980) Phospholipase A₂ and phospholipase C activities of platelets. Differential substrate specificity, Ca⁺ requirement, pH dependence, and cellular localization. *J Biol Chem.* 255:10227
- 37-Ukano Y, Ishizuka Y, Nakashima S, Tohmatsu T, Takagi H, Nozawa Y (1985) Arachidonic acid release in rat peritoneal mast cells stimulated with antigen, ionophore A23187 and compound 48/80. *Biochem Biophys Res Comm.* 127:726
- 38-Gannon CH, Allen PL, Morell F. (1989) Bradykinin stimulates phosphoinositide hydrolysis and mobilization of arachidonic acid in dorsal root ganglion neurons. *J. Neurochem.* 53:95

- 39-Delbecke D, Kojima I, Hannies p, Rasmussen H (1984) Synergistic stimulation of prolactin release by phorbol esters, A23187 and forskolin. *Biochem Biophys Res Comm.* 123:735
- 40-Judd AM, Logan IS, MacLeod RM (1989) Evidence that phorbol diester-sensitive protein kinase-C(s) may not be directly involved in secretagogue-stimulated prolactin release and arachidonate liberation. *Endocrinology* 125: 1134
- 41-Okajima F, Ui M. (1984) ADP-ribosylation of the specific membrane protein by islet-activating protein, Pertussis toxin, associated with inhibition of a chemotactic peptide-induced arachidonate release in neutrophils. *J.Biol.Chem.* 259:13663
- 42-Nakamura I, Ui M. (1985) Simultaneous inhibitions of inositol phospholipid breakdown, arachidonic acid release and histamine secretion in mast cells by islet-activating protein, Pertussis toxin. *J.Biol.Chem.* 260:3584
- 43-Burch RM, Luino A, Axelrod J. (1986) Phospholipase A2 and phospholipase C are activated by distinct GTP-binding proteins in response to 1-adrenergic stimulation in FRTL5 thyroid cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 83:7201
- 44-Jelsema CL, Axelrod J. (1987) Stimulation of phospholipase A2 activity in bovine rod outer segments by the subunits of transducin and its inhibition by the subunit. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84:3623
- 45-Burch RM, Axelrod J. (1987) Dissociation of bradikinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc.Natl.Acad.Sci.* 84:6374
- 46-Felder CC, Kanterman RY, Ma AL, Axelrod J. (1990) Serotonin stimulates phospholipase A2 and the release of arachidonic acid in hippocampal neurons by a type 2 serotonin receptor that is independent of inositolphospholipid hydrolysis. *Proc Natl Acad.Sci.* 87:2187
- 47-Kanterman RY, Feldre CC, Brennehan DE, Ma AL, Fitzgerald S, Axelrod J. (1990) 1-Adrenergic receptor mediates arachidonic acid release in spinal cord neurons independent on inositol phospholipid turnover. *J.Neurochem.* 54:1225
- 48-Watkins DC, Northup JK, Malbon CC. (1989) Pertussis toxin treatment in vivo is associated with a decline in G-protein b-subunits. *J.Biol.Chem.* 264:4166
- 49-Musset , Bertrand F, Kordon C, Enjalbert A. Differential coupling with Pertussis toxin sensitive G proteins of dopamine and somatostatin receptors involved in regulation of adenohypophyseal secretion. *Mol. and Cell Endocrinol.* in press



