

03068

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS  
PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO DE LA UACFP DEL CCH

**ACTIVACION DE LOS CANALES DE CALCIO EN LA MEDIACION DE  
LA SECRECION POTENCIADA DE PROLACTINA: POSIBLE  
PARTICIPACION DE LA FOSFORILACION**

Tesis que para obtener el grado de  
Maestro en Ciencias Fisiológicas

Presenta la Bióloga  
María Elena Hernández Aguilar

ASESOR  
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

Estudio apoyado por el Consejo Nacional de Ciencia y  
Tecnología, Registro No. 55487, y por los Convenios de la  
Secretaría de Educación Pública, C89-07-0257, C90-07-0386, 91-07-  
30-001-286, C90-01-0393 y 91-01-30-001-836, Instituto de  
Neuroetología, Universidad Veracruzana, Xalapa, Ver.

México D.F.

Mayo 1993

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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

<b>RESUMEN</b>	i
<b>INTRODUCCION</b>	
<b>GENERALIDADES</b>	1
<b>REGULACION HIPOTALAMICA DE LA SECRECION DE PROLACTINA</b>	
Factores Inhibidores	3
Factores Estimuladores	5
Regulación Pleiotropica	7
<b>SEGUNDOS MENSAJEROS INVOLUCRADOS EN LA SECRECION DE PROLACTINA</b>	
Efecto de dopamina sobre la Adenilato Ciclasa/AMP cíclico	10
Efecto de dopamina sobre la Fosfolipasa C/fosfatos de inositol	11
Efecto de dopamina sobre los niveles de calcio	12
Efecto de la hormona liberadora de tirotropina sobre la fosfolipasa C/fosfatos de inositol	13
Efecto de la hormona liberadora de tirotropina sobre los niveles de calcio	14
<b>MODULACION DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE</b>	
Fosforilación	17
Dihidropiridinas	18
<b>OBJETIVO, HIPOTESIS Y ESTRATEGIA</b>	23
<b>RESULTADOS</b>	25
<b>DISCUSION Y CONCLUSIONES</b>	36
<b>BIBLIOGRAFIA</b>	44
<b>APENDICE 1</b>	57

## RESUMEN

La secreción de prolactina (PRL) por los lactotropos adenohipofisarios está regulada por factores hipotalámicos tanto del tipo estimulador como inhibidor. A la fecha, es ampliamente aceptado que la secreción de PRL está bajo una inhibición tónica ejercida principalmente por la dopamina (DA), mientras que su secreción es estimulada, entre otros factores, por la hormona estimulante de tirotropina (TRH).

Los estímulos tales como la succión, la estimulación vaginal y el estrés, y el aumento de los estrógenos en la tarde del proestro causan un importante aumento en la secreción de PRL. La succión induce a su vez, una disminución transitoria en la concentración de DA en sangre portal, lo cual resulta en dos efectos: 1) estimular directamente la secreción de PRL, y 2) potenciar el efecto estimulante de la TRH para secretar PRL. Los mecanismos intracelulares involucrados en este último evento se desconocen.

La potenciación de la secreción de PRL es consecuencia directa de la activación del sistema adenilato ciclasa/AMP cíclico. La activación de este sistema de transducción, resulta de una forma u otra en un incremento en la eficacia de la TRH para liberar PRL. Dado que el efecto secretor de la TRH involucra un incremento intracelular de calcio tanto de fuentes extra como intracelulares, la interacción entre la cascada evocada por la suspensión dopaminérgica y aquella evocada por la TRH podría ocurrir a nivel de los mecanismos responsables de incrementar los niveles de calcio intracelular, por ejemplo el inositol trifosfato y los canales de calcio. Trabajos realizados en células GH3, cardíacas y musculares han mostrado que los canales de calcio dependientes de voltaje o la subunidad  $\alpha$  de estos canales, son sustrato de cinasas dependientes de AMP cíclico, lo que resulta en un incremento en el tiempo de apertura del canal que se traduce en un aumento en el flujo de calcio del exterior al interior de la célula. La entrada de calcio extracelular al interior de la célula se prolonga también en el tiempo y como consecuencia, se obtiene una mayor respuesta por parte de la célula, es decir, la contracción muscular es más fuerte y la secreción de las hormonas es mayor.

Con base en estos antecedentes, nos planteamos la hipótesis de si la fosforilación de canales de calcio por cinasas dependientes de AMP cíclico, éstas activadas por la suspensión transitoria de DA, fuera reponsable, al menos en parte, de la potenciación del efecto secretor de la TRH. Para tal propósito, utilizamos como estrategia al activador de canales de calcio Bay K 8644 (una droga que pertenece al grupo de las dihidropiridinas y que se sabe se une a receptores localizados en la subunidad  $\alpha$  de los canales de calcio dependientes de voltaje, la cual tiene la propiedad de prolongar el tiempo de apertura de los canales de calcio, para simular farmacológicamente el efecto de la fosforilación de estos.

Los resultados obtenidos muestran que la administración de Bay K 8644 potencia la eficacia secretora de TRH en forma tanto o más intensa que el propio estímulo de suspensión dopaminérgica; y que ambos efectos son bloqueados por nifedipina y metoxiverapamil.

Estos resultados sugieren que la fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje, en respuesta a la suspensión de DA, posiblemente esté involucrada en la potenciación de la estimulación de la secreción de PRL por TRH en respuesta a esta señal.

# INTRODUCCION

## GENERALIDADES

La prolactina (PRL) es producida por un tipo de células conocidas con el nombre de lactotrofos, las cuales han sido identificadas en la adenohipófisis de todos los vertebrados. La PRL es una hormona proteica que está constituida aproximadamente por 198 aminoácidos, lo que la hace tener un peso molecular de alrededor de 23 kilodaltones (Nicoll, 1974). Esta hormona presenta tres asas formadas por enlaces disulfuro localizados en los residuos 4-11, 58-173 y 190-198, de tal manera que dan lugar a la formación de dos anillos cortos constituidos aproximadamente por 6 o 7 residuos de aminoácidos y uno grande que contiene 114 residuos.

Se han descrito 85 distintas funciones biológicas para PRL, las cuales se han subdividido en 7 grandes categorías: 1) Reproducción y lactancia; 2) balance de agua e iones; 3) crecimiento y morfogénesis; 4) metabolismo; 5) conducta; 6) inmunoregulación y, 7) efectos sobre el ectodermo y la piel (Rillema, 1980; Kelly et al., 1991). El efecto más estudiado, en los mamíferos, ha sido su acción sobre el desarrollo mamario y la secreción de leche. En la lactancia, la PRL es esencial para la sobrevivencia de la cría en la mayoría de los mamíferos, ya que después del nacimiento, estimula la secreción de la leche por la glándula mamaria. Durante este período, la secreción de PRL es mantenida por la succión que la cría realiza sobre el pezón de la madre. El impulso neural generado por la succión, es transmitido al sistema nervioso central, converge sobre neuronas hipotalámicas neurosecretoras hipofisiotrópicas, cuyos productos llegan a la adenohipófisis vía los vasos sanguíneos del sistema porta hipofisiario y, de esta manera, regulan la secreción de PRL.

En los mamíferos, la secreción de PRL está regulada por hormonas hipotalámicas tanto de tipo inhibitorio como estimulatorio, aunque su secreción está bajo una influencia generalmente de tipo inhibitorio. En este caso, la dopamina (DA)

parece ser el regulador fisiológico que inhibe dicha secreción; mientras que la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), entre otras, es considerada como la principal influencia fisiológica para estimular la secreción de la misma.

El estímulo de la succión induce una suspensión transitoria en el tono dopaminérgico portal y estimula la secreción de la TRH. Sin embargo, la secreción de PRL en respuesta a la succión no es explicada ni por la acción de factores facilitadores como la TRH ni por la suspensión de factores inhibidores como la DA, y ni siquiera, por la suma de ambos. En efecto, la secreción de PRL parece ser la resultante de una compleja interacción espacio temporal de ambas señales, en la cual la suspensión del tono inhibitorio dopaminérgico potencia la eficacia con la que la TRH estimula la secreción de la hormona.

A nivel celular, el efecto inhibitorio que la DA ejerce sobre la secreción de PRL esta mediado por receptores de tipo D2 acoplados negativamente al sistema de la adenilato ciclasa. Por su parte, la TRH estimula la secreción de PRL mediante la activación del sistema del calcio/cinasa C. La entrada de los iones calcio a los lactotrofos es indispensable para que se lleve a cabo la secreción de PRL. La regulación de la entrada de calcio al interior de la célula se dá a través de canales membranales de calcio. Asimismo, la TRH estimula la secreción de PRL al producir una depolarización membranar y activación de los canales de calcio dependientes de voltaje.

En otros sistemas, la fosforilación de canales de calcio dependientes de voltaje (tipo L), incrementa el tiempo de apertura de éstos, provocando que el flujo de calcio aumente. Esta situación en nuestro sistema de estudio tendría como resultado una secreción masiva de PRL, lo que podría explicar, al menos en parte, la potenciación de la acción de la TRH.

## REGULACION HIPOTALAMICA DE LA SECRECION DE PROLACTINA

### Factores inhibitorios

El control de la secreción de PRL, a diferencia de las otras hormonas secretadas por la adenohipófisis, involucra un mecanismo predominantemente inhibitorio (Talwalker et al., 1963). La secreción de PRL por los lactotrofos, es inhibida por la acción de factores hipotalámicos inhibitorios (PIFs) que llegan a la adenohipófisis a través del sistema porta hipofisiario (Ben-Jonathan, 1977; Gibbs y Neill, 1978). Entre las evidencias más directas que indican que la secreción de PRL está bajo un control inhibitorio se encuentran los estudios, algunos de ellos ahora clásicos, que muestran que la incubación de explantes de tejido hipofisiario (Talwalker et al., 1963), su transplante a un sitio distal a la influencia hipotalámica por ejemplo a la cápsula renal (Bishop, 1970; Chen et al., 1970); o la eliminación de las influencias hipotalámicas por la lesión eléctrica o mecánica de la eminencia media (Chen et al., 1970; Bishop, 1971; MacLeod, 1976; Neill, 1980), resultan en la hiper-secreción de PRL. Por el contrario, la administración de extractos hipotalámicos provoca una reducción en la concentración de PRL en suero (Grosvenor y Mena, 1980).

La eminencia media está ricamente inervada por neuronas que contienen catecolaminas, específicamente, de terminales nerviosas dopaminérgicas provenientes del sistema tuberoinfundibular (Reichlin, 1981; Everett, 1988) las cuales se encuentran adyacentes a los vasos portales (Hokfelt, 1967). Con el desarrollo de un radioinmunoensayo capaz de medir catecolaminas (Ben-Jonathan, 1978) en sangre portal en cantidades muy pequeñas (microlitros) de plasma, se pudo demostrar la presencia de concentraciones activas de DA en sangre portal en ratas y, además, aportó evidencia de que esta hormona tiene un papel muy importante en la regulación de la secreción de PRL. La concentración de DA en sangre portal es

aproximadamente de 2-3 ng/ml en la hembra en diestro, mientras que en los machos su concentración es aproximadamente 7 veces más baja (Gudelski, Nansel y Porter, 1981); estas concentraciones son suficientes para inhibir la secreción de PRL in vitro (Ben-Jonathan et al., 1977; Plotsky et al., 1978; Ben-Jonathan, 1980). Los niveles de esta catecolamina en sangre portal varían de acuerdo al ciclo estral (Ben-Jonathan, 1977; de Greef et al., 1984) de la rata. A lo largo de este período, los lactotrofos presentan cambios de sensibilidad y respuesta a la DA; es decir, muestran una menor sensibilidad durante el proestro, aumentando en el estro y el diestro (Brandt et al., 1990). La administración por 24 horas de 17  $\beta$ -estradiol disminuye significativamente la secreción de DA a sangre portal.