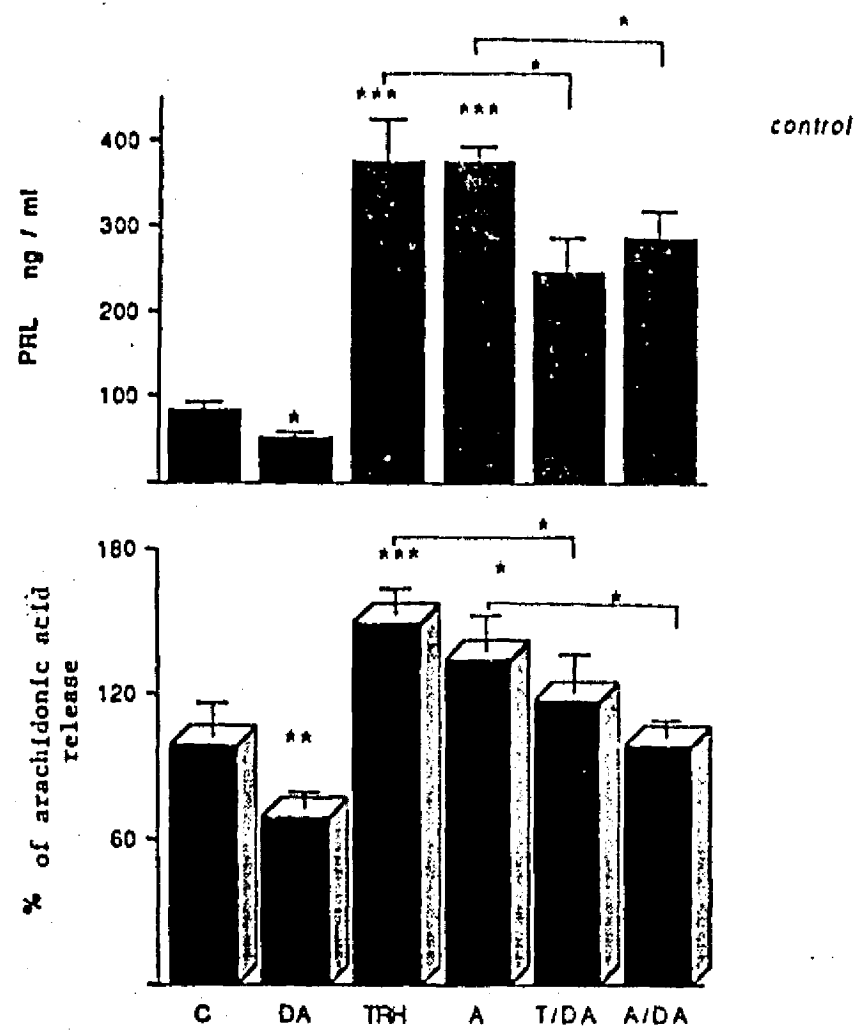


Fig 2

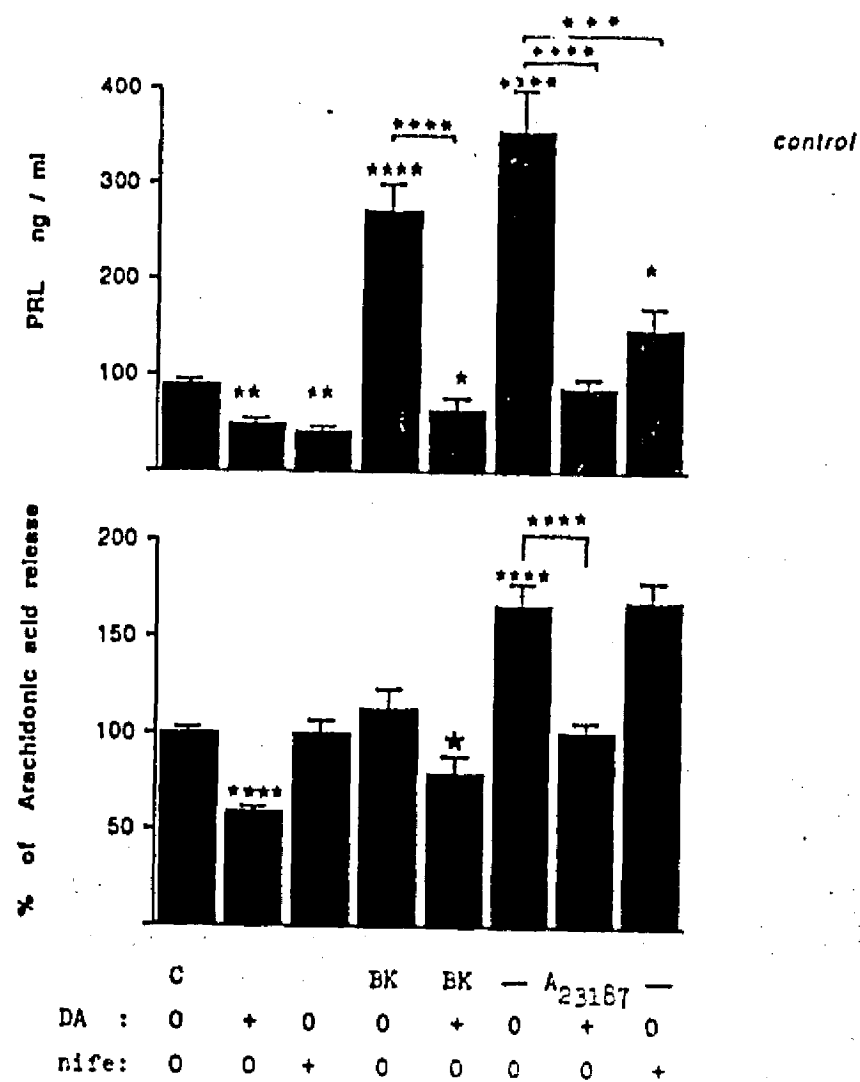


Fig 3

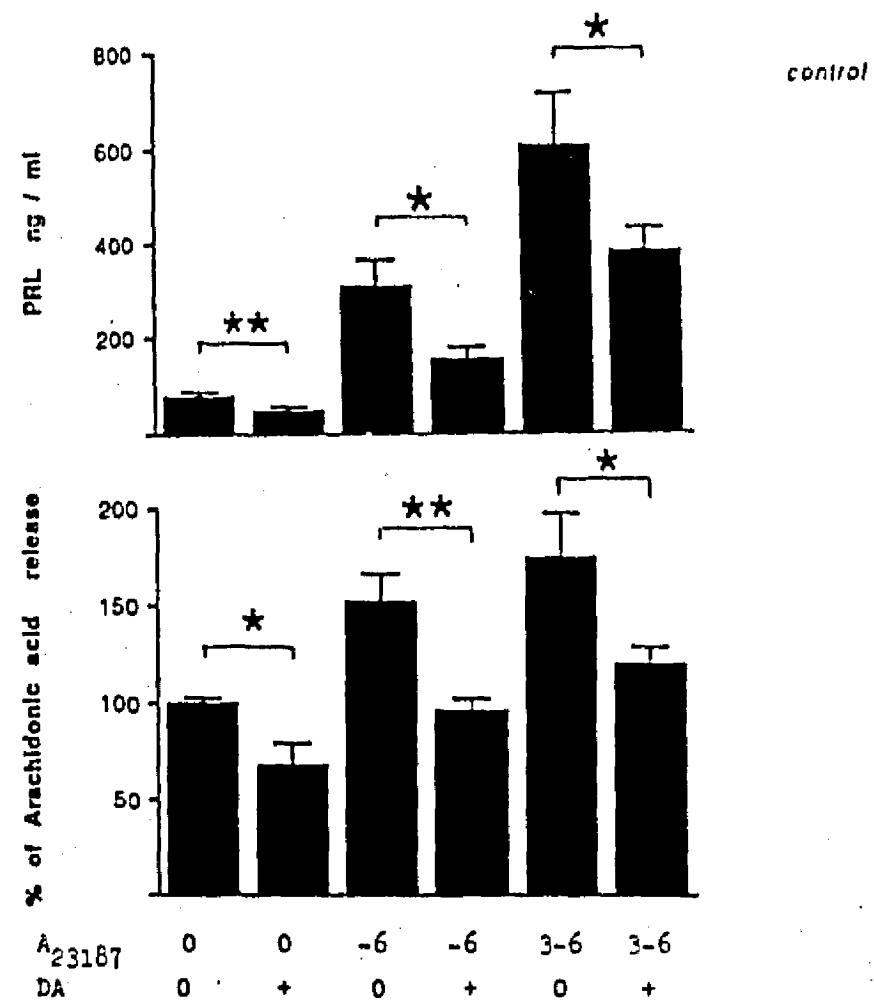


Fig 4

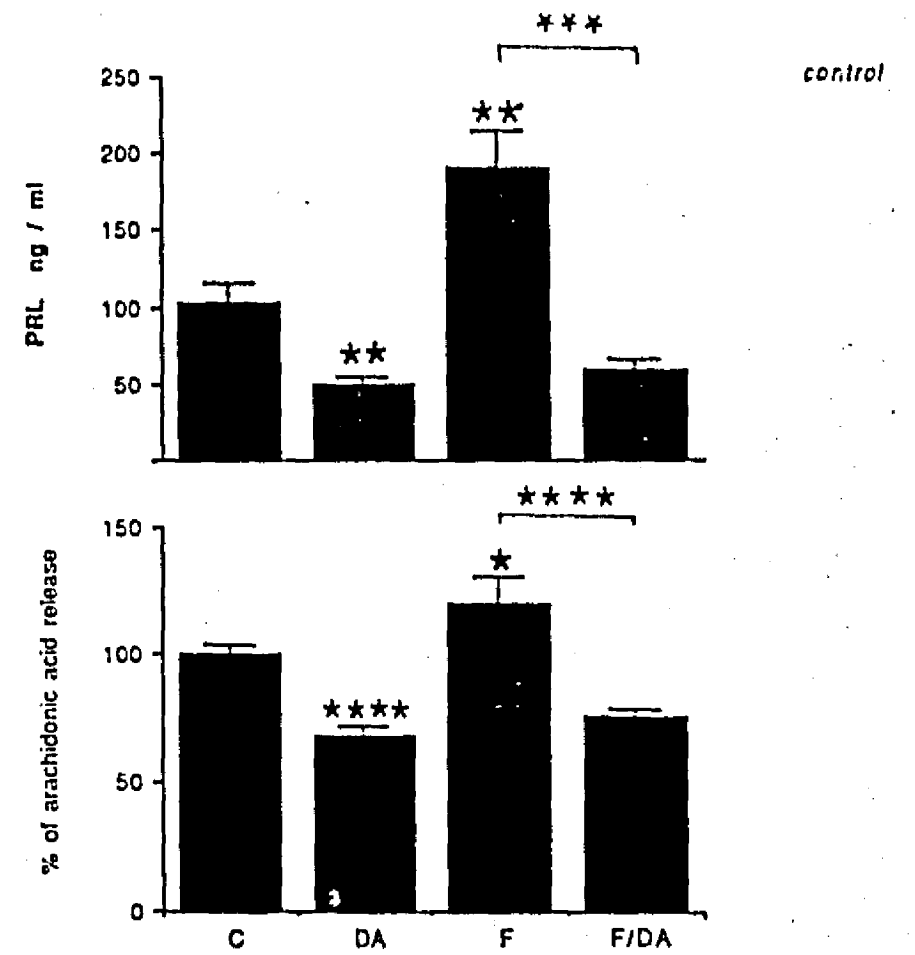
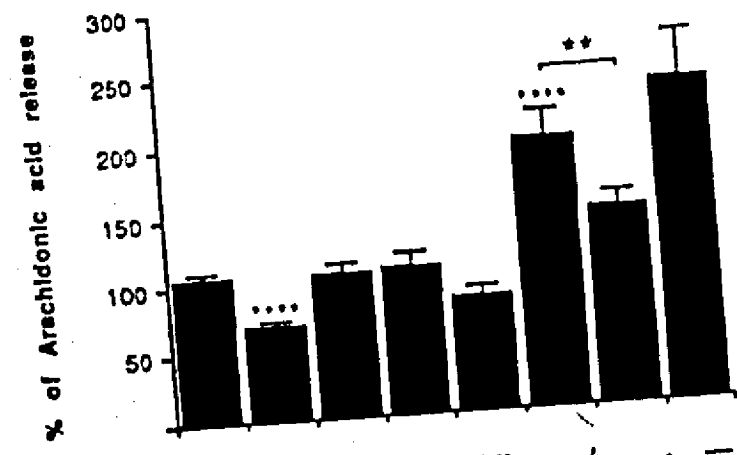
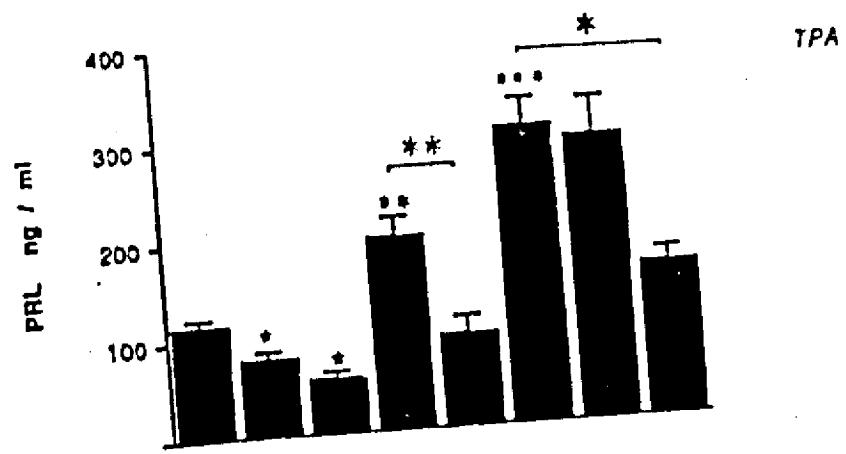


Fig 5



	C	DA	EK	BK	A	25287
DA :	0	+	0	0	0	+
25287 :	0	0	+	0	0	0

Fig 6

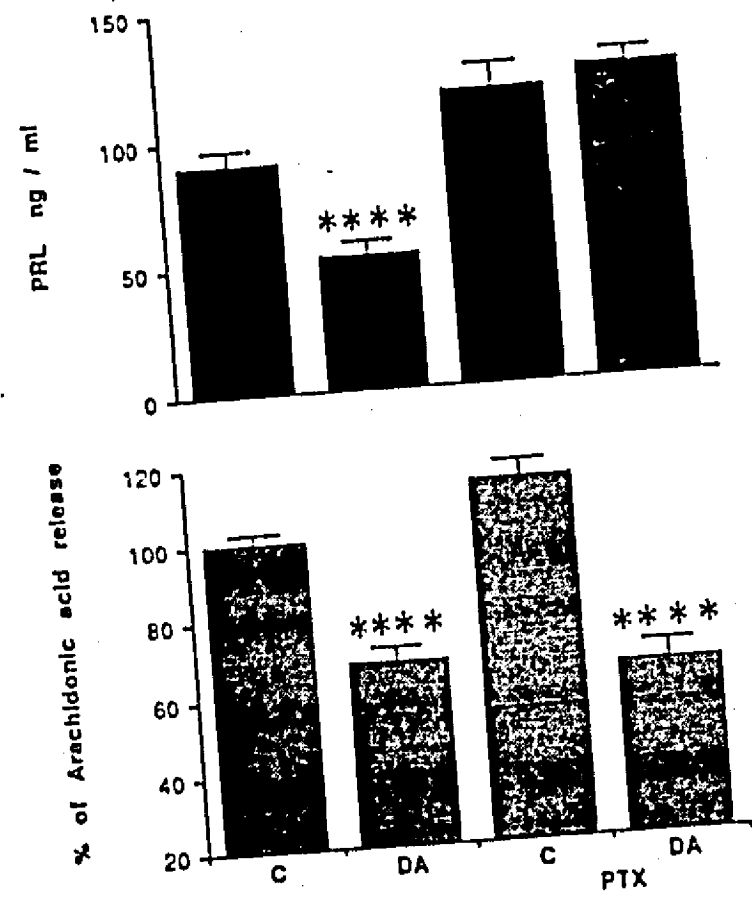


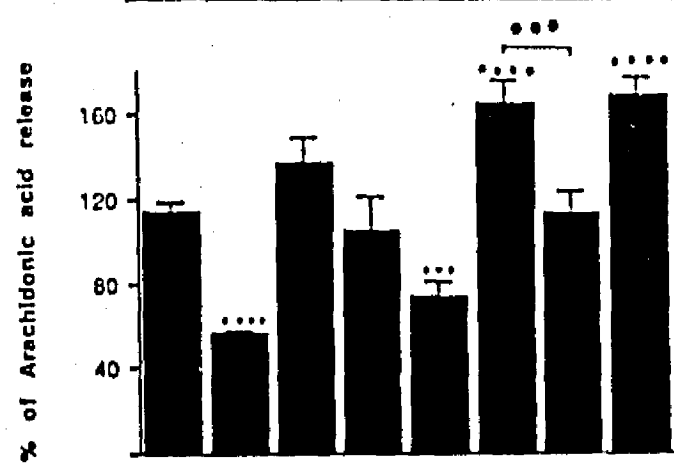
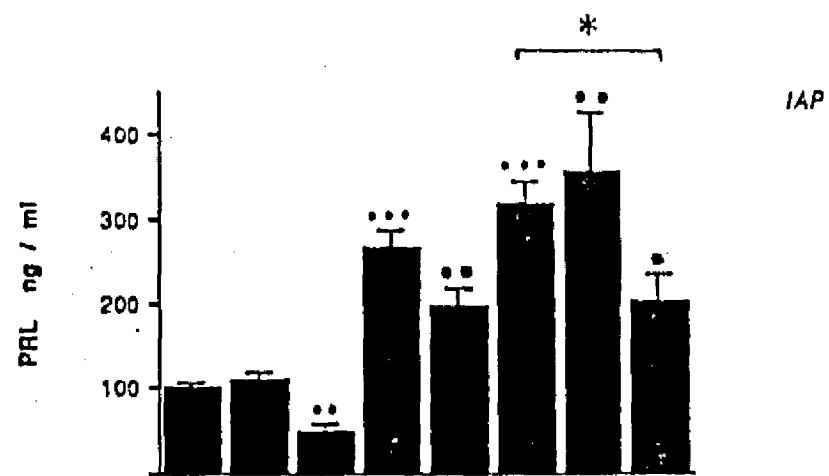
Fig 7

% of acid release	1.26 mM Mg^{2+} RPMI-1640			
	0.2	0.5	1.0	2.0
CONTROL	102 ± 4(23)	94 ± 3(27)	100 ± 6(18)	101 ± 3(30)
TRH	141 ± 18(18)*	136 ± 8(19)***	118 ± 6(20)	126 ± 6(29)
A II	141 ± 14(14)**	145 ± 9(21)***	132 ± 7(21)***	149 ± 5(27)****
PRL ng / ml	-----			
CONTROL	84 ± 10	55 ± 5	66 ± 5	54 ± 4
TRH	374 ± 49***	378 ± 21***	392 ± 39***	464 ± 29***
A II	375 ± 16***	307 ± 37***	368 ± 39***	375 ± 34***

Table 1

	CONTROL	PTX PRETREATED
C	101 ± 8 (9)	72 ± 4 (9)
DA	60 ± 8 (9)***	68 ± 6 (9)
F	1452 ± 76 (6)***	1071 ± 62 (6)
F/DA	994 ± 90 (6)]....	1291 ± 60 (6)

Table 2



	C		BK	BK	-	A ₂₃₁₈₇	-
DA	0	+	0	+	0	+	0
nife	0	0	+	0	0	0	+

fig 8

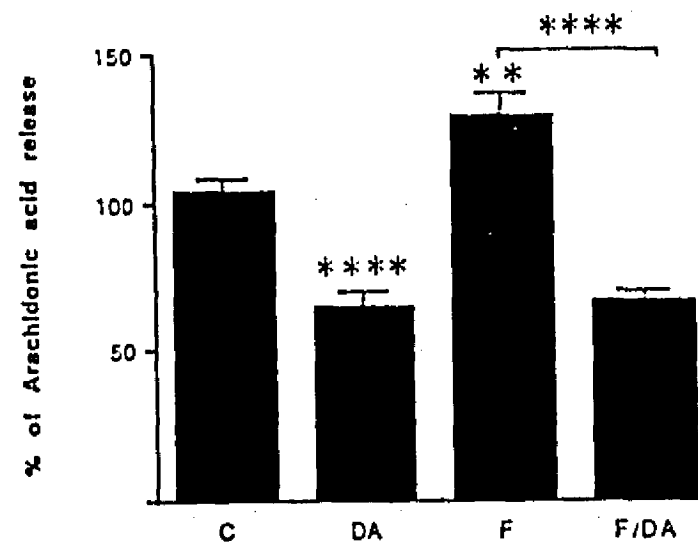
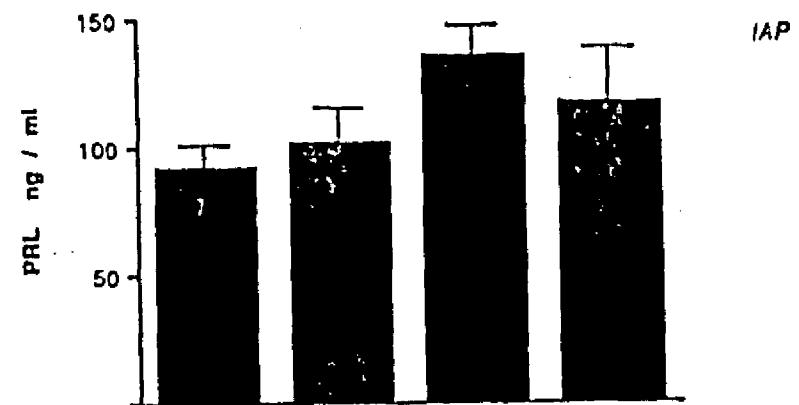