Por otro lado, la administración de agonistas dopaminérgicos inhiben la secreción de PRL por hipófisis en cultivo (Birge et al., 1970; MacLeod et al., 1970) y en animales intactos (Takahara et al., 1974). De acuerdo a todos estos resultados, se propusieron dos posibles mecanismos de acción para explicar el efecto inhibitorio de la DA sobre la secreción de PRL. Una de ellas involucra a receptores dopaminérgicos membranales (Caron et al., 1978). La segunda propone que la DA es internalizada en estrecha asociación con los gránulos secretorios (Nansel et al., 1979) al localizar DA marcada con tritio unida a gránulos secretorios en homogenados de hipófisis. Por esta información se ha propuesto que el efecto inhibitorio que la DA tiene sobre la síntesis y secreción de PRL no sólo es regulada por su unión a sus receptores membranales, sino también por su internalización y asociación con los gránulos de PRL (Nansel et al., 1979). Aunque la significancia funcional de la asociación de DA con los gránulos secretorios no es del todo entendida, esta posibilidad puede ser considerada. Sin embargo, este segundo mecanismo es aún oscuro, por lo que su efecto a nivel del receptor membranal es la más aceptada. En apoyo a este concepto, se encontró que la interacción de DA con sus receptores es saturable (35 nM), reversible y de alta afinidad y especificidad (Calabro y MacLeod, 1978). De acuerdo a criterios farmacológicos y

bioquímicos los receptores dopaminérgicos en lactotropos son de tipo D2 (Calabro y MacLeod, 1978) y están acoplados de forma negativa al sistema del AMP cíclico (Delbeke et al., 1986).

### **Factores estimuladores**

Aunque la evidencia antes mencionada apoya el concepto de que la mayor influencia que el hipotálamo ejerce sobre la secreción de PRL es de tipo inhibitorio, varios hallazgos sugieren también la existencia de un componente facilitador sobre la secreción de PRL. Las primeras observaciones que apuntan en esta dirección, provienen de los trabajos en los que la administración de extractos ácidos hipotalámicos de rata y bovinos, estimulan la formación de leche en ratas tratadas con estrógenos (ver Boyd et al., 1976). Este efecto fué denominado por Mishkinski y col. (1968) como la "actividad liberadora de PRL" de estos extractos. Sin embargo, este mismo autor cuestionó la efectividad de estos extractos para estimular la secreción de PRL, ya que el estres que se causa en el animal, al manipularse cuando se administran dichos extractos, pudiera ser capaz, por sí mismo, de estimular la lactancia en este mismo modelo animal. Este cuestionamiento, se desechó cuando Nicoll (1970) mostró que después de un período transitorio de inhibición de secreción de PRL, ésta podía ser estimulada por la administración de extractos hipotalámicos in vitro (ver Boyd et al., 1968). Los resultados obtenidos por Valverde y col. (1972), mostraron que la administración de extractos hipotalámicos ácidos o solubles en metanol equivalentes a 10 eminencias medias de rata y porcino, estimulan la concentración de PRL medible por radioinmunoensayo en ratas tratadas con estrógenos. Sin embargo, hasta ese momento aún no se respondía la naturaleza molecular de (los) factor(es) responsables de estimular dicha secreción. Al respecto, Tashjian y col. (1971) mostraron que la administración de TRH sintético a células tumorales de hipófisis de rata (células GH3) estimula la secreción de PRL. Más tarde, diversos investigadores pudieron mostrar que TRH es una hormona que presenta una capacidad muy alta para liberar PRL tanto en el hombre (Bowers et al., 1971) como en

la rata (Blake et al., 1974). Debido a estos resultados, se hizo necesario el determinar si el PRF encontrado en los extractos hipotalámicos era atribuible a su contenido de TRH. Para esto, Valverde y col. (1972), mediante la utilización de una cromatografía en sefadex, lograron separar tres fracciones con actividad secretora de PRL de extractos hipotalámicos de porcino, de los cuales dos de ellos eran diferentes a TRH. En estos mismos trabajos, estos autores descartaron la posibilidad de que TRH fuera el factor liberador de PRL porque al comparar su efecto, en dosis respuestas, con las otras dos fracciones obtenidas de los extractos hipotalámicos, observaron que éste no presentó efecto alguno sobre la secreción de PRL. De esta forma, ellos concluyeron que el factor liberador de PRL no es TRH. Sin embargo, los experimentos de inmunoensayo, realizados por Oliver y col. (1974), apoyan la posibilidad de que TRH sea el factor liberador de la secreción de PRL ya que muestran que el contenido de TRH en tejido hipotalámico presenta una concentración más grande que la que Valverde y col. (1972) estimaron por bioensayo (ver Boyd et al., 1972). La administración de cantidades crecientes de TRH en humanos, hasta una concentración aproximada de 10 µg, estimula la secreción de PRL. Esta evidencia favorece el papel fisiológico de TRH como regulador de la secreción de PRL (River y Vale, 1974). En ratas ciclantes la concentración de este tripéptido en sangre portal (Fink et al., 1982) es significativamente más alta durante la tarde del proestro que en los otros estadios del ciclo estral y parece ser responsable, al menos en parte, del pico de secreción de PRL (Harris et al., 1978). La administración de suero anti TRH (Koch et al., 1977; Horn, Fraser y Fink, 1985) tanto en machos como en hembras disminuye aproximadamente un 50% los niveles circulantes de PRL, y en ratas ciclantes, previene el pico de secreción de PRL del proestro. Estos hallazgos, también apoyan el papel fisiológico que TRH tiene como regulador de la secreción de PRL. Sin embargo, existen también datos negativos sobre la participación fisiológica de TRH en la regulación de la secreción de PRL basado tanto en la falta de acción del tripéptido como en estudios de inmunización

pasiva (Horn, Fraser, y Fink, 1985; Sheward, Fraser y Fink, 1985).

Paralelamente a estos resultados, se ha reportado que no sólo TRH sino que otros factores también pueden estimular la secreción de PRL. Dentro de estos factores podemos mencionar a los estrógenos (Lieberman et al., 1982), péptido intestinal vasoactivo (VIP, Gourdji et al., 1979), neurotensina, sustancia P, angiotensina II, colecistokinina, bombesina, oxitocina, serotonina, galanina, vasotocina, vasopresina, melatonina, histamina y bradiquinina (ver Ben-Jonathan et al., 1989). Sin embargo, para efectos de este trabajo, sólo nos centraremos en la interacción regulatoria de DA y TRH.

### **Regulación Pleiotropica**

Como ya se mencionó anteriormente, tanto DA como TRH participan en la regulación de la secreción de PRL. Sin embargo, varias observaciones muestran que la interacción entre estas dos neurohormonas ocurre de manera compleja y no se explica por la simple suma algebraica de sus acciones individuales.

Estímulos como la succión (Grosvenor y Mena, 1980), la estimulación cervical (deGreef y Neill, 1979) y el estrés y el aumento de los estrógenos durante la tarde del proestro producen un aumento en los niveles de PRL en sangre. Las propuestas más simples que tratan de explicar tal aumento incluyen: a) que dicho aumento es el resultado de un decremento en la secreción del factor inhibidor, en este caso DA; b) que dicho aumento es el resultado de un aumento en la secreción del factor estimulador (TRH) y c) que este es el resultado de la suma algebraica de los cambios en ambos factores (de Greef y Visser, 1981). La participación de ambos factores quedó de manifiesto en varios estudios. Neill (1972), Cramer y col (1979), Heiman y Ben-Jonathan (1982) y Pasqualini y col (1984) mostraron que en la tarde del proestro, etapa en la cual la concentración de estrógenos aumenta, los niveles de DA en sangre portal así como el número de receptores a DA, en los lactotrofos, disminuyen en correlación con el aumento en los niveles de PRL en sangre que llegan a 100 ng/ml, comparados con los

niveles encontrados en las etapas de estro y diestro, en los que su concentración alcanza niveles de 5-30 ng/ml respectivamente. Por otro lado, la estimulación cervical induce una reducción de aproximadamente 36% en los niveles de DA en sangre portal (de Greef y Neill, 1979). En ratas lactantes la separación de sus crías por 2-4 horas, se correlacionan con una disminución de PRL en suero y valores de DA en sangre portal de aproximadamente 5-6 ng/ml (Mena et al., 1976; Chiocchio et al., 1979; de Greef y Visser, 1981). La aplicación del estímulo de la succión por 5-30 minutos a hembras separadas de sus crías por 8 horas, produce una disminución en la concentración de DA en hipotálamo a niveles de aproximadamente 0.8 ng/mg de tejido (Mena et al., 1976; Chiocchio et al., 1979), lo que se correlaciona con aumentos de hasta 14 veces en los niveles de PRL en suero (Blake, 1974; Fagin et al., 1981). La estimulación eléctrica de un nervio mamario en ratas lactantes (Mena et al., 1982), lo que simula al estímulo de la succión, produce resultados semejantes en cuanto a la secreción de PRL (de Greef y Visser, 1981). Bajo estas condiciones, se encontró que dicho estímulo disminuye los niveles de DA en sangre portal por aproximadamente 3-5 minutos después del inicio del estímulo (Plotsky, y Neill, 1982). Sin embargo, esta disminución transitoria en la concentración de DA en sangre portal no explica la elevación tan marcada y sostenida que se da en la concentración circulante de PRL, ya que la simulación de este perfil dopaminérgico a través de la infusión de DA exógena a ratas tratadas con  $\alpha$ -metil-p-tirosina, aumenta solamente 1.5 veces los niveles de PRL en sangre periférica y sólo por un tiempo limitado. En conclusión, la sola disminución transitoria de la concentración portal de DA no explica el aumento en PRL circulante (deGreef, Plotski y Neill, 1981). La explicación que se dió a estos resultados, es que la disminución en la concentración de DA en sangre portal es parte integral de un mecanismo complejo que puede incluir a otras hormonas hipotalámicas y que da lugar a la secreción masiva de PRL (Grosvenor y Mena, 1980; deGreef, Plotsky y Neill, 1981). En vista de estos resultados, se pone de relieve la hipótesis originalmente planteada

por Grosvenor y Mena (1980) que habían demostrado que un breve período de succión supuestamente actuando a través de una disminución en el tono dopaminérgico, aumentaba significativamente la eficacia secretora tanto de la TRH como de extractos hipotalámicos con actividad de PRF (factor liberador de prolactina; Grosvenor y Mena, 1980).

Esta hipótesis se sustentó en una serie de observaciones, entre las que se incluyen las siguientes: deGreef y col. (1984) mostraron que los niveles inmunoreactivos de TRH en sangre portal aumentan de valores de 5.3 a 8.7 ng/ml en respuesta al estímulo de la succión. Tanto en ratas (Burnet y Warkeley, 1976) como en monos rhesus (Norman, 1980) no succionados, la administración de TRH (100 ng) no produce un incremento significativo en los niveles de PRL en sangre. De esta forma, el incremento dramático de PRL que se da en sangre en respuesta a la succión no parecía ser explicado sólo por el aumento en los niveles de TRH en sangre portal (deGreef y Visser, 1981). En confirmación a esta hipótesis de Grosvenor y Mena (1980), la administración de TRH (100ng) tanto en animales a los que la infusión de DA se reduce en un 50% por 15 minutos (deGreef y Visser, 1981) o en aquellos donde la infusión de DA se suspende por 5 minutos (Fagin y Neill, 1981, Plotsky y Neill, 1982), produce un aumento en los valores de PRL en sangre periférica de 172 a 492 ng/ml. Así, se establece que la breve disminución en la secreción de DA por la estimulación nerviosa o por la succión, aumenta significativamente la efectividad de TRH para liberar PRL.

El efecto de la potenciación del TRH sobre la secreción de PRL que se da en respuesta a la suspensión transitoria de DA in vivo, ha sido confirmado tanto en hipofisis en cultivo (Fagin y Neill, 1981) como en células adenohipofisiarias dispersas (Martínez de la Escalera, 1988). En este último caso, se utilizaron células adenohipofisiarias de ratas lactantes y de ratas tratadas con estrógenos. Cabe mencionar, que este efecto parece ser exclusivo para TRH, ya que la acción secretora del péptido intestinal vasoactivo (VIP) no es potenciada (Martínez de la Escalera y

Weiner, 1988). Debido a esta circunstancia, todos estos resultados llevaron a pensar que la interacción de estas cascadas secretoras es específica a ciertos sistemas de transducción.

## **SEGUNDOS MENSAJEROS INVOLUCRADOS EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA**

La evidencia presentada en los apartados anteriores, muestra que tanto DA como TRH participan de manera importante en la regulación de la secreción de PRL. Ahora enfocaremos la atención hacia los mecanismos intracelulares utilizados por estos dos factores hipotalámicos.

La regulación de la secreción de PRL por los factores hipotalámicos DA y TRH, es realizada mediante su unión a receptores específicos localizados en la membrana plasmática del lactotrofo. De forma general, se ha observado que la interacción de DA con su receptor membranal suprime la secreción de PRL, al inhibir tanto la activación de la adenilato ciclasa como la de la fosfolipasa C e impedir la movilización de calcio intracelular y la internalización del mismo al evitar la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje.