fig 9

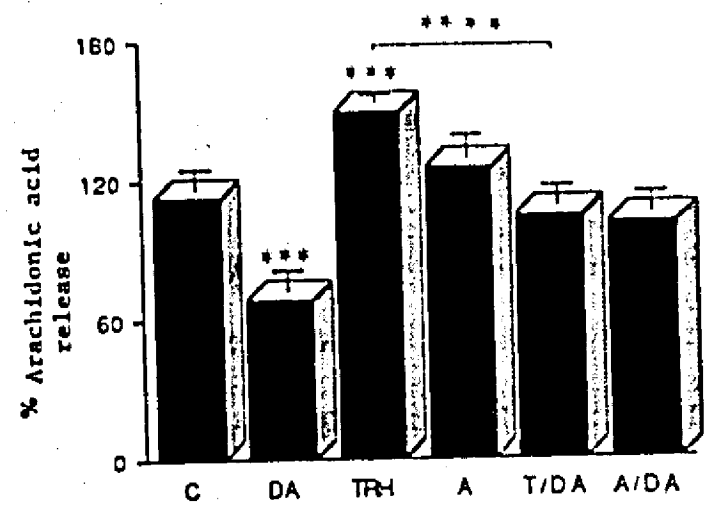
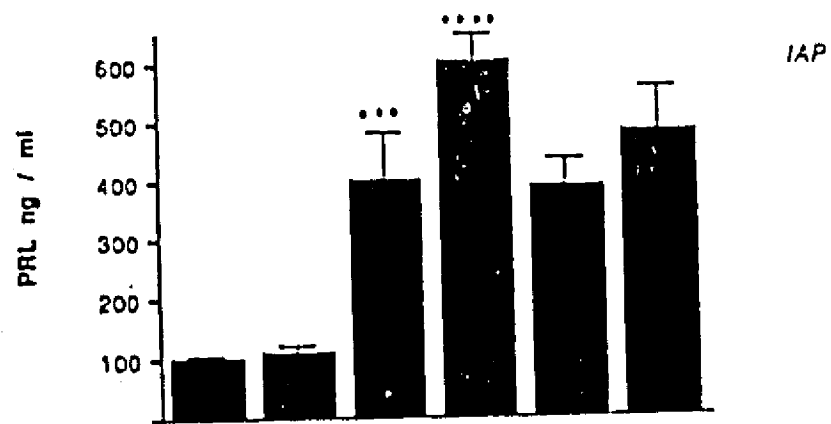
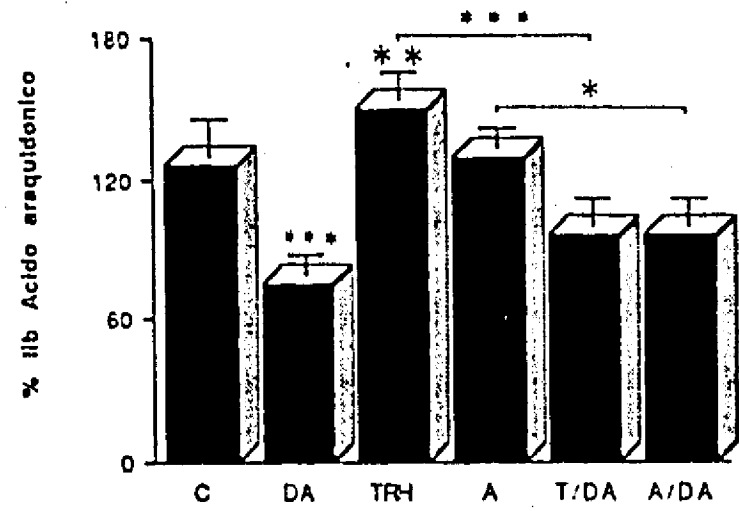
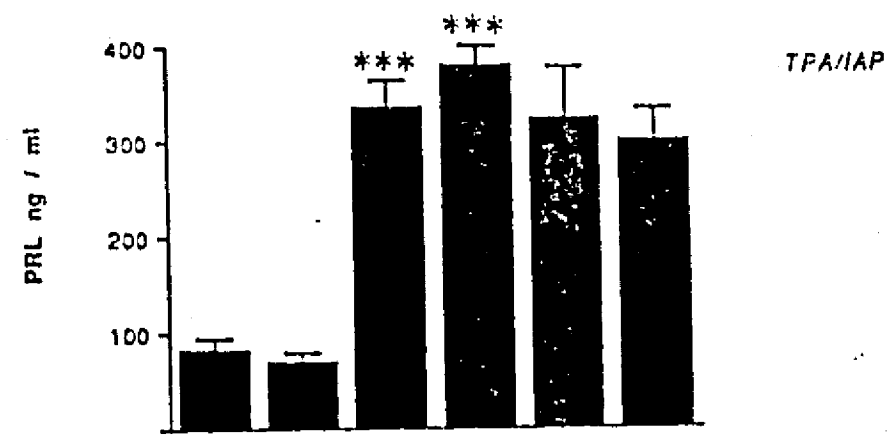
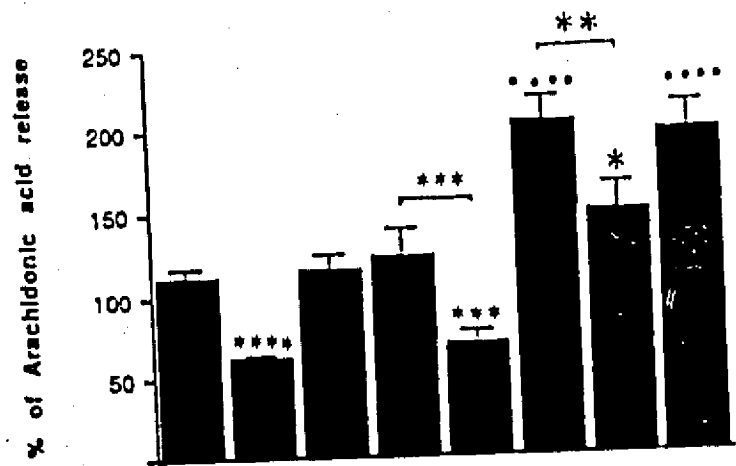
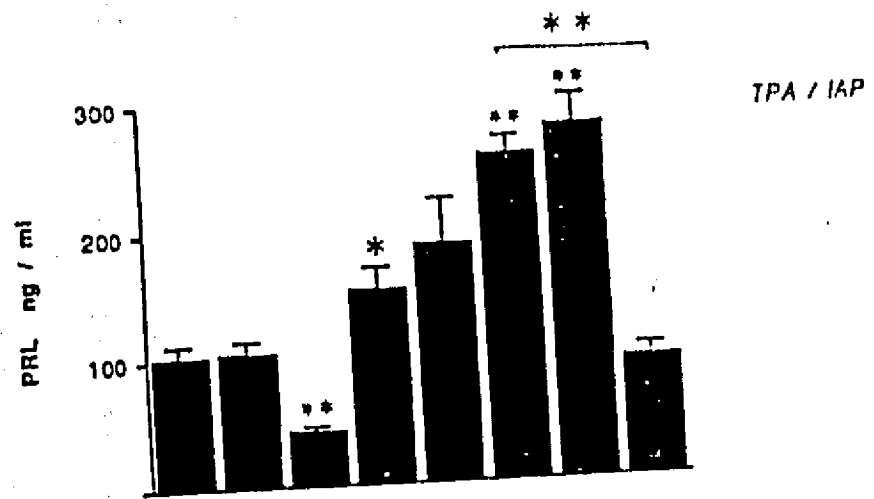


Fig 10



% Arachidonic acid Release

Fig 11



	C		BK	BK	- A ₂₃₁₈₇ -		
DA :	0	+	0	0	+	0	0
nife:	0	0	+	0	0	0	+

Fig 12

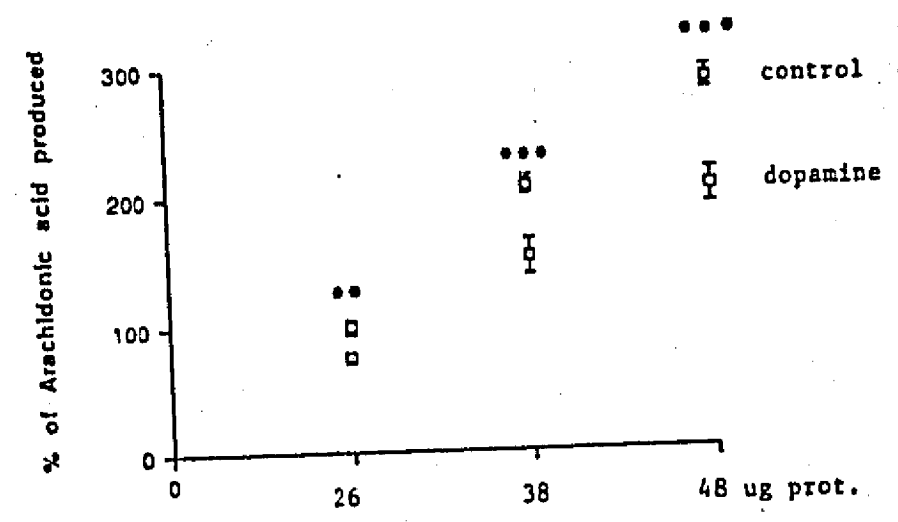


Fig 13

Fig 1 Dose response of DA inhibition of 3H-AA release and PRL secretion in RFB with different Mg2+ concentration and in RPMI medium. Cells were incubated in presence of DA in RFB or RPMI by 5 min. Samples for PRL determination come from the same well. Results of AA release are % of control release (control=100%) and are X + SEM (n is 6-10). p<0.05