### **Dopamina y su efecto sobre AMP cíclico**

Se ha reportado que los receptores a DA caracterizados como D2 en el lactotrofo (Kebabian y Calne, 1979), están acoplados de forma negativa al sistema del AMP cíclico (Barnes et al., 1978; Sweenen et al., 1982), es decir, inhiben a la enzima adenilciclase (Calabro y MacLeod, 1978; Caron et al., 1978; Davis y Sheppard, 1986). Adenohipófisis de ratas hembra (Kimura, 1976; Ray y Wallis, 1981),

adenomas humanos (de Camilli y Macconi, 1979; Shettini et al., 1983) y células 7315a (células tumorales adenohipofisarias generadas por el tratamiento con trimetilalanina, que tienen la capacidad de secretar ACTH y PRL), presentan receptores a DA que están acoplados negativamente al sistema de la adenilato ciclasa. El tratamiento de todas ellas con DA, reduce la actividad de la adenilato ciclasa y el contenido de AMP cíclico (Tan y Dannies, 1981) en condiciones basales y este es estimulado por la administración de fluoride o forskolina (esta última activa a la adenilato ciclasa vía la subunidad catalítica y la subunidad regulatoria; deCamilli, Macconi y Spada, 1979; Canonico et al., 1983; Ray et al., 1986). En forma paralela, la suspensión aguda de DA a células que estuvieron bajo un efecto inhibitorio tónico, produce un aumento en los niveles de AMP cíclico que se correlacionan directamente con un aumento en la concentración de PRL secretada (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988).

#### **Dopamina y su efecto sobre los fosfatos de inositol**

Los receptores dopaminérgicos en lactotropos también están acoplados de forma negativa al sistema de la fosfolipasa C como se ha mostrado tanto en condiciones in vivo como in vitro (Canonico et al., 1983). La administración aguda de DA a fragmentos adenohipofisarios, impide la incorporación de fosfato marcado cuando fueron estimulados con TRH. Lo que sugiere que la DA no sólo inhibe la secreción de PRL al suprimir la actividad de la adenilato ciclasa, sino que también es mediado por la inactivación de la hidrólisis de los fosfatos de inositol (Journet et al., 1987). Simultáneamente, la suspensión aguda de la DA, por períodos cortos de tiempo, resulta en un incremento en la concentración de fosfatos de inositol al mismo tiempo que hay una disminución en la concentración de fosfoinosítidos de membrana (Martínez de la Escalera et al., 1987; Martínez de la Escalera y Weiner, 1988). Sin embargo, estos mismos autores no observaron alguna disminución en

la formación de fosfatos de inositol por la administración aguda de DA, esto los llevo a sugerir que el efecto de DA ocurre mediante el impedimento de la formación de los fosfatos de inositol sin tener efecto sobre la concentración de los mismos una vez que estos han sido formados. Lo que confirma resultados previos obtenidos por Canonico y col (1986) donde observan que la DA es incapaz de reducir la producción de fosfatos de inositol durante períodos cortos de estimulación con TRH. Todos estos resultados, en conjunto, sugieren que la suspensión de DA activa a la fosfolipasa C, la que a su vez, promueve la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana.

### **Dopamina y calcio**

La incubación de la hipófisis o de células adenohipofisiarias dispersas en medio libre de calcio o en presencia de bloqueadores de canales de calcio disminuye sustancialmente la secreción de PRL (Albert y Tashjian, 1984; Gershergon y Thaw, 1985). Inversamente, la administración de ionóforos de calcio o la adición de un activador de canales de calcio aumentan la secreción de prolactina (Enyeart, Aizawa y Hinkle, 1985).

Se ha mostrado que la DA inhibe la secreción de PRL, al menos en parte, al impedir la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior de la célula (Login et al., 1985; Malgaroli et al., 1987). Una disminución en la concentración de  $Ca^{2+}$  se observa cuando los lactotopos de bovino son incubadas en la presencia de DA, al producir una caída en la fluorescencia por quin 2 (indicador fluorescente de la concentración de calcio intracelular; Schofield, 1983). Por otro lado, la DA produce un efecto hiperpolarizante en la membrana del lactotopo, de tal forma que provoca que los potenciales de membrana no se generen (Israel et al., 1985; Ingram et al., 1986). Como consecuencia a esta hiperpolarización, los canales de calcio dependientes de voltaje (VOCC) no se activan y, de esta forma, impiden la entrada de  $Ca^{2+}$  extracelular al espacio intracelular

(Ingram et al., 1986). La utilización de bromocriptina, un agonista dopaminérgico, también contribuye a la inhibición de la secreción de PRL al evitar la apertura de los canales VOCC. El efecto estimulante de la suspensión de DA se acompaña por una captura de  $^{45}\text{Ca}^{2+}$  y por una elevación de 3-4 veces en la secreción de PRL (Schrey, Clark y Franks, 1986). La utilización de pimozide, un antagonista dopaminérgico tipo D2, permite la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  al producir un efecto depolarizante en la membrana (Enyeart y col (1986) estimulando de esta forma, la secreción de PRL. Así, estas observaciones son consistentes con la propuesta que DA regula la secreción de PRL mediante la modificación de la concentración de calcio intracelular (Schrey, Clark y Franks, 1986).

#### **Hormona Liberadora de Tirotropina**

La ocupación por TRH de sus receptores membranales promueve la hidrólisis del fosfatidil inositol 1,4-bisfosfato (PIP2), reacción catalizada por la fosfolipasa C para formar inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DG; Berridge, 1987). La participación de los fosfatos de inositol sobre la secreción de PRL fué inicialmente estudiada mediante el registro de la incorporación de fósforo radiactivo ( $^{32}\text{P}$ ) durante la hidrólisis de los PIP2, por la aplicación de angiotensina (Canonic et al., 1985; Canonic y MacLeod, 1986) o bombesina (Sutton y Martin, 1982). Bajo estas condiciones, se encontró la incorporación del isótopo radiactivo durante la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana. Un incremento en la incorporación del material radiactivo en aproximadamente el 100% se observa a los 20 minutos después de adicionar a la TRH en el medio (Sutton y Martin, 1982; Martin, 1984; Martin et al., 1986). La aplicación de los análogos de TRH como N-metil histidine, pGlu-His-Pro-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>NH<sub>2</sub> y deamido-TRH producen los mismos efectos que TRH (Sutton y Martin, 1982). Estos resultados indican que el receptor a TRH está acoplado al sistema

de los fosfolípidos de membrana. Aunque se ha observado que el efecto estimulante que TRH tiene sobre la secreción de PRL requiere calcio (Martin y Kowalchuk, 1984), el efecto de hidrólisis y marcaje de los fosfolípidos no requiere de calcio, ya que dicho efecto no fué abolido por la utilización de bloqueadores de canales de calcio. Esto sugiere que el efecto estimulante de TRH acopla la participación de calcio de manera más tardía a la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana (Sutton y Martin, 1982). Los estudios realizados por estos mismos autores reproducen el efecto de TRH sobre la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana mediante la utilización de mioinositol tritiado (Martin, 1986). En conjunto, estos resultados indican que TRH rápidamente causa la activación de la fosfolipasa C y utiliza este sistema de transducción para estimular la secreción de PRL.

#### **TRH y Calcio**

El mecanismo de estimulación de la secreción de PRL por TRH ha sido estudiada extensivamente tanto en lactotropos normales (Merritt et al., 1984; Tan y Tashjian, 1984) como en células GH (Rebbechi y Gershergon, 1983; Kolesnick y Gershengorn, 1986; PrysorJones et al., 1987). La unión de TRH a sus receptores membranales activa toda una serie de eventos que se inician con la hidrólisis del fosfatidilinositol 4,5-bifosfato mediante la activación de la fosfolipasa C. La reacción catalizada por esta enzima lleva a un incremento inmediato (segundos), de la concentración de inositol trifosfato y 1,2-diacilglicerol, que sirven como mediadores intracelulares o segundos mensajeros, para traducir y amplificar la señal que dá lugar a una respuesta celular. Posteriormente, se produce una elevación en la concentración de calcio libre intracelular (Thorner et al., 1980; Geshengorn, 1982; Geshengorn y Thaw, 1983) en principio por la movilización de calcio de almacenes intracelulares (presumiblemente de retículo endoplásmico) en el cual interviene inositol trifosfato (Guillemette et al., 1987) y,

posteriormente por el paso de calcio extracelular a través de canales de calcio localizados en la membrana celular de los lactotropos (Albert y Tashjian, 1984). En esta respuesta también participa la activación de la proteína cinasa C (PKC) por el diacilglicerol y la activación y translocación de la proteína cinasa C por la TRH (Drust y Martin, 1985).

El efecto estimulador que TRH tiene sobre la secreción de PRL es dependiente de la concentración de calcio intracelular. Esta dependencia quedó demostrada en aquellos experimentos en los que las células GH se incubaron en presencia de EGTA (Albert y Tashjian, 1984), en presencia de bloqueadores de canales de calcio (Ozawa y Kimura, 1982) o en ausencia de calcio extracelular (Gershengor y Thaw, 1985). Bajo estas condiciones, el efecto estimulante que la TRH tiene sobre la secreción de PRL es completamente eliminado. Basados en estas observaciones, más tarde se encontró que en células GH, la TRH produce un efecto bifásico sobre la concentración de calcio intracelular. Inmediatamente después de administrar TRH, hay un aumento en la concentración de calcio intracelular bastante pronunciado que declina rápidamente a niveles basales en aproximadamente 8 segundos (fase de pico), seguido de un nuevo aumento menos pronunciado que el primero y se mantiene elevado y constante por un período de aproximadamente 12 minutos (fase de meseta; Albert y Tashjian, 1984; Geshengorn y Thaw, 1985). Para el caso de la primera elevación de calcio intracelular, se ha sugerido que esta se da por la redistribución de calcio de almacenes intracelulares (Geshengorn, 1985), mientras que la segunda se asocia con la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje (Albert y Tashjian, 1984; Geshengorn y Thaw, 1985). Estas observaciones se basan en el hecho de que el tratamiento de estas células con EGTA o bloqueadores de canales de calcio eliminan la presencia de la fase de meseta mientras que la fase de pico se reduce en un 30-40%. Estos resultados sugieren que la fase de pico es mediada por la participación de calcio de almacenes intracelulares, mientras que la fase de meseta depende de la presencia de calcio extracelular

(Albert y Tashjian, 1984; Geshengor y Thaw, 1985). Además, se encontró que este patrón bifásico en el aumento de la concentración de calcio intracelular, se correlaciona con un patrón bifásico en la secreción de PRL (Albert y Tashjian, 1984; Martin y Kowalchyk, 1984; Aizawa y Hinkle, 1985, 1986). La presencia de la primera fase de secreción de PRL, depende principalmente de la movilización de calcio de almacenes intracelulares (Martin y Kowalchyk, 1984), que en este caso parece ser realizado por el inositol trifosfato (Gershengon, Thaw y Gerry, 1983), mientras que la segunda fase depende de la presencia de calcio extracelular. Una de las pruebas que apoyan que la TRH promueve la secreción de PRL mediante la regulación de la concentración de calcio intracelular a expensas de calcio extracelular, es aquella en que la secreción de PRL es suprimida por el tratamiento con cobalto y verapamil (Tan y Tashjian, 1984). En este sentido, diacilglicerol parece tener un papel importante (Martin y Kowalchyk, 1984) ya que como se sabe es el responsable de activar a la PKC, la que a su vez es la encargada de fosforilar canales de calcio dependientes de voltaje. De manera paralela, los estudios electrofisiológicos realizados en lactotropos (Bials et al., 1977) o en las líneas celulares GH han mostrado que estas son eléctricamente excitables y son capaces de generar potenciales de acción (Dubinsky y Oxford, 1984; Tan y Tashjian, 1984; Schlegel et al., 1987). Se ha propuesto que TRH promueve la secreción de PRL en las células GH3, al provocar una depolarización en la membrana celular. Dicha depolarización provoca la generación de potenciales de acción, y como consecuencia se activan canales de calcio dependientes de voltaje. Estudios contrarios a los reportados con TRH se obtienen al aplicar en el medio de incubación al inhibidor hipotalámico DA. Los estudios electrofisiológicos muestran que DA produce un efecto hiperpolarizante sobre la membrana celular (Israel y Vincent, 1987), teniendo los mismos resultados cuando se trabaja con el agonista dopaminérgico RU26926. El caso contrario se obtiene con el tratamiento con antagonistas dopaminérgicos haloperidol y spiperone (Israel y Vincent, 1987).

## MODULACION DE LOS CANALES DE CALCIO DEPENDIENTES DE VOLTAJE

### Fosforilación

El paso de los iones calcio a través de los canales (Hagiwara y Ohmori, 1982), depende de dos mecanismos principales: 1) la activación de estos canales por cambios de voltaje en la membrana celular (Reuter, 1983; Armstrong y Matteson; 1985; Armstrong y Eckert, 1987) y 2) por cambios conformacionales en el canal inducidos por la fosforilación de una de las subunidades que componen el canal de calcio (Josephson et al., 1990). Armstrong y Eckert (1987) demostraron que los canales de calcio activados por voltaje, o las moléculas cercanas que se encuentran asociadas a estos canales, pueden ser fosforiladas (Murphy y Tuana, 1989) para que los canales se abran cuando la membrana es depolarizada. Bajo estas condiciones, se ha observado que las corrientes de calcio están incrementadas debido a que el canal de calcio está más tiempo abierto (Reuter, 1983; Josephson y Sperelakis, 1991).

Estudios electrofisiológicos han mostrado que la actividad de los canales de calcio puede ser modulada in vivo por la fosforilación por cinasas dependientes de AMP cíclico (Curtis et al., 1985). Recientemente, se ha mostrado que las cinasas dependientes de AMP cíclico o cinasa A, fosforilan canales de calcio en células GH3 (Armstrong y Eckert, 1987), cardíacas (Sperelakis y Wahler, 1988) y musculares aunque con esto no se puede descartar la participación de otras cinasas (Lai et al., 1990). Estudios bioquímicos han establecido que la subunidad alfa del canal de calcio, contiene un sitio de fosforilación dependiente de AMPc, el cual también es sensible a proteasas y fosfatasas. Hosey y col. (1986 y 1989) y Armstrong y Eckert (1987) han propuesto que la defosforilación de este sitio inactiva el canal y produce una pérdida irreversible de la actividad del mismo, y se ha

propuesto que los residuos de serina y treonina en la subunidad alfa 1 son el sitio más rápidamente fosforilado por cinasas dependientes de AMP cíclico, en condiciones in vitro (Amstrong y Eckert, 1987). Como en el caso de las células cardíacas, la fosforilación del canal de calcio del músculo esquelético, vía una proteína cinasa dependiente de AMPc, incrementa la probabilidad de apertura del canal de calcio (Lazdunski et al., 1988). Cuando los canales de calcio del músculo esquelético fueron purificados y reconstituidos (Curtis y Catterall, 1986) en bicapas o vesículas de fosfolípidos, la fosforilación por la proteína cinasa dependiente de AMPc en las subunidades alfa 1 y beta, activó corrientes de calcio, lo que demostró que la fosforilación en estas subunidades es suficiente para regular la actividad del canal de calcio en estas células y en las células GH3 (Taraskevich y Douglas, 1978; Dufy et al., 1979; Taraskevich y Douglas, 1980).

## Dihidropiridinas

El término "antagonistas de calcio" fué uno de los primeros utilizados para aquellas drogas que interfieren con la contracción del músculo cardíaco o esquelético, al impedir la entrada de calcio al interior de la célula. Otros términos que también han sido utilizados para tratar de explicar la acción de estas drogas han sido: "bloqueadores de calcio", "bloqueadores de la entrada de calcio", "drogas que bloquean el canal de calcio" o "inhibidores de canales de calcio". De acuerdo a la definición que implica cada uno de éstos términos, se ha propuesto que el término "antagonistas de canales de calcio" sea utilizado sólo para aquellas drogas que tienen una acción farmacológica más amplia que la de prevenir sólo la entrada de calcio al interior de la célula (Triggle y Agrawal, 1982); por ejemplo, que inhiba el efecto de calcio por actuar sobre proteínas que se unen al ión. Por tal motivo, todas aquellas drogas que inhiban a los canales de calcio localizados en la membrana celular, pueden ser referidos como

inhibidores de canales. Dentro de este grupo, se pueden incluir al verapamil, a las 1,4-dihidropiridinas (1,4-DHP) y al diltiazem.

El sitio de acción de estas drogas parece ser la membrana celular, pero aún no se sabe si la interacción de estas drogas es realizada directamente sobre las proteínas que conforman a los canales, o es mediante la modificación de otras proteínas que se encuentran en asociación con las del canal. Los estudios electrofisiológicos han mostrado el modo de acción de estas drogas.

Por convención la activación de los canales de calcio se ha subdividido para su estudio en tres estados consecutivos para la conducción de iones: a) el estado de reposo, en el cual el canal está disponible a la activación; b) el estado abierto, en el que el canal está conduciendo iones y, c) el estado inactivado, en el que el canal está en un estado cerrado pero sin estar disponible a la activación. Se ha mostrado que tanto verapamil como D600, bloquean los canales de calcio después de que ellos están en el estado abierto así como en el estado inactivado, incrementando su grado de bloqueo dependiendo de la frecuencia con que la membrana es depolarizada. En contraste, nitrendipina bloquea los canales no sólo en estos estados, sino también en el estado de reposo, y diltiazem inhibe futuras corrientes de calcio cuando el canal ha pasado al estado inactivado. Sin embargo, a pesar de tener esta información, aún es necesario realizar más estudios que traten de responder, de mejor forma, la selectividad que tiene cada una de estas drogas para inhibir la actividad del canal de calcio (Janis y Scriabine, 1983).

En contraste con las dihidropiridinas referidas, existen otras con efecto opuesto, es decir activadoras de canales de calcio. A través del registro de la actividad de los canales de calcio, utilizando la técnica de patch clamp, tanto CGP 28392 como Bay K 8644 muestran un efecto positivo sobre la conductancia de calcio y consecuentemente sobre la contracción del músculo cardíaco, es decir, cambia la cinética de activación del canal, por lo que prevalece un incremento en el tiempo de apertura del mismo (Kokubun y Reuter, 1984). Una hipótesis que se propuso para tratar de

explicar dicho efecto, propone que la capacidad de estas drogas para incrementar el tiempo de apertura del canal (asi como de los inhibidores para disminuirlo), radica en la presencia de sitios activos en el canal (Gunter et al., 1984). De estos dos sitios, uno es responsable de la apertura del canal y el otro del cierre. Así, si una DHP tiene alta afinidad por el sitio de apertura, bajas concentraciones de la misma provocan un incremento en el tiempo de apertura del mismo, mientras que altas concentraciones tendrán el efecto opuesto al activar el segundo sitio de acción. Esta propuesta se apoya en los resultados obtenidos cuando se administran concentraciones mayores a 10  $\mu\text{M}$  de Bay K 8644. Bajo estas condiciones se observa una disminución en el flujo de  $45\text{Ca}^{2+}$  (Enyeart, Aizawa y Hinkle, 1986) en lactotropos. Para los bloqueadores de canales de calcio, se propone que estos son inhibidores sobre los dos sitios de acción del canal, de tal forma que cuando la concentración de estos inhibidores aumenta, se produce más rápidamente el cierre del canal de calcio. Otro tipo de clasificación utilizado para tratar de explicar el modo de acción de estas drogas, involucra el comportamiento de la compuerta (gating), es decir, la tendencia de que el canal permanezca abierto (tiempo) o cerrado. Así, se le llama modo cero o modo nulo a aquel canal que fué incapaz de abrirse; modo uno donde el tiempo de apertura del canal es corto y se cierra rápidamente, y, modo dos donde la probabilidad de que el canal permanezca abierto es alta a potenciales de activación relativamente pequeños (Nowycky, Fox y Tsien, 1985).

En vista de todos estos resultados, la utilización de estas drogas, es bastante común en estudios relacionados con la regulación de la concentración de calcio intracelular a expensas de calcio extracelular, como responsable de la neurosecreción, contracción muscular o secreción de hormonas. Para el caso de las células musculares esqueléticas y cardíacas, se ha encontrado que Bay K 8644 aumenta la fuerza de contracción del músculo (Enyeart y Hinkle, 1984; Bossorto, 1985). La neurosecreción y secreción, por ejemplo, es bastante favorecida en presencia de Bay K 8644. En el

ganglio de la raíz dorsal del pollo, Bay K 8644 favorece el comportamiento del tipo dos, es decir, incrementa el tiempo de apertura del canal.

Uno de los primeros trabajos que mostraron que Bay K 8644 tiene un efecto positivo sobre la secreción de PRL fué realizado por Enyeart y Hinkle (1985). En este trabajo, los autores muestran que Bay K 8644 incrementa la cantidad de hormona secretada de una manera dependiente de la dosis. A una concentración de 10  $\mu\text{M}$ , Bay K 8644 produjo un incremento de hasta 300% en la secreción de PRL cuando las células son depolarizadas con concentraciones altas de potasio, ya que sin depolarización Bay K 8644, por si mismo, no tiene efecto alguno sobre la movilización de calcio intracelular y la secreción de PRL (Enyeart y Hinkle, 1985). Además, mostraron que la nimodipina inhibe la secreción de PRL estimulada por Bay K 8644 de una manera aparentemente competitiva tanto en células GH3 como en las GH4C1 y, en el caso de las lactotropos normales, la concentración requerida para inhibir la secreción de PRL es más baja que para el caso de los otros tipos celulares.

En vista de esto, es claro que desde el punto de vista de la función, que la dihidropiridina como Bay K 8644 tiene un efecto análogo al descrito para la fosforilación de los canales de calcio. Por esta razón, Bay K 8644 es de gran utilidad para estudios que traten de explicar la regulación de la secreción de PRL por los factores hipotalámicos como son DA y TRH (Aizawa y Hinkle, 1985).

Recapitulando sobre el efecto que la TRH tiene sobre la secreción de PRL, se ha especulado que la cantidad de PRL que es secretada por los lactotropos depende directamente de los niveles de calcio intracelular. Estos niveles, que serían principalmente regulados por el influjo de calcio extracelular, aumentan durante los potenciales de acción. Usando la técnica de registro intracelular, se ha mostrado que la frecuencia de los potenciales de acción aumenta cuando se administran pequeñas cantidades de TRH (Ozawa y Kimura, 1979; Kaczorowski et al., 1983). Esto sugiere que TRH puede estimular la secreción de PRL en las células GH3, al modular la frecuencia de los potenciales de acción (Ozawa y Kimura,

1979; Kaczorowski et al., 1983). Este aumento en la frecuencia de las depolarizaciones en la membrana, trae como consecuencia la apertura de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que permitiría que calcio extracelular entrase a la célula (Kidokoro, 1975). Resultados contrarios a los reportados con TRH se obtienen al aplicar en el medio de incubación al inhibidor hipotalámico DA. Los estudios electrofisiológicos muestran que DA produce un efecto hiperpolarizante sobre la membrana celular (Israel y Vincent, 1987). Además, se encontró que el efecto estimulante producido por el Bay K 8644 sobre la secreción de PRL, inducida por altas concentraciones de potasio, es completamente inhibido cuando las células son tratadas con DA (Enyeart et al., 1987). Los estudios electrofisiológicos realizados en canales de calcio reconstituídos en bicapas mediante la aplicación de Bay K 8644 (1  $\mu$ M) y en presencia de ATP, mostraron que esta droga, aparte de promover la apertura del canal en el modo 2, también puede tener un efecto al disminuir la defosforilación del canal (ver Armstrong et al., 1987). Esto podría explicar el porque la estimulación de la corriente de calcio por Bay K 8644 y los agonistas  $\beta$ -adrenérgicos juntos pueden producir un efecto aditivo en las células musculares cardíacas ya que uno reduce el índice de defosforilación del canal, mientras que el otro estimula el índice de fosforilación del mismo (Armstrong et al., 1987); aunque esta propuesta aún permanece a ser discutida.

## OBJETIVO, HIPOTESIS Y ESTRATEGIA

### Objetivo

El objetivo principal de este trabajo es determinar cuales son los mecanismos intracelulares involucrados en potenciar la acción estimulante de la TRH cuando hay una suspensión transitoria del tono dopaminérgico.