Table 1 3H-AA release and PRL secretion in RFB with different Mg2+ concentration and in RPMI medium. Results of AA release are expressed as % of control release and are X + SEM (n is indicated in parentheses) p<0.05; p<0.02; p<0.01; p<0.001

Fig 2 Effect of peptides TRH and AII (10-6 M) on 3H-AA release. TRH, AII and DA were added at the same time and incubation time was 5 min. Results are X + SEM (n=6)

Fig 3 Effect of drugs affecting intracellular Ca2+ concentration on 3H-AA release and PRL secretion. Data are X + SEM (n=9-24) p<0.05; p<0.02; p<0.01; p<0.001

Fig 4 Dose-response of 3H-AA release and PRL secretion by A23187 and DA inhibition. Data are X + SEM (n=6). p<0.05; p<0.02

Fig 5 Effect of Adenylate cyclase activation with forskolin (10-5 M) on 3H-AA release and PRL secretion in control cultures. Incubation time was 5 min. Data are X + SEM of 6-20 independent determinations. p<0.05; p<0.02; p<0.01; p<0.001

Fig 6 Effect of drugs affecting intracellular Ca2+ concentration on 3H-AA release and PRL release in cells treated 24 h with TPA. Data are X + SEM (n is 9-21 independent determinations). p<0.05; p<0.02; p<0.01; p<0.001

Fig 7 Effect of PTX treatment (100 ng/ml 24 h) on DA inhibition of 3H-AA release and PRL secretion. Data are X + SEM of 15-21 independent determinations. p<0.001

Table 2 AMPc accumulation in control and PTX treated (100 ng/ml 24 h) cultures. Fk was added in presence or absence of DA; incubation time was 5 min. Data are X + SEM of n indicated in parentheses. p<0.01; p<0.001

Fig 8 Effect of drugs affecting intracellular Ca2+ concentration on 3H-AA release and PRL secretion in cultures treated with F1X. Results are X + SEM (n is 9-21) p<0.05; p<0.02; p<0.01; p<0.001

Fig 9 Effect of adenylate cyclase activation with forskolin on 3H-AA release and PRL secretion in cultures treated with F1X (100 ng/ml 24 h). Data are X + SEM of 5-20 independent determinations. p<0.02; p<0.001

Fig 10 Basal and TRH induced 3H-AA release inhibition by DA in cultures treated with F1X (100 ng/ml 24 h). Data are X + SEM (n=6) p<0.01; p<0.001

Fig 11 DA inhibition of 3H-AA release provoked by TRH and AII in cultures treated with TPA and F1X during 24h. Results are X + SEM (n=6) p<0.05; p<0.02; p<0.01

Fig 12 Effect of drug affecting intracellular Ca2+ concentration on 3H-AA release and PRL secretion in cultures treated with TPA (10-6) and F1X (100 ng/ml) during 24 h. Results are X + SEM (n is 9-21) p<0.05; p<0.02; p<0.01; p<0.001

Fig 13 3H-AA produced from membranes crude preparations and DA inhibition. Membranes were prepared as indicated in material and methods and were incubated in presence of DA (10-6M), time incubation was 60 min. Data as expressed as % of control release (c = 100%). X + SEM (n = 6). p<0.02; p<0.01

**Some Events of TRH Metabolism are Regulated In Lactating and
Cycling Rats**

Rosa María Uribe, Patricia Joseph-Bravo, Jorge Pasten, Georgina Ponce, Milagros Méndez, Luis Covarrubias and Jean-Louis Charli.

Centro de Investigación sobre Ingeniería Genética y Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, A.P. 510-3, Cuernavaca, Mor., 62271, MEXICO.

Running title: *in vivo* regulation of TRH metabolism

key words: TRH; TRH mRNA; pyroglutamyl peptidase II; lactation; estrous cycle; post-translational processing; translational efficiency.

Acknowledgments: We are very grateful to Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera for helpful discussions, to Dr. Claude Kordon for facilitating us the PRL assay reagents and Elizabeth Mata, and Sergio González for technical assistance. Supported in part by grants from CONACYT (PCEXCNA-051014) and European Economic Community (CI-0356-F).

Abstract. Levels of TRH, TRH mRNA, and pyroglutamyl peptidase II, were analyzed in the hypothalamus-adenohypophysial axis during lactation and estrous cycle. Mediobasal hypothalamic levels of TRH, dropped 41% ($p < 0.01$) from pregnancy levels (taken as 100%) at first day of lactation, recovering until day 15 to the values observed at pregnancy. A sharp decrease was also observed during weaning (36%, $p < 0.01$ compared to last day of lactation). TRH levels in the neurohypophysis increased during lactation and dropped at weaning. Highest TRH mRNA levels in paraventricular nucleus were found at end of pregnancy and beginning of lactation; they decreased 37% ($p < 0.05$) at day 5 of lactation and stayed constant thereafter. Pyroglutamyl peptidase II adenohypophyseal activity was not modified during lactation, but changed during estrous cycle. Relative to estrous values activity it diminished 58% ($p < 0.05$) at 10:00 h (57% at 14:00 h) during diestrous 2 and 27% at 10:00 h (37% at 14:00 h) during proestrus. Hypothalamic TRH mRNA levels fluctuated in opposite manner to adenohypophyseal pyroglutamyl peptidase II during estrous cycle with a peak at diestrous 2: 183% of estrous value ($p < 0.05$). These data point for regulation of TRH metabolism in conditions where prolactin secretion fluctuates. They also suggest a sharp release of TRH between the end of pregnancy and the first day of lactation and, that translational efficiency or post-translational processing of TRH precursor in the paraventricular neurons (projecting to median eminence) increases during lactation and drops at weaning, concomitantly with PRL secretion.

Introduction

In vivo regulation of thyrotropin releasing hormone (TRH) metabolism and secretion in the hypothalamo-hypophyseal axis has been mainly studied determining TRH levels in median eminence, in push-pull perfusates or, portal blood [1,2]. Additional methods for studying TRH metabolism are also available. Levels of mRNA for endocrine peptides are in some instances elevated when peptide secretion increases [3]; therefore TRH mRNA levels can indicate the state of activity of TRH neurons. In addition, variations of pyroglutamate amino peptidase II (PP II) activity, a TRH specific peptidase [4] localized on lactotrophs [5], might affect TRH efficiency on target cells. TRH metabolism is regulated by the thyroid state of the animal in a region specific manner. Thyroid hormones (TH) down regulate the levels of TRH mRNA in the paraventricular nucleus (PVN) [6] while they up regulate PP II activity in adenohypophysis [7]. Oestradiol 17 β (E₂) reduces adenohypophyseal PP II activity [8].

Prolactin (PRL) secretion from adenohypophysis is under tonic dopaminergic inhibition [9]. TRH is one of several factors controlling release of PRL from adenohypophysis in the rat. In vitro and in vivo studies have shown that it stimulates PRL release and synthesis [10]. Its efficiency depends on previous dopaminergic activity, i.e. a transient decrease of the dopaminergic tone is necessary to induce transformation of PRL into a pool releasable by TRH stimulation [11]. Serum PRL concentrations are correlated with variations in stalk blood TRH during lactation or estrous cycle [12,13]. For example, during late proestrus, TRH levels are high in portal blood relative to those found in the morning of proestrus [1]. Passive

immunization with anti-TRH antisera induces partial inhibition of suckling-induced PRL release and PRL release at proestrus [14,15]. There are however, reports contradicting TRH involvement on PRL release [16,17]. In the present study we show that TRH and its mRNA fluctuate during lactation and that, during estrous cycle, TRH mRNA level and adenohypophyseal extracellular degradation are regulated.

Materials and Methods

Animals

Wistar rats fed ad libitum and maintained in a 12 hrs light-dark period (light on at 7:00) were used. Animals were killed by decapitation. Hypothalami (including preoptic area), mediobasal hypothalami (MBH; median eminence plus ventral part of arcuate nucleus), neurohypophysis, adenohypophysis, and sera were immediately collected and kept at -70 °C until assayed. For PVN area dissection, HMB was dissected, brains frozen on dry ice and 1.5 mm coronal slice containing the entire PVN was cut with razor blades. PVN area dorsal margin was defined by the fornices. Three groups of animals were used:

- a) a group of 7 rats in their 18th day of pregnancy was killed between 11:00 and 12:00 hrs;
- b) 135 primiparous lactating rats, each with a litter of eight pups, were housed in individual cages. Each lactating rat was sacrificed between 11:00 and 12:00 hrs at the indicated day of lactation, and at weaning, i.e. 24 hrs after separating pups from the mother, at day 23;

c) 196 rats on different days of their estrous cycle were screened between 9:00 and 10:00 hrs or between 12:00 and 13:00 by vaginal smears. Rats were only used when showing three consecutive cycles of 4 days each. They were sacrificed between 10:00-11:00 or 14:00-15:00 hrs.