### Hipótesis

Por tal motivo, la hipótesis que se planteó es que la suspensión transitoria de DA activa a los canales de calcio a la apertura, por la fosforilación de una de las proteínas del canal mediada por cinasas dependientes de AMP cíclico, de tal manera que cuando TRH estimula la apertura de los canales de calcio mediante la depolarización membranal, la corriente de calcio aumenta debido a que los canales de calcio están fosforilados. Es decir, hay un incremento en el tiempo de apertura del canal de calcio y, como consecuencia, se produce una entrada masiva de  $Ca^{2+}$  y la consecuente potenciación en la secreción de PRL (ver fig 1)

### Estrategia

En vista de esto, se utilizó al activador de canales de calcio Bay K 8644 debido a que tiene la propiedad de incrementar el tiempo de apertura del canal de forma análoga al efecto previamente descrito de la fosforilación. Esta droga pertenece al grupo de las dihidropiridinas que se sabe son potentes moduladores de los canales de calcio activados por voltaje (Enyeart y Hinkle, 1985). Los estudios que se han realizado con ella, han mostrado que se une a receptores localizados en la subunidad  $\alpha$  del canal (Amstrong y Eckert, 1987). La unión de este activador con sus receptores, provoca un incremento en el tiempo de apertura del canal (Hess et al., 1984) de la misma forma como lo realiza la fosforilación. En otras palabras, se ha observado que esta droga altera la cinética

y cambia la dependencia de voltaje de la compuerta lo que se ve reflejado en cambios de las corrientes macroscópicas de calcio (Josephson y Speralakis, 1990). Para evitar el desencadenamiento de toda la cascada de eventos que se da normalmente dentro de la célula cuando se suspende a la DA y aislar solamente el efecto sobre los canales de calcio, esta droga se administró en presencia tónica de DA para ver si su aplicación junto con TRH produce el mismo efecto que se dá cuando se suspende transitoriamente a la catecolamina, y de esta manera, tratar de mostrar la participación de la fosforilación de los canales de calcio sobre la secreción potenciada de PRL.

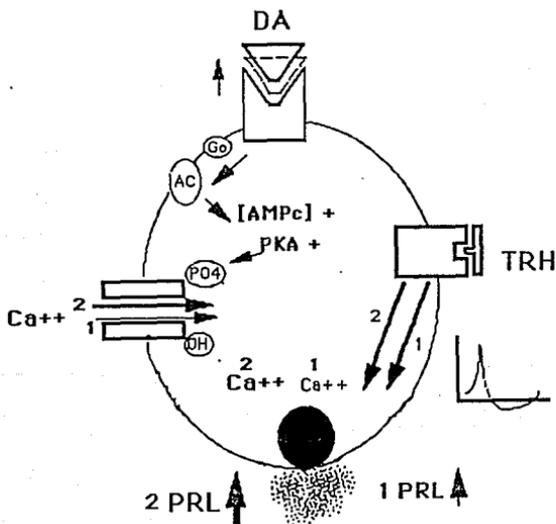


Fig. 1.- Esquema que muestra la hipótesis planteada en el trabajo de tesis. Go= Proteína G; DA= Dopamina; AC= Adenilato ciclasa; AMPc= AMP cíclico; PKA= Proteína Kinasa A; TRH= Hormona liberadora de tirotrópina; PO4= Grupo fosfato; OH= Grupo oxidrililo; PRL= Prolactina; Ca++= ión calcio.

## RESULTADOS

Como se mencionó previamente, la secreción potenciada de PRL que se da en respuesta a TRH después de un período transitorio de suspensión dopaminérgica, es la resultante de una compleja interacción espacio temporal entre la cascada evocada por la suspensión transitoria del tono dopaminérgico y aquella evocada por la TRH. La información transmitida por estas dos vías de segundos mensajeros, convergen en un punto donde se regulan los mecanismos responsables de incrementar los niveles de calcio intracelular, por ejemplo el inositol trifosfato y los canales de calcio. Así, en este trabajo se propone que la fosforilación de los canales de calcio es el mecanismo involucrado en potenciar la capacidad de TRH para secretar PRL (ver fig. 1).

Para abordar la pregunta planteada en el trabajo de tesis, es necesario el utilizar cultivos celulares de lactotopos para poder diseccionar el efecto de la suspensión de DA sobre: 1) la capacidad estimuladora de la TRH para secretar PRL y, 2) mostrar que la fosforilación de los canales de calcio es el mecanismo responsable de dar lugar a la secreción potenciada de PRL.

Los experimentos se realizaron sobre cultivos celulares de lactotopos enriquecidos. Cada experimento se realizó en tres períodos consecutivos de 30 minutos cada uno y con seis grupos experimentales. Así, el primer período (0-30 minutos) consistió en mantener a todos los grupos celulares en presencia tónica de dopamina; en el segundo período (30-60 minutos) se suspendió a la DA (-DA) por 30 minutos y en este mismo período se administró al activador de canales de calcio Bay K 8644 (10  $\mu\text{M}$ ) y, en el tercer período (60-90 minutos) se reincorporó la DA a los grupos que carecieron de ella en el período anterior (30-60 minutos) y se administró TRH (1  $\mu\text{M}$ ) a grupos que: a) estuvieron en presencia tónica de DA (TRH+DA), b) que carecieron de DA en el segundo período (-DA) y, c) a células que estuvieron en presencia tónica de DA y con el activador de canales de calcio Bay K 8644 (DA+BAY+TRH), este último grupo imitaría la respuesta de potenciación que se da

por la suspensión transitoria de DA.

Para mostrar que la fosforilación de los canales de calcio es uno de todos los mecanismos intracelulares que está participando en la secreción potenciada de PRL, se utilizaron los bloqueadores de canales de calcio nifedipina (10  $\mu\text{M}$ ) y metoxiverapamil (10  $\mu\text{M}$ ) ya que como se ha mostrado en otros trabajos, estos bloqueadores actúan reduciendo el tiempo de apertura del canal, que reproduce el efecto que se observa cuando un canal de calcio se encuentra en un estado desfosforilado. Así, estas drogas se administraron en el tercer período de experimentación, ya que es en este período en donde se observa la potenciación. Los resultados que se presentan más adelante, corresponden a la medición por radioinmunoensayo (RIA) del tercer período de experimentación (60-90 minutos). El coeficiente de variación intraensayo fué de 3% y el interensayo fué de 8%. Estos resultados fueron sometidos a la prueba estadística t de Student y a la prueba de Análisis de Varianza. La significancia se marca con: \* =  $p < 0.05$  con respecto a su grupo control (dopamina tónica = DA) \*\* =  $p < 0.05$  con respecto al grupo con dopamina tónica mas TRH (DA+TRH) (para mayores detalles ver apéndice 1).

Efecto de la suspensión de DA sobre la secreción de PRL inducida por TRH. Los resultados de la segunda figura muestran que los niveles de PRL son semejantes a los encontrados en el grupo control (células en presencia tónica de DA) posterior a la reincorporación de DA en el tercer período a células que en período anterior carecieron de DA (-DA), lo que demuestra que el efecto bloqueador que DA tiene sobre la secreción de PRL, se recupera muy rápidamente al agregar a la catecolamina al medio nuevamente. La administración de TRH, en el tercer período, a células que estuvieron en presencia tónica de DA, estimula significativamente la secreción de PRL comparada con su grupo control (DA; \* =  $p < 0.05$ ). Mientras que la administración del mismo junto con DA, a células que en el período anterior carecieron de la misma, muestran una secreción de PRL significativamente mayor cuando se compara tanto con su grupo control como con el grupo de DA tónica (DA+TRH; \*\* =  $p < 0.05$ ), es

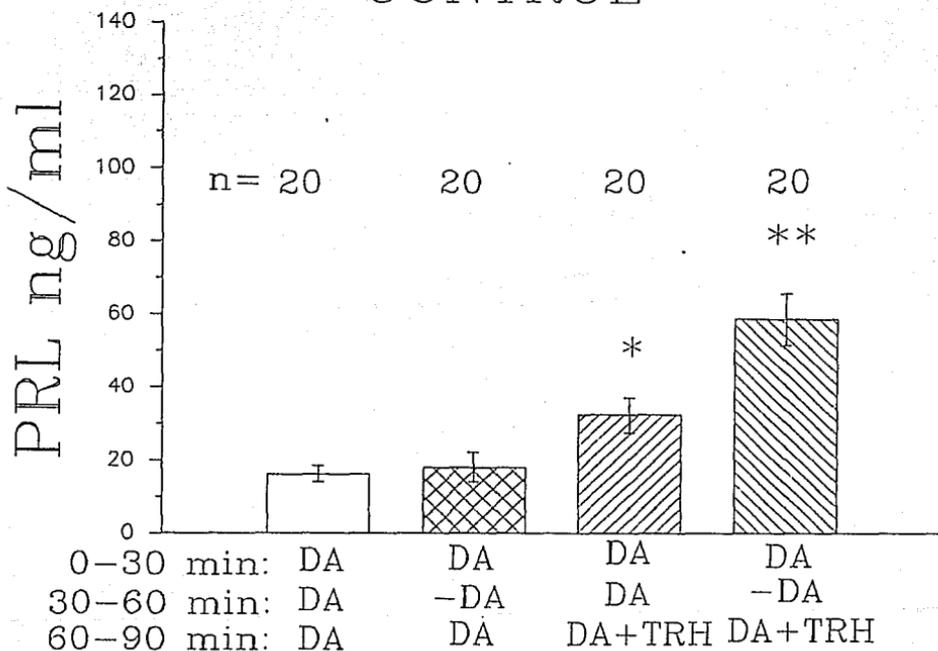
decir, el efecto de la TRH se potencia cuando fué precedido de una suspensión transitoria del tono dopaminérgico.

Efecto de la administración del activador de canales de calcio Bay K 8644 sobre la secreción de PRL inducida por TRH. La figura tres muestra que la administración del activador de canales de calcio BayK 8644 a células que estuvieron en presencia tónica de DA (DA+BAY), por sí sola no estimula la secreción de PRL. Nuevamente, la administración de TRH a células con DA tónica (DA+TRH), estimula significativamente la secreción de PRL cuando se compara con el grupo control (DA; \*  $=p<0.05$ ). Sin embargo, su efecto se ve potenciado cuando se administra a células que en el período inmediato anterior estuvieron en presencia del activador de canales de calcio Bay K 8644 (DA+BAY+TRH). Así, el efecto de la TRH es estadísticamente significativo cuando se compara con su grupo control (DA; \*  $=p<0.05$ ) o con el grupo que tuvo dopamina y TRH (DA+TRH; \*\*  $=p<0.05$ ). Incluso, la secreción de PRL que se obtuvo bajo estas condiciones, fué mucho mayor que la obtenida cuando se suspendió a la dopamina y se administró TRH (fig. 2).

Como se muestra en la figura, la utilización del activador de canales de calcio Bay K 8644 suplanta la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de DA.

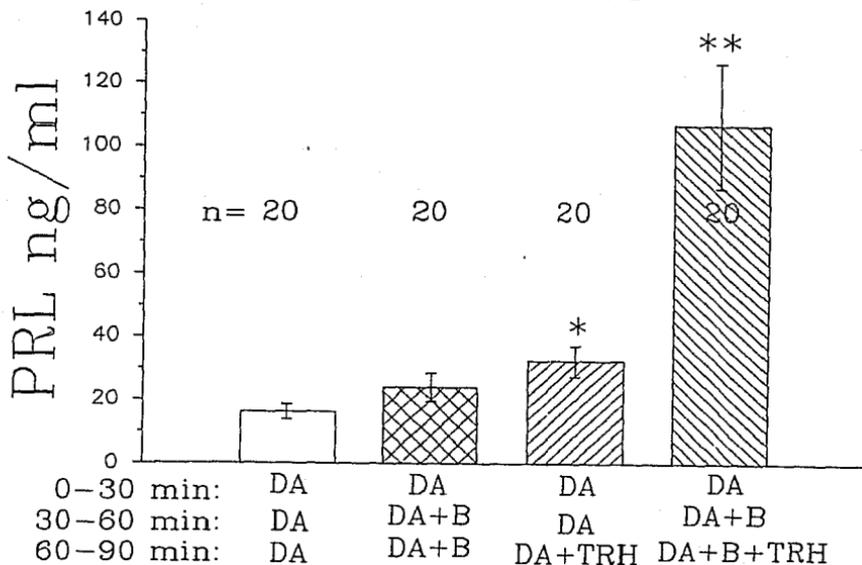
Efecto de la administración del bloqueador de canales de calcio Metoxiverapamil sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de DA. Como se muestra en la figura cuatro, la administración de 10  $\mu\text{M}$  de metoxiverapamil (una droga que pertenece al grupo del las fenilalquilamidas) inhibe completamente la secreción de PRL inducida por la administración de TRH tanto a células que estuvieron en presencia tónica de DA (DA+TRH) como en aquellas que carecieron de la misma en el período anterior. Los valores que se obtuvieron en todos los grupos fueron similares al los del grupo control (DA).

# CONTROL



**FIG. 2.-** Secreción potenciada de prolactina por TRH (100 nM) en respuesta a la suspensión transitoria de DA. La figura muestra la secreción de prolactina del tercer período de experimentación (60-90 minutos) de cultivos celulares primarios, preincubados por toda la noche con dopamina (500 nM). Las células fueron obtenidas de ratas tratadas con estrógenos por 30 días. Se sembraron  $3.3 \times 10^5$  células por pozo. Los valores se muestran como la media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado cada uno. DA= dopamina; -DA= suspensión de dopamina; TRH= hormona liberadora de tirotropina; PRL= prolactina; \* = diferencias significativas con respecto a su control [presencia tónica de DA (DA);  $p < 0.05$ ] y \*\* = diferencias significativas con respecto al grupo con dopamina tónica más TRH (DA+TRH;  $p < 0.05$ ).

## BAY K 8644



**FIG. 3.-** Secreción potenciada de PRL inducida por TRH (100 nM) en respuesta a la administración del activador de canales de calcio Bay K 8644 (10  $\mu$ M). La figura muestra la secreción de prolactina del tercer período de experimentación (60-90 minutos) de cultivos celulares primarios, preincubados por toda la noche con dopamina (500 nM). Las células se obtuvieron de ratas tratadas con estrógenos por 30 días. Se sembraron  $3.3 \times 10^5$  células por pozo. Los valores se muestran como la media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado cada uno. DA= dopamina; -DA= suspensión de dopamina; TRH= hormona liberadora de tirotrópina; B= bayk 8644; PRL= prolactina; \* = diferencias significativas con respecto a su control [presencia tónica de DA (DA);  $p < 0.05$ ] y \*\* = diferencias significativas con respecto al grupo con dopamina tónica más TRH (DA+TRH;  $p < 0.05$ ).

# METOXIVERAPAMIL

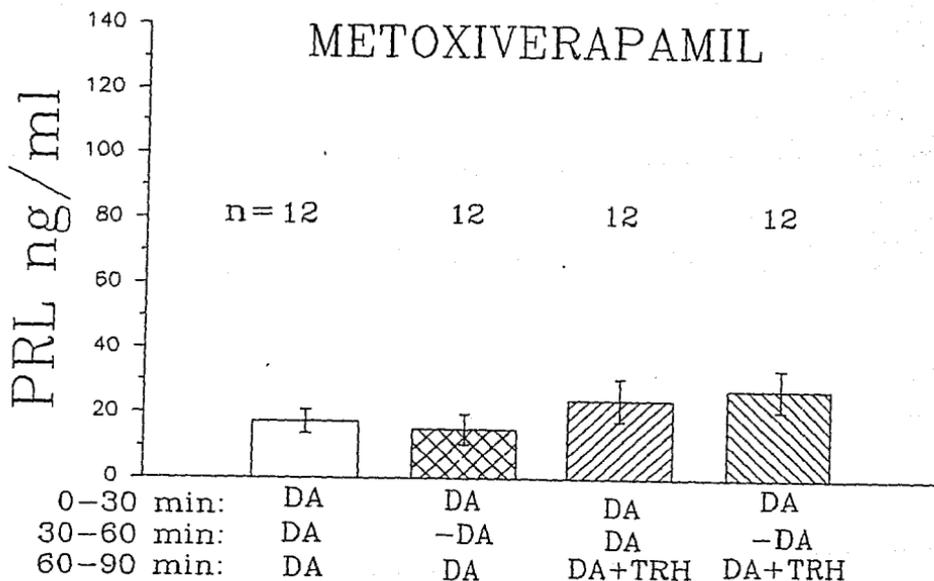


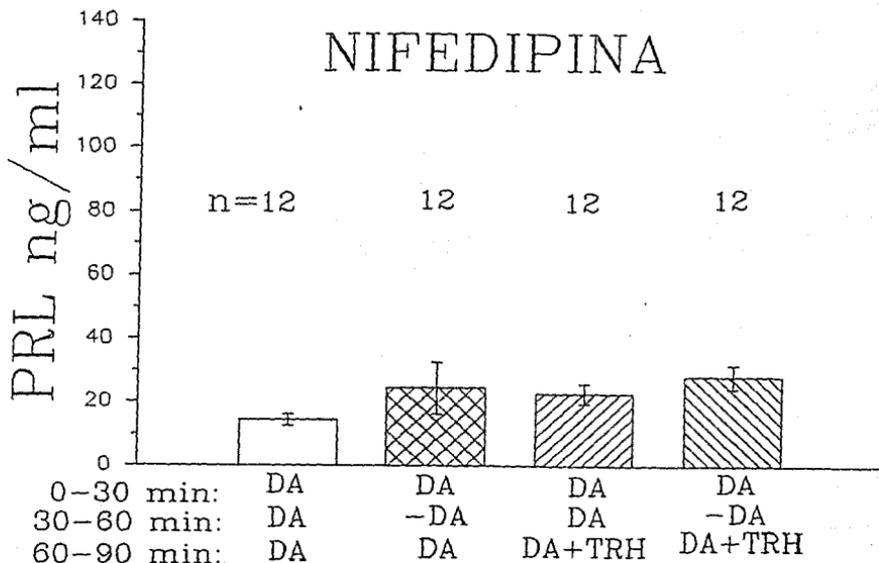
FIG. 4.- Bloqueo por Metoxiverapamil (10  $\mu$ M) sobre la secreción potenciada de prolactina inducida por la suspensión transitoria de dopamina. La figura muestra la secreción de prolactina del tercer período de experimentación de cultivos celulares primarios, preincubados por toda la noche con dopamina (500 nM). Las células se obtuvieron de ratas tratadas con estrógenos por 30 días. Se sembraron  $3.3 \times 10^5$  células por pozo. Los valores se muestran como la media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado cada uno. DA= dopamina; -DA= suspensión de dopamina; TRH= hormona liberadora de tirotropina; PRL= prolactina; \* = diferencias significativas con respecto a su control [presencia tónica de DA (DA);  $p < 0.05$ ] y \*\* = diferencias significativas con respecto al grupo con dopamina tónica más TRH (DA+TRH;  $p < 0.05$ ).

Efecto de la administración del bloqueador de canales de calcio Nifedipina sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión transitoria de dopamina. En la figura cinco, se muestra que la administración de 10  $\mu\text{M}$  de nifedipina (una droga que pertenece al grupo de las dihidropiridinas) bloquea completamente la secreción de PRL estimulada por TRH tanto en células que estuvieron en presencia tónica de DA (DA+TRH) como en aquellas que carecieron de la misma en el período anterior. Los valores que se obtuvieron en todos los grupos fueron semejantes a los del grupo control (DA).

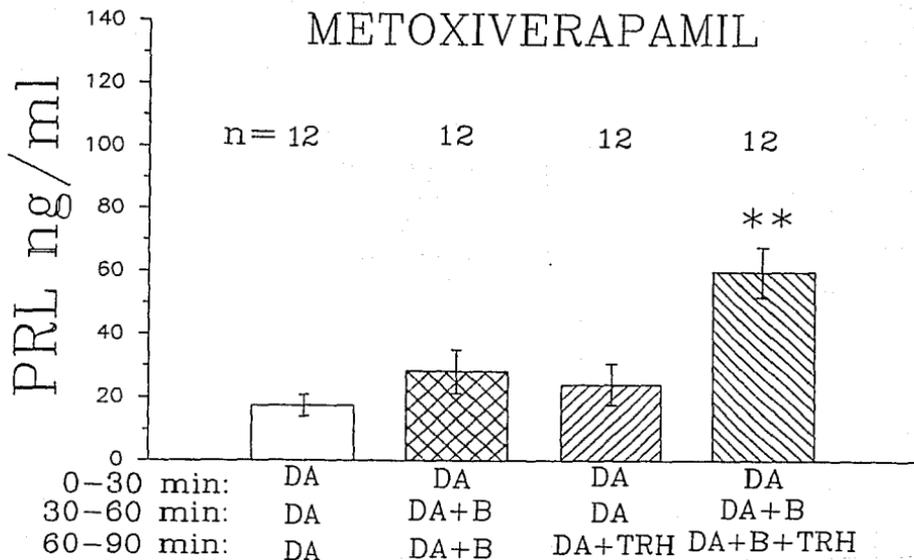
Efecto de la administración del bloqueador de canales de calcio Metoxiverapamil sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la administración del activador de canales de calcio Bay K 8644. En la figura seis, se muestra el efecto que la administración de 10  $\mu\text{M}$  de metoxiverapamil tiene sobre la secreción de PRL. Como se puede observar, la administración del bloqueador inhibe completamente la secreción de PRL inducida por la administración de TRH a células que estuvieron en presencia tónica de DA (DA+TRH), los valores que muestran son semejantes a los del grupo control y no son estadísticamente significativos. La administración de 10  $\mu\text{M}$  del mismo bloqueador a células que estuvieron en presencia del activador de canales de calcio Bay K 8644 y de TRH (DA+BAY+TRH), no inhibe completamente la secreción de PRL inducida por estos dos secretagogos, ya que la secreción presentada por este grupo, aún sigue siendo estadísticamente significativa cuando se compara tanto con el grupo control (DA; \* = $p < 0.05$ ) como con aquel que estuvo con DA y TRH (DA+TRH; \*\* = $p < 0.05$ ). Una posible explicación a este resultado puede darse por el hecho de que a concentraciones equimolares tanto del activador de canales de calcio Bay K 8644 como del bloqueador de canales de calcio metoxiverapamil, el efecto de éste último no es lo suficiente como para impedir completamente la secreción de la hormona. Sin embargo, se puede decir que la respuesta de secreción en presencia de estos secretagogos es

disminuida, ya que esta no fué tan grande como la que se obtuvo cuando dicho bloqueador no estuvo presente (ver fig. 2).

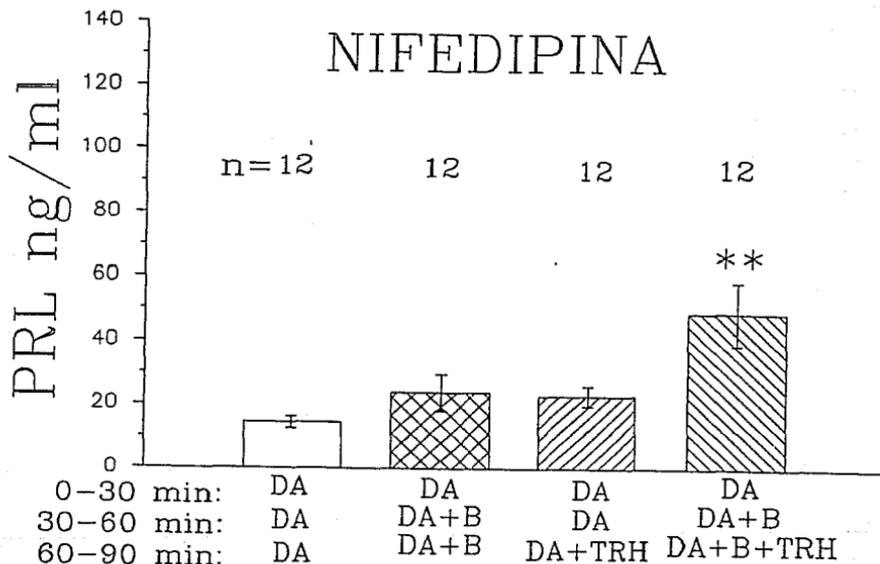
Efecto de la administración del bloqueador de canales de calcio Nifedipina sobre la secreción potenciada de PRL inducida por la administración del activador de canales de calcio Bay K 8644. Como se muestra en la figura siete, la administración de  $10 \mu\text{M}$  de nifedipina inhibió completamente la secreción de PRL inducida por la adición de TRH a células que estuvieron en presencia tónica de DA (DA+TRH) ya que sus valores son semejantes a los del grupo control (DA). Sin embargo, la administración del mismo bloqueador (a la misma concentración) a células que estuvieron en presencia de DA y del activador de canales de calcio Bay K 8644 (DA+BAY+TRH), no bloqueó completamente la secreción de PRL inducida por estos dos secretagogos, ya que el valor obtenido en este grupo fué estadísticamente significativo cuando se comparó tanto con el grupo control (DA; \*  $=p<0.05$ ) o con aquel que sólo estuvo en presencia de DA y TRH (DA+TRH; \*\*  $=p<0.05$ ). Aunque la secreción de PRL no fué bloqueada completamente en presencia de estos dos secretagogos, su secreción fué disminuída, ya que si se compara con aquel que careció del bloqueador la respuesta obtenida aquí es menor (ver fig. 2). En este caso, también podemos decir que concentraciones equimolares tanto del activador como del bloqueador, no son lo suficiente como para que este último inhiba completamente la secreción de PRL.