RNA Isolation

Cytoplasmic RNA from hypothalami was extracted for analysis of estrous cycle samples. Total cellular RNA from PVN was extracted for pregnancy and lactation samples.

Cytoplasmic RNA was extracted as previously described [18]. Each hypothalamus was homogenized in 200 μ l 50mM Tris-HCl pH 7.4, 25mM NaCl, 5mM MgCl₂; 8 μ l of 25% Triton X-100 and 100 μ l of 72% sacrose were added and the homogenate centrifuged 10 min at 4 °C; the supernatant (cytosolic fraction) where 100 μ l of 6% SDS, 0.4M NaCl, 40mM EDTA solution were added, was extracted 3X with phenol-chloroform (vol./vol.); to the aqueous phase, 5M NaCl (1/25th of total vol.) and 2 vol. of ethanol were added and left at -70 °C for 12 h to precipitate total RNA. Extraction efficiency was 3 μ g RNA/mg protein. Total cellular RNA was isolated as cytoplasmic RNA but water, instead of sucrose solution, was used for homogenate dilution. In this case extraction efficiency was 1.3 μ g RNA/mg tissue.

Northern blot hybridization

5-10 μ g RNA were electrophoresed in minigels (2.2 M formaldehyde, 1% agarose and 10 mM phosphate buffer pH 7.0). Following electrophoresis, gels were stained with ethidium bromide (4 μ g/ml) for 5 min., destained for 6-8 hrs with water, and photographed with UV transillumination for RNA quantification. Loaded samples were transferred to nitrocellulose membrane for 24 to 36 hrs using 20 x SSC; the membranes were then baked for 2 hrs at 80 °C. Hybridizations were performed as described [18] using the rat cDNA as probe [19]. Ribosomal RNA (stained with ethidium bromide) and TRH mRNA autoradiographic bands were quantified by laser densitometry (Biomed Instruments, Fullerton, CA.). TRH mRNA levels were normalized to rRNA amount.

TRH and PRL radioimmunoassays

TRH was quantified according to Joseph-Bravo et al, 1979 [20]. Sensitivity of assay (90% B/B0) was 10 pg; intraassay and interassays variations were 6 and 10% respectively. PRL radioimmunoassay was performed as Enjalbert et al, 1980 [21]. Rat PRL RP3 reference preparation (NIDDK-NIH) was used. Inter and Intraassay variabilities were below 15%.

Determination of adenohipophysial PP II and serum thyroliberinase activities

Pools of 5 adenohipophysies were sonicated in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (10% w/v), centrifuged at 1000 g for 15 min and supernatants centrifuged at 12 000 g for 15 min. Pellets were used to measure PP II activity as described [7]. Membranes

were preincubated (5min) at 37 °C in 50mM sodium phosphate buffer pH 7.4 containing 2.5 mM bacitracin and N-ethylmaleimide (final concentrations) and incubated at 37 °C with 100 000 cpm of [³H-pro]TRH (New England Nuclear) (10⁻⁶ M final concentration) in 50 ul final volume. Five microliter aliquots were taken at the beginning and during incubation (up to 1 hour) and spotted into cellulose phosphate paper (Whatman P81). Ascending chromatography was developed in 1M acetic acid. After drying the paper, the first cm was cut, [³H-pro] hisproNH₂ eluted and counted. Zero time values were subtracted from other time values and each determinations made in duplicate. Thyroliberinase activity was measured as described for PP II except that serum was diluted 1:3 with 0.1 M Tris-HCl, pH 7.4. Activities were linear during incubation.

Protein determination

Proteins were quantified according to Lowry et al, 1951 [22].

Statistical analysis

Analysis of variance followed by Least significant difference multiple comparison test was performed. Significance was determined at p<0.05 or less.

RESULTS

TRH, TRH mRNA, PP II and serum thyroliberinase at day 18 of pregnancy, during lactation, and at weaning

Serum PRL concentration augmented during lactation and decreased at weaning to pregnancy levels (Fig 1) as previously reported [23]. Mediobasal hypothalamic levels of TRH dropped 41% (p<0.01 compared to day 18 of pregnancy (=100%)) at first day of lactation, increasing back to pregnancy levels at day 15; a sharp fall (36%, p<0.01 compared with day 15 of lactation) was also observed 24 hr after weaning (Fig 1). Levels of TRH in neurohypophysis, increased until day 10 of lactation and decreased thereafter; however these variations were not significant (Table 1). Highest TRH mRNA levels in PVN were found at the end of pregnancy and first day of lactation, and diminished 37% (p<0.05) at day 5 of lactation, remaining at this level until weaning (Fig 2). Adenohypophyseal PP II and thyroliberinase activities were not modified during lactation (Table 2).

TRH mRNA, PP II and serum thyroliberinase in estrous cycle

During estrous cycle, TRH mRNA levels and PP II activity fluctuated. Hypothalamic TRH mRNA levels (assayed between 14:00 and 15:00 h) augmented to 183% (p<0.05) at diestrous 2 with respect to estrous levels (Fig 3). Adenohypophyseal PP II (assayed between 10:00-11:00 h) lowest levels were found at diestrous 2 and proestrus with decreases of 58% (p<0.05) and 27% respectively as compared with estrous values (Fig 4). A similar pattern of activity was observed at 14:00-15:00 h (with decreases of 58% and 37% respectively) although these differences were not significant (Fig. 4). In contrast, thyroliberinase activity assayed

either in the morning or the afternoon did not vary during the estrous cycle (not shown).

DISCUSSION

This work shows regulation of some TRH metabolic steps during lactation and estrous cycle. Comparison of the levels of TRH in MBH with its mRNA in PVN, where originate most of the TRH neurons that innervate the median eminence [24], demonstrates no correlation between these two parameters during lactation. Steady state TRH levels in MBH could a priori be set by TRH biosynthesis, release or degradation rates. However, we have previously shown that, prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptidase I, two intracellular enzymes able to degrade TRH *in vitro*, do not participate in TRH catabolism in whole cells [25]. Therefore, the steady state levels in MBH are probably the result of biosynthesis and release. Changes in TRH levels could be due to variations of one of these two metabolic events or to their combined effect. Various studies have shown that, in neuroendocrine cells, peptide mRNA levels can fluctuate coordinately with secretion rates [3]. In particular high supraoptic nucleus vasopressin and oxytocin (OXT) mRNA levels during lactation correlate with high plasma peptide levels [26].

With this background we can tentatively interpret the data showing decrease of TRH levels between end of pregnancy and beginning of lactation as an increase of TRH secretion at this moment since TRH mRNA levels did not drop concomitantly. This is consistent with the blood PRL augmentation occurring at this moment. This postulated variation of TRH secretion coincides with the OXT release occurring at birth

[27] and may participate in the PRL surge that precedes parturition [28].

Stable TRH mRNA levels starting at day 5 of lactation are accompanied by increased MBH TRH levels until day 15, suggesting that TRH secretion from median eminence during lactation is not as high as at the beginning. However, it has been shown that suckling stimulates TRH release [13] and during days 5-15 of lactation plasma PRL is also increased ([23], and this work); the rise observed in TRH levels is thus best explained if post-nuclear events (processing of precursor or translational efficiency) are stimulated. In this regard, although still scarce, there is evidence for regulation of translation efficiency by steroids [29] and for activation of processing enzymes such as peptidyl-glycine α amidating monooxygenase (PAM), carboxypeptidase E and kallikrein by hormones or second messengers [30]. We have previously suggested that a post-translational step is increased to maintain TRH levels in the terminal upon stimulation of peptide release *in vitro* [31]. Increase in translational efficiency or TRH precursor processing may be necessary to maintain high TRH levels in the terminal for its release during suckling [13], as a consequence of a continuous activation of TRH neurons. Changes of TRH levels between day 15 of lactation and weaning suggest that mRNA levels are not regulated by the interruption of the stimulus as might be the reduction on TRH precursor processing.

The parallel changes occurring between the postulated post-nuclear events and PRL levels make it tempting to suggest that intensification of TRH secretion during lactation is one of the factors setting PRL levels during these physiological events.

The pattern of TRH levels in neurohypophysis or MBH suggest different roles and/or regulation for these tissues. However, in each tissue, levels did increase at the beginning of lactation and decreased at weaning. The post-nuclear mechanisms operating during lactation may be similarly altered in the two projections.

We previously noted a coordinated regulation of TRH mRNA levels in hypothalamus during the circadian cycle [18]. Levels of hypothalamic TRH mRNA during estrous cycle cannot be compared with TRH levels because they are the mean fluctuations from various nuclei. Due to their amplitude it is possible that TRH mRNA in several nuclei, including PVN, are regulated coordinately by variations of steroid levels. If so, high diestrous 2 TRH mRNA levels may indicate a build up of TRH in preparation for the preovulatory TRH and PRL surge. On the other hand, lower PP II levels during diestrous 2 and proestrus may be necessary to increase TRH efficiency. This inverse relationship between PP II and TRH mRNA is similar to that observed when thyroid hormone (TH) levels are altered [6,7].