**FIG. 5.- Bloqueo de Nifedipina (10  $\mu$ M) sobre la secreción potenciada de prolactina inducida por la suspensión transitoria de dopamina.** La figura muestra la secreción de prolactina del tercer período de experimentación (60-90 minutos) de cultivos celulares primarios, preincubados por toda la noche con dopamina (500 nM). Las células se obtuvieron de ratas tratadas con estrógenos por 30 días. Se sembraron  $3.3 \times 10^5$  células por pozo. Los valores se muestran como la media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado cada uno. DA= dopamina; -DA= suspensión de dopamina; TRH= hormona liberadora de tiotropina; PRL= prolactina; \* = diferencias significativas con respecto a su control [presencia tónica de DA (DA);  $p < 0.05$ ] y \*\* = diferencias significativas con respecto al grupo con dopamina tónica más TRH (DA+TRH;  $p < 0.05$ ).



**FIG. 6.-** Decremento por Metoxiverapamil (10  $\mu$ M) sobre la secreción potenciada de prolactina inducida por la suspensión transitoria de dopamina. La figura muestra la secreción de prolactina del tercer período de experimentación (60-90 minutos) de cultivos celulares primarios, preincubados por toda la noche con dopamina (500 nM). Las células se obtuvieron de ratas tratadas con estrógenos por 30 días. Se sembraron  $3.3 \times 10^5$  células por pozo. Los valores se muestran como la media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado cada uno. DA= dopamina; -DA= suspensión de dopamina; TRH= hormona liberadora de tirotropina; PRL= prolactina; \* = diferencias significativas con respecto a su control [presencia tónica de DA (DA);  $p < 0.05$ ] y \*\* = diferencias significativas con respecto al grupo con dopamina tónica más TRH (DA+TRH;  $p < 0.05$ ).



**FIG. 7.-** Decremento por Nifedipina (10  $\mu$ M) sobre la secreción potenciada de prolactina inducida por la suspensión transitoria de dopamina. La figura muestra la secreción de prolactina del tercer periodo de experimentación de cultivos celulares primarios, preincubados por toda la noche con dopamina (500 nM). Las células se obtuvieron de ratas tratadas con estrógenos por 30 días. Se sembraron  $3.3 \times 10^5$  células por pozo. Los valores se muestran como la media  $\pm$  error estándar de cinco experimentos independientes con determinaciones por cuadruplicado cada uno. DA= dopamina; -DA= suspensión de dopamina; TRH = hormona liberadora de tirotrópina; PRL= prolactina; \* = diferencias significativas con respecto a su control [presencia tónica de DA (DA);  $p < 0.05$ ] y \*\* = diferencias significativas con respecto al grupo con dopamina tónica más TRH (DA+TRH;  $p < 0.05$ )

## DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo se investigaron los mecanismos intracelulares involucrados en producir una secreción potenciada de PRL en respuesta a estímulos naturales entre los que destaca la succión.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran, indirectamente, que la fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje podría ser un punto de convergencia de la información que se transmite por dos de los factores superiores de control, es decir, la suspensión transitoria de DA así como la información transmitida por la TRH, y cuya interacción resulta en la potenciación de la secreción de PRL.

Los estudios realizados en ratas lactantes indican que la secreción masiva de PRL que se da por la aplicación del estímulo de la succión, no se explica por la sola disminución transitoria del tono dopaminérgico. Sin embargo, esta disminución es parte integral de un mecanismo complejo que incluye la participación de otras hormonas hipotalámicas que dan lugar a dicha respuesta. El breve decremento en la concentración de DA en sangre portal que ocurre como una respuesta temprana a diversos estímulos secretores de PRL, potencia la eficacia de factores hipotalámicos facilitadores entre los que se encuentra la TRH, para estimular la secreción de PRL (Grosvenor y Mena, 1980).

Los resultados obtenidos en este trabajo, muestran que la efectividad de TRH para estimular la secreción de PRL aumenta como consecuencia de una interrupción breve y transitoria de la concentración dopaminérgica en el medio que baña a las células (figura 1). Estos resultados confirman aquellos obtenidos anteriormente en ratas lactantes in vivo (Grosvenor y Mena, 1980; deGreef y Visser, 1981) y en condiciones in vitro (Fagin y Neill, 1981; Martínez de la Escalera y Weiner, 1988).

Los estudios encaminados a analizar las vías de señalamiento transmembranal, indican que la disociación momentánea de DA de sus

receptores activa tanto a la adenilato ciclase como a la fosfolipasa C, y como consecuencia, se produce un incremento en los niveles de AMP cíclico y de los fosfatos de inositol (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988). Por otro lado, la acción estimulante de la TRH parece ser mediada por la activación del sistema del calcio y de la fosfolipasa C, enzima encargada de hidrolizar a los fosfoinosítidos de membrana para generar inositol 1,4,5-trifosfato (IP3) y diacilglicerol (DG). Resultados previos obtenidos en este laboratorio, han mostrado que la secreción potenciada de PRL por la TRH, que se da en respuesta a la suspensión transitoria de DA, es específica para la activación del calcio y de la vía de la fosfolipasa C y no para la de la adenilato ciclase. Así, el efecto potenciado de la TRH se reproduce cuando en lugar de ésta se administra el ionoforo de calcio A23187 y/o TPA (activador de la proteína cinasa C) después de una breve suspensión del tono dopaminérgico (Martínez de la Escalera, Gutrie y Weiner, 1988). Esta secreción potenciada de PRL no se obtiene cuando se administra al VIP, 8-Br-AMP cíclico o forskolina después de suspender transitoriamente al inhibidor dopaminérgico (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988). Sin embargo, tanto el VIP como los agonistas y activadores del AMP cíclico son capaces de potenciar la eficacia de la TRH en forma análoga a la producida por la suspensión del tono dopaminérgico (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988).

La importancia de los iones calcio para la secreción hormonal ha sido ampliamente establecida. Su participación como regulador de la secreción de hormonas, ha sido estudiada en células secretoras como aquellas de las glándulas salivales, de la médula adrenal y de la glándula hipófisis, entre muchas otras. La unión de la TRH a sus receptores membranales produce un aumento en la concentración de calcio intracelular tanto en células GH3 (Tan y Tashjian, 1984; Geshengorn; Thaw, 1985) como en células adenohipofisiarias normales (Scherey et al., 1986). Esta respuesta se da de forma bifásica donde la primera fase obedece a la movilización de calcio de almacenes intracelulares mediado por IP3 (Albert y Tashjian, 1984;

Guillemette et al., 1987), mientras que la segunda se dá en respuesta a la entrada del mismo (Albert y Tashjian, 1984; Gerhergon y Thaw, 1985) a través de canales de calcio localizados en la membrana celular. El paso de estos iones a través de los canales de calcio está regulado por la activación de estos canales por cambios de voltaje en la membrana celular (Reuter, 1983; Armstrong y Eckert, 1987) y por cambios conformacionales del canal inducidos por la fosforilación de una subunidad componente del canal de calcio (Josephson et al., 1990). Armstrong y Eckert (1987) demostraron que la fosforilación de los canales de calcio activados por voltaje, o moléculas asociadas a estos canales, modula la función de la compuerta. Bajo estas condiciones, se ha observado un aumento en las corrientes de calcio que se explica por un aumento en la probabilidad de apertura del canal (Reuter, 1983; Josephson y Sperelakis, 1991).

Recientemente, se ha mostrado que cinasas dependientes de AMP cíclico, fosforilan canales de calcio en células GH3 (Armstrong y Eckert, 1987), cardíacas (Sperelakis y Wahler, 1988) y musculares (Lai et al., 1990), y se ha propuesto que la subunidad alfa del canal es el sustrato para estas enzimas, aunque con esto no se puede descartar la participación de otras cinasas. La fosforilación del canal de calcio del músculo esquelético, vía una proteína cinasa dependiente de AMPc, incrementa la probabilidad de encontrar un canal de calcio en un estado abierto (Lazdunski et al., 1988). Cuando los canales de calcio del músculo esquelético son purificados y reconstituidos en bicapas o vesículas de fosfolípidos, la fosforilación por la proteína cinasa dependiente de AMPc en las subunidades alfa 1 y beta activa corrientes de calcio, demostrando que la fosforilación de estas subunidades es suficiente para regular la actividad del canal de calcio en estas células, así como en células GH3 (Taraskevich y Douglas, 1978; Dufy et al., 1979).

De acuerdo a los datos anteriores, en este trabajo se propuso analizar la participación de la fosforilación de los canales de calcio sobre la secreción potenciada de PRL. Para tratar de

demostrar la participación de este mecanismo, como estrategia se utilizó al activador de canales de calcio Bay K 8644. Así, los resultados obtenidos (figura 3) muestran que la aplicación del activador de canales de calcio Bay K 8644 no estimula por sí sola la secreción de PRL cuando se administra en presencia tónica de DA, como era de esperarse. Por estudios electrofisiológicos, uno de los mecanismos utilizados por DA para inhibir la secreción de PRL es mediante la generación de una hiperpolarización membranal (Israel y Vincent, 1987). Bay K 8644 produce un incremento en el tiempo de apertura de los canales de calcio (Armstrong y Eckert, 1987). En nuestro estudio, el pretratamiento con Bay K 8644 aún en presencia tónica de DA potenció la eficacia de la TRH para secretar PRL (figura 2). Incluso, su efecto es mayor que el obtenido por la suspensión de DA (Figura 2). Estos resultados se refuerzan con aquellos obtenidos por Enyeart y Hinkle (1985) donde muestran que una concentración de 10  $\mu\text{M}$  de Bay K 8644 produce un incremento de hasta 300% en la secreción de PRL, cuando las células se depolarizan con concentraciones altas de potasio. Por otra parte, la falta de efecto de la Bay K 8644 administrada por sí sola, previamente descrita, coincide con resultados negativos cuando el activador se administra a células GH3 en presencia de concentraciones normales de potasio (Enyeart y Hinkle, 1985). Este efecto de Bay K 8644 se puede explicar si consideramos que, como se describió anteriormente, la TRH tiene la propiedad de producir depolarización membranal (Israel y Vincent, 1987), y de esta forma, activar canales de calcio dependientes de voltaje. Así, el efecto de la TRH se expresaría mediante un aumento masivo en la concentración de calcio intracelular, al permitir el paso de los iones calcio a través de canales de calcio dependientes de voltaje, que se encontrarían en un estado "activado" por la presencia del Bay K 8644. Este estado activado proponemos que sería análogo al producido por la fosforilación de los canales que ocurre en respuesta a la activación de la cinasa A por la suspensión dopaminérgica. Estas activaciones podrían explicarse en parte quizás por un incremento en el tiempo de apertura del canal como lo

muestra el trabajo de Nunoki y col. (1989) o quizás por un incremento en el número de canales funcionales como es el caso de la estimulación  $\beta$ -adrenérgica en miocitos ventriculares de cobayo (Bean et al., 1984). Una posible explicación a la respuesta tan grande que se obtuvo de secreción de PRL al utilizar al activador de canales de calcio Bay K 8644 puede ser dada en el sentido de que la unión de Bay K 8644 con su receptor pudiera provocar un cambio conformacional en la estructura del canal de tal forma que podría limitar la interacción de las fosfatasas endógenas con el sitio de fosforilación y evitar, de esta forma, un decaimiento rápido en la apertura del canal (Armstrong y Eckert, 1987).