Although TRH gene has consensus sequences for thyroid hormones and glucocorticoids receptors [32], glucocorticoids do not change during gestation or lactation [23] and, TH diminish during lactation [33]. Other hormonal or transneuronal activators may therefore participate either in transcription or mRNA stability. In this regard, we have found that intracellular second messengers can regulate TRH mRNA in hypothalamic cells in vitro (Ma.L. Covarrubias, L. Covarrubias, J.L. Charfi and P. Joseph-Bravo, in preparation).

Adenohypophyseal PP II is increased by TH and decreased by 17β oestradiol [7-8]. The fluctuations observed during estrous cycle are not in phase with estradiol

levels suggesting either a 24 h delay for E_2 effect or the involvement of yet unknown factors in setting PPII activity. These data point for involvement of PP II in regulation of PRL secretion.

In conclusion, the data demonstrate that various steps in TRH metabolism are regulated when PRL secretion is altered. Discrepancy between MBH TRH and PVN TRH mRNA levels during lactation indicate that a surge of TRH secretion can occur between end of gestation and beginning of lactation and suggest that translational efficiency or post-translational processing of TRH precursor in the PVN increases during lactation and drops at weaning. These modifications on post-nuclear events are paralleled by variations of blood PRL.

Table 1. TRH levels in neurohypophysis during lactation

Days	TRH
18 P	65 ± 5
5 L	90 ± 21
10 L	137 ± 21
15 L	115 ± 21
weaning	71 ± 22

Data (pg TRH / neurohypophysis) are Mean ± SEM of 3 independent determinations. P=pregnancy; L=lactation.

Table 2. Specific activities of adenohypophysial PP II and serum thyroliberinase during lactation.

Days of lactation	Adenohypophysial pyroglutamate aminopeptidase II*	Thyroliberinase*
1	0.052 ± 0.007	0.25 ± 0.022
4	0.049 ± 0.007	0.20 ± 0.010
11	0.056 ± 0.011	0.22 ± 0.026
22	0.050 ± 0.014	0.19 ± 0.042
29	0.056 ± 0.023	0.29 ± 0.020

In this experiment, in contrast to what is shown in figures 1, 2, and table 1, rats were maintained with their pups for up to 29 days. Data are mean ± SEM of 4 (PPII) and 3 (thyroliberinase) independent determinations. * Specific activities in pmoles hisproNH₂ / min / mg protein.

Figure legends

Fig.1. Serum PRL (upper panel) and mediobasal hypothalamic TRH levels (lower panel), from day 18 of pregnant rat (P), during lactation and at weaning (W). Number of rats are shown within the figure columns. The data represent the mean \pm SEM. Statistical significance, *: $p < 0.05$, ***: $p < 0.01$.

Fig.2. PVN TRH mRNA levels in day 18 of pregnancy (P), at 1, 5, 10 and 15 days of lactation and at weaning (W). A) representative samples of Northern blots from total RNA hybridized with TRH cDNA (upper panel) and its corresponding total RNA stained with ethidium bromide (lower panel). B) densitometric analyses of TRH mRNA adjusted per amount of ribosomal RNA. The data represent the mean of arbitrary units \pm SEM. Number of samples in the columns. Statistical significance, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.02$, ***: $p < 0.01$.

Fig.3. Hypothalamic TRH mRNA levels in cycling rats sacrificed between 14:00-15:00. D₁ = diestrous 1, D₂ = diestrous 2, P = proestrus, E = estrous. A) Representative samples of northern blots from cytoplasmic RNA hybridized with TRH cDNA (upper panel). Lower panel shows corresponding cytoplasmic RNA stained with ethidium bromide. B) densitometric analyses of TRH mRNA adjusted per amount of ribosomal RNA. Data (mean \pm SEM) are expressed in percentage of estrous values. Numbers of samples are shown in the columns. Statistical significance, *: $p < 0.05$.

Fig.4. Adenohypophysial PP II activity during the rat estrous cycle. Activity was measured between 10:00 and 11:00 and between 14:00 and 15:00. Data are the mean \pm SEM of the number of samples shown in columns. Statistical significance, *: $p < 0.05$.

References

- 1 Mori M, Yamada M: Thyroid hormones regulate the amount of thyrotrophin-releasing hormone in the hypothalamic median eminence of the rat. *J Endocrinol* 1987;114:443-448.
- 2 Arancibia S, Tapia-Arancibia L, Assenmacher I, Astier H: Direct evidence of short-term cold-induced TRH release in the median eminence of unanesthetized rats. *Neuroendocrinology* 1983;37:225-228.
- 3 Elkabes S, Loh YP: Effect of salt loading on proopiomelanocortin (POMC) messenger ribonucleic acid levels, POMC biosynthesis, and secretion of POMC products in the mouse pituitary gland. *Endocrinology* 1988;123:1754-1760.
- 4 Wilk S: Neuropeptide specific peptidase: Does brain contain a specific TRH degrading enzyme?. *Life Sci* 1986;39:1487-1492.
- 5 Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, and Denef C: Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotrophin-releasing hormone degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohypophyseal cells. *Endocrinology* 1990;127:1224-1233.
- 6 Segerson TP, Kauer J, Wolfe HC, Mobtaker H, Wu P, Jackson IMD, Lechan RM: Thyroid hormone regulates TRH biosynthesis in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Science* 1987;238:78-80.
- 7 Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P: Tissue-specific regulation of pyroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988;48:211-213.
- 8 Bauer K: Degradation and biological inactivation of thyrotrophin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie* 1988;70:69-74.
- 9 De Greef WJ, Plotsky PM, Neill JD: Dopamine levels in hypophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* 1981;32:229-233.
- 10 Leong DA, Frawley LS, Neill JD: Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann Rev Physiol* 1983;45:109-127.
- 11 Grosvenor CE, Mena F: Evidence that thyrotrophin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin the lactating rat. *Endocrinology* 1980;107:863-868.
- 12 Fink G, Koch Y, Aroya NB: Release of thyrotrophin releasing hormone into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res* 1982;243:186-189.
- 13 De Greef WJ, Visser TJ: Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J Endocrinol* 1981;91:213-223.
- 14 De Greef WJ, Voogt JL, Visser TJ, Lamberts SWJ, Van der Schoot P: Control of prolactin release induced by suckling. *Endocrinology* 1987;121:316-322.
- 15 Horn AM, Fraser HM, Fink G: Effects of antiserum to thyrotrophin-releasing hormone on the concentrations of plasma prolactin, thyrotrophin and LH in the pro-estrous rat. *J Endocrinol* 1985;104:205-209.

- 16 Rondeel JMM, De Greef WJ, Visser TJ, Voogt JL: Effect of suckling on the in vivo release of thyrotropin-releasing hormone, dopamine and adrenaline in the lactating rat. *Neuroendocrinology* 1988;48:93-96.
- 17 Sheward WJ, Fraser HM, Fink G: Effect of immunoneutralization of thyrotrophin-releasing hormone on the release of thyrotrophin and prolactin during suckling or in response to electrical stimulation of the hypothalamus in the anaesthetized rat. *J Endocrinol* 1985;106:113-119.
- 18 Covarrubias L, Uribe RM, Méndez M, Charli JL, Joseph-Bravo P: Neuronal TRH synthesis: developmental and circadian TRH mRNA levels. *Biochem Biophys Res Comm* 1988;151:615-622.
- 19 Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Wolf H, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH: Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* 1986;231:159-161.
- 20 Joseph-Bravo P, Charli JL, Palacios JM, and Kordon C: Effects of neurotransmitters on the in vitro release of immunoreactive thyrotropin releasing hormone from rat mediobasal hypothalamus. *Endocrinology* 1979;104:801-806.
- 21 Enjalbert A, Arancibia S, Ruberg M, Priam M, Bluet-Pajot MT, Rotsztein WH, Kordon C: Stimulation of in vitro prolactin release by vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology* 1980;31:200-204.
- 22 Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-275.
- 23 Simpson AA, Simpson MHW, Shina YN, Schmidt GH: Changes in concentration of prolactin and adrenal corticosteroids in rat plasma during pregnancy and

- lactation. *J Endocrinol* 1973;58:675-676.
- 24 Alzawa T, Greer MA: Delineation of the hypothalamic area controlling thyrotropin secretion in the rat. *Endocrinology* 1981;109:1731-1738.
- 25 Méndez M, Cruz C, Joseph-Bravo P, Wilk S, Charli JL: Evaluation of the role of prolylendopeptidase and pyroglutamyl peptidase I in the metabolism of LHRH and TRH in brain. *Neuropeptides* 1990;17:55-62.
- 26 Van Tol HMV, Bolwerk ELM, Liu B, Burbach JPH: Oxytocin and vasopressin gene expression in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat during the estrous cycle, pregnancy, and lactation. *Endocrinology* 1988;122:945-950.
- 27 Higuchi T, Tadokoro Y, Hondo K, Negoro H: Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J Endocrinol* 1986;110:251-257.
- 28 Grattan DR, Averill RLW: Effect of ovarian steroids on a nocturnal surge of prolactin secretion that precedes parturition in the rat. *Endocrinology* 1990;126:1199-1205.
- 29 Verdi JM and Campagnoni AT: Translational regulation by steroids. *J Biol Chem* 1990;265:20314-20320.
- 30 Mains RE, Dickerson IM, May V, Stoffers DA, Perkins AN, Ouafik L, Husten EJ, and Eipper BA: Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis. *Front in Neuroendoc* 1990;11:52-89.
- 31 Joseph-Bravo P, Charli JL, Covarrubias L: Metabolism of thyrotropin releasing hormone; in Velasco M, Israel A, Silva H (eds): *Recent advances in pharmacology and therapeutics*. New York, elsevier, 1989, pp 215-219.

- 32 Lee SL: Structure of the gene encoding rat thyrotropin-releasing hormone. *J Biol Chem* 1988;263:16604-16609.
- 33 Fukuda H, Ohshima K, Mori M, Kobayashi I, Greer MA: Sequential changes in the pituitary-thyroid axis during pregnancy and lactation in the rat. *Endocrinology* 1980;107:1711-1716.

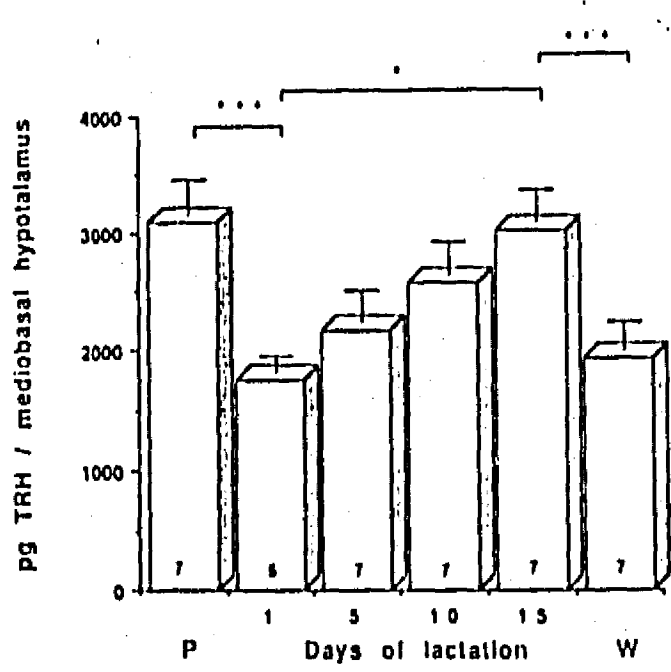
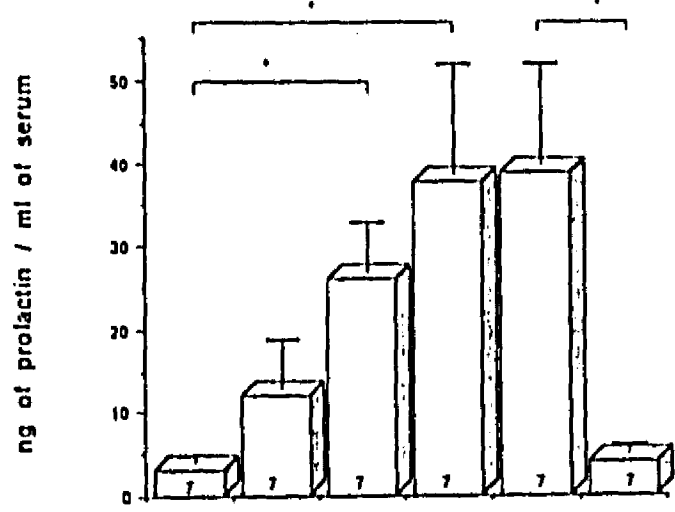


Fig. 2

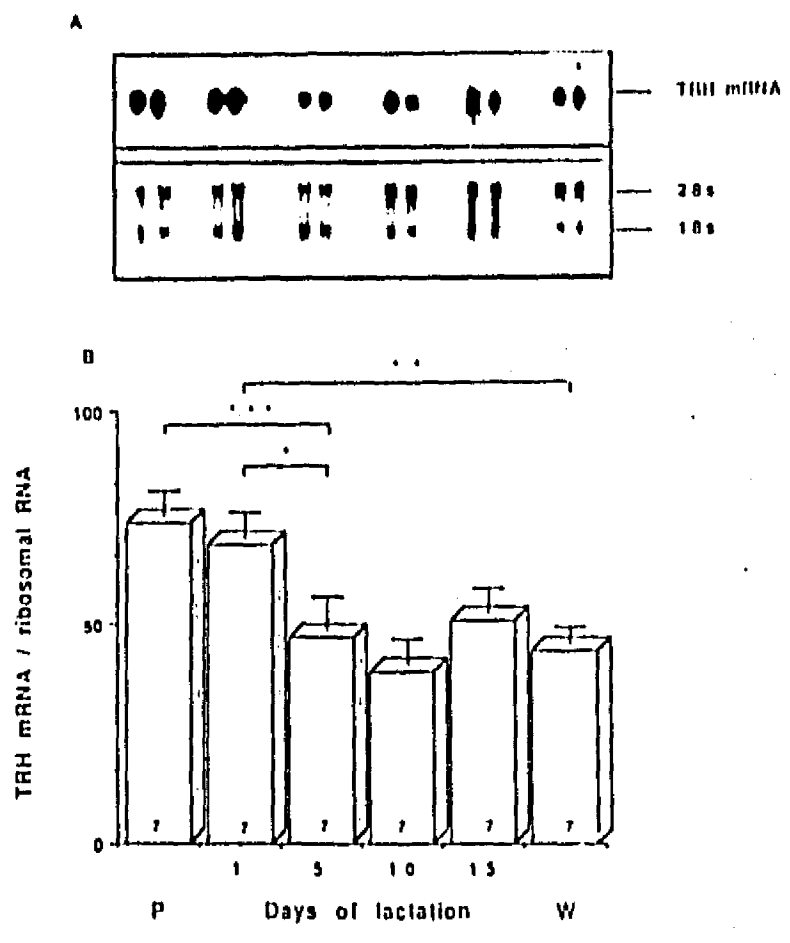


Fig. 3

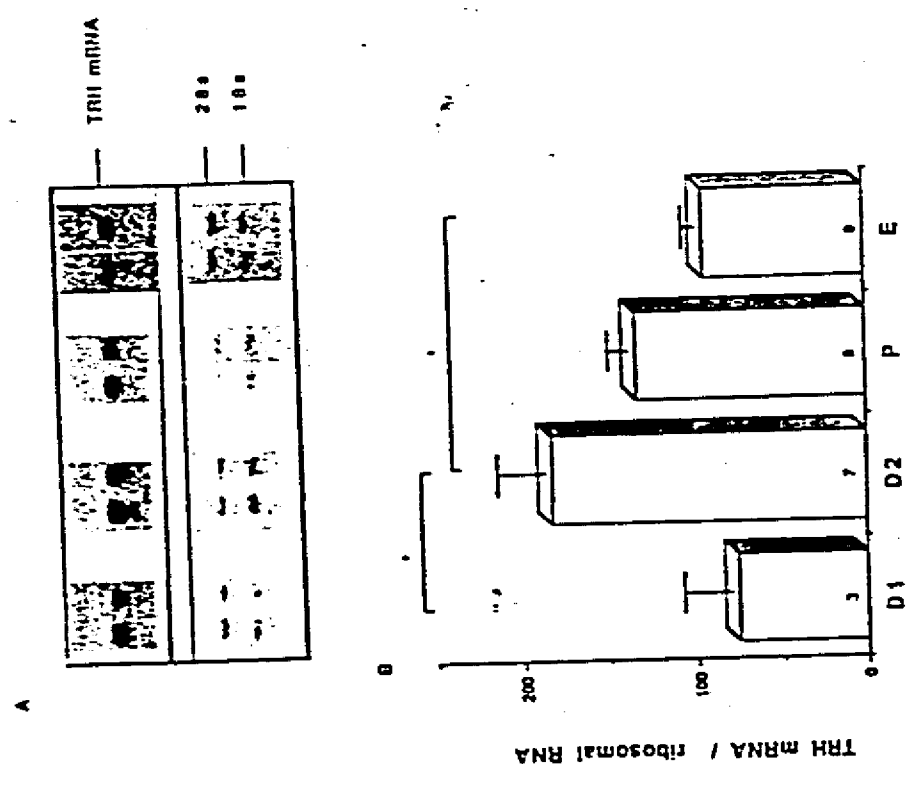


Fig. 4