A pesar que los resultados que se han mostrado hasta el momento son muy sugerentes de que la fosforilación de los canales de calcio es un mecanismo que está participando en la secreción potenciada de PRL, no se pueden descartar la participación de otros mecanismos celulares paralelos o redundantes. Tampoco nuestros datos proporcionan evidencia directa de que el mecanismo de fosforilación sea el responsable de la potenciación, sino que constituyen solamente una evidencia indirecta. Sin embargo, en apoyo a la participación del mecanismo de fosforilación en la potenciación, la utilización de bloqueadores de canales de calcio metoxiverapamil y nifedipina bloquearon la potenciación inducida por la suspensión transitoria del tono dopaminérgico (figuras 4 y 5). La observación de que la potenciación del efecto de TRH inducida por Bay K 8644 no fué completamente bloqueada por nifedipina y metoxiverapamil (figuras 6 y 7), si no parcialmente inhibida, puede tener dos explicaciones: 1) en vista de que las concentraciones que se utilizaron tanto del activador como de los bloqueadores fueron equimolares, podemos pensar en un fenómeno de competencia parcial; o 2) que como se había mencionado anteriormente, quizás estas drogas impiden la acción de las fosfatasas, donde la desactivación de los canales de calcio resulta de la defosforilación de los mismos por una fosfatasa dependiente de calcio. El mecanismo de acción propuesto para las dihidropiridinas inhibitorias, implica el bloqueo de la apertura

del canal cuando este es estimulado por una depolarización membranal (Cohen y McCarthy, 1987), lo que se traduce en un bloqueo del flujo entrante de calcio extracelular al espacio intracelular (Catterall et al., 1990). Estos resultados coinciden con los reportados en las células GH3 y GH4C1 donde nimodipina inhibe la secreción de PRL estimulada por Bay K 8644 de una manera competitiva (Enyeart y Hinkle, 1985).

En resúmenes podemos decir que los datos obtenidos por otros investigadores, aunados a los obtenidos en este laboratorio, apoyan la hipótesis planteada de que la suspensión transitoria de DA es un estímulo importante en la regulación de la secreción de PRL. Las concentraciones de DA encontradas en la circulación del sistema porta hipofisiario se ha reportado son suficientes para inhibir tónicamente la secreción de PRL (Ben-Jonathan et al., 1977) y para ocupar la mayoría de los receptores localizados en la membrana celular del lactotrofo (Caron, 1978). El efecto inhibitorio tónico que DA tiene sobre la secreción de PRL lo realiza mediante su unión a receptores denominados D2 (Caron, 1978). De esta manera inhibe la secreción de PRL al inactivar tanto a la adenilato ciclasa como a la fosfolipasa C (Martínez de la Escalera, Guthrie y Weiner, 1988), al impedir la generación de potenciales de acción por mantener a la membrana celular en un estado hiperpolarizado (Duffy et al., 1979; Israel y Vincent, 1987), y al impedir la activación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Schofield, 1983). Por el contrario, un breve decremento en la concentración de DA en sangre portal tanto en condiciones in vivo (Plotsky y Neill, 1982) como in vitro (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988), resulta en la activación de la adenilato ciclasa y el consecuente incremento en los niveles de AMPc (Martínez de la Escalera y Weiner, 1988) y presumiblemente en la activación de la proteína cinasa A, lo que hipotéticamente resultaría en la fosforilación de los canales de calcio. De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, se puede concluir que Bay K 8644 potencia la capacidad de TRH para secretar PRL (ver fig. 8) al incrementar el tiempo de apertura del canal de una manera similar a como lo realiza la fosforilación, ya

que al administrar TRH en presencia tónica de DA y del activador de canales de calcio Bay K 8644 se observa la respuesta de secreción potenciada de PRL (ver fig 3). De manera indirecta se puede decir que la fosforilación de los canales de calcio es el mecanismo que está participando en potenciar la capacidad estimulante de la TRH cuando hay una suspensión transitoria del tono dopaminérgico (ver fig. 1) y que da lugar a la secreción potenciada de PRL.

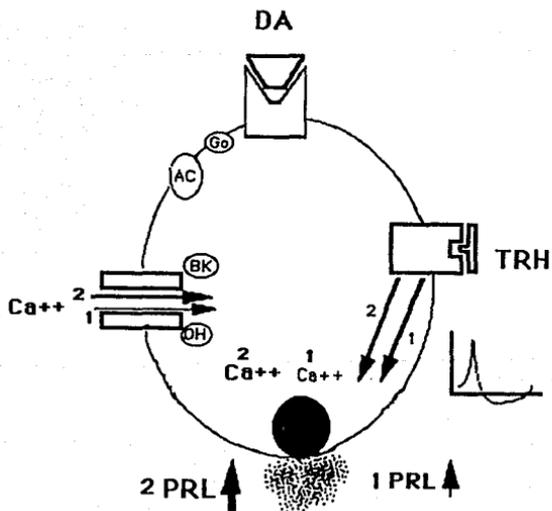


Fig. 8.- Esquema que muestra la secreción potenciada de PRL inducida por el agonista de canales de calcio Bay K 8644, como estrategia para mostrar que los canales de calcio pueden ser fosforilados durante la suspensión transitoria de DA por la cinasa A. Go= Proteína G; DA= Dopamina; AC= Adenilato ciclasa; TRH= Hormona liberadora de tirotrópica; OH= Grupo oxidrilo; BK= Bay K 8644; PRL= Prolactina; Ca<sup>++</sup>= ión calcio.

Para finalizar, cabe aclarar que en este trabajo se ha hipotetizado que el aumento en la efectividad de la TRH involucra la activación de canales de calcio dependientes de voltaje que se encuentran en un estado defosforilado, por la acción de la cinasa A en respuesta a la suspensión dopaminérgica. Si bién los resultados que aquí se presentan al utilizar al activador de canales de calcio Bay K 8644, son bastante sugerentes de que la fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje, y en particular los canales de calcio tipo L (que se sabe son lo únicos sensibles a las dihidropiridinas), está participando en la secreción potenciada de PRL, es necesario demostrar que la proteína cinasa dependiente de AMP cíclico es la responsable de fosforilar a dichos canales, y que estos canales efectivamente se encuentran fosforilados en lactotropos.

## BIBLIOGRAFIA

- Albert, P.R. y A.H. Tashjian, Jr. (1984).- Thyrotropin-Releasing Hormone-Induced Spike and Plateau in Cytosolic Free  $Ca^{2+}$  Concentrations in Pituitary Cells. *J. Biol. Chem.* 259: 5827-5832.
- Aizawa, T. y P. Hinkle (1985).- Thyrotropin-Releasing Hormone Rapidly Stimulates a Biphasic Secretion of Prolactin and Growth Hormone in GH4C1 Rat Pituitary Tumor Cells. *Endocrinol.* 116: 73-82.
- Aizawa, T. y P. Hinkle (1986).- Differential Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone, Vasoactive Intestinal Peptide, Phorbol Ester, and Depolarization in GH4C1 Rat Pituitary Cells. *Endocrinol.* 116: 909-919.
- Armstrong, C.M. y D.R. Matteson (1985).- Two Distinct populations of Calcium Channels in a Clonal Line of Pituitary Cells. *Science.* 227: 65-67.
- Armstrong, A. y R. Eckert (1987).- Voltage Activated calcium Channels that Must be Phosphorylated to Respond to Membrane Depolarization. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 2518-2522.
- Barnes, G.D.; B.L. Brown; T.G. Gard; D. Atkinson; y R.P. Ekins (1978).- Effect of TRH and Dopamine on cyclic AMP levels in Enriched Mammothrophs and Thyrotroph cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 12: 273-284.
- Bean, B.P. (1989).- Multiple Types of Calcium Channels in Heart Muscle and Neurons. En: Dennis, W.W.; R.I. Norman y P. Hess (Eds.).- *Calcium Channels: Structure and Function.* New York Acad. Sci. New York.
- Ben-Jonathan, N.; C. Oliver; H.J. Weiner; R.S. Mical y J.C. Porter (1977).- Dopamine in Hypophyseal portal plasma of the rat during the Estrous cycle and Throughout Pregnancy. *Endocrinol.* 100: 452-458.
- Ben-Jonathan, N.; M.A. Neill; L.A. Arbogast; L.L. Peters y M.T. Hocfer (1980).- Dopamine in Hypophyseal Portal Blood: Relationship to Circulating Prolactin in Pregnant and Lactating Rats. *Endocrinol.* 106: 690-696.
- Ben-Jonathan, N.; C. Oliver; H.S. Weiner; R.S. Mical y J.C. Porter (1977).- Dopamine in Hypophysial Portal Plasma of the Rat During the Estrous Cycle and Throughout Pregnancy. *Endocrinol.* 100: 452-458.

- Ben-Jonathan, N.; L.A. Arbogast; y J.F. Hyde (1989).- Neuroendocrine Regulation of Prolactin Release. *Prog. Neuroendocrinol.* 33: 399-447.
- Berridge, M.J. (1987).- Inositol Triphosphate and Diacylglycerol: Two Interacting Second Messengers. *Ann. Rev. Biochem.* 56: 1159-193.
- Birge, C.A.; L.S. Jacobs; C.T. Hammer y W.H. Daughaday (1970).- Catecholamine Inhibition of Prolactin Secretion by Isolated Rat Adenohypophyses. *Endocrinol.* 86: 120-130.
- Biales, B.; M.A. Dichter y A. Tischler (1977).- Sodium and Calcium Action Potential in Pituitary Cells. *Nature.* 267: 172-174.
- Bishop, W.; L.J. Jacobs; C.T. Hammer; y W.H. Daughaday (1970).- Catecholamine Inhibition of Prolactin Secretion by Isolated Rat Adenohypophyses. *Endocrinol.* 86: 120-130.
- Bishop, W.; L. Krulich; C.P. Fawcett y S.M. McCann (1971).- The Effect of Median Eminence (ME) Lesion of Plasma Levels of FSH, LH, and Prolactin in the Rat. *Proc. Soc. Exp. Med.* 136: 925-927.
- Blake, C.A. (1974).- Stimulation of Pituitary Prolactin and TSH Release in Lactating and Proestrus Rats. *Endocrinol.* 94: 503-508.
- Borsotto, M.; J. Barhanin; M. Fosset y M. Lazdunski (1985).- The 1,4-Dihydropyridine Receptor Associated with the Skeletal Muscle Voltage-Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel. *J. Biol. Chem.* 260: 14255-14263.
- Bowers, C.Y. (1971).- Prolactin and Thyrotropin Release in Man by Synthetic Pyroglutamyl-Histidyl-Prolinamide. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115:1033-1041.
- Boyd, A.E.; E. Spencer; I.M.D. Jackson and S. Reichlin (1976).- Prolactin-Releasing Factor (PRF) in Porcine Hypothalamic Extract Distinct from TRH. *Endocrinol.* 99: 861-871.
- Brandi, A.M.; S. Joannidis; F. Peillon y D. Jourbet (1990).- Changes of Prolactin Response to Dopamine During the Rat Estrous Cycle. *Neuroendocrinol.* 51: 449-454.
- Burnet, F.R. y J.B. Warkeley (1976).- Plasma Concentrations of Prolactin and Thyrotrophin during suckling in Urethane-anesthetized Rats. *J. Endocrinol.* 70: 429-437.
- Calabro, M.A. y R.M. MacLeod (1978).- Binding of Dopamine to Bovine Anterior Pituitary Gland Membranes. *Neuroendocrinol.* 25: 32-46.

- Canónico, P.L.; C.A. Valdenegro; y R.M. MacLeod (1983).- The Inhibition of Phosphatidylinositol Turnover: A Possible Postreceptor Mechanism for the Prolactin Secretion-Inhibiting Effect of Dopamine. *Endocrinol.* 113: 7-14.
- Canónico, P.L. y R.M. MacLeod (1986).- Angiotensin Peptides Stimulate Phosphoinositide Breakdown and Prolactin Release in Anterior Pituitary Cells in Culture. *Endocrinol.* 118: 223-228.
- Canónico, P.L.; W.D. Jarvis; A.M. Judd and R.M. MacLeod (1986).- Dopamine does not Attenuate Phosphoinositide Hydrolysis in Rat Anterior Pituitary Cells. *J. Endocrinol.* 110: 389-393.
- Catterall, W.A.; K. Nunoki; Y. Lai; K. De Jongh; W. Thomsen y S. Rossie (1990).- Structure and Modulation of Voltage-Sensitive Sodium and Calcium Channels. *Adv. Second. Messenger. Phosphoprotein Res.* 24: 30-35.
- Caron, M.G.; M. Beaulieu; V. Raymond; B. Gagne; J. Drovin; R.J. Lefkowitz y F. Labrie (1978).- Dopaminergic Receptors in the Anterior Pituitary Gland. *J. Biol. Chem.* 253: 2244-2253.
- Chen, C.L.; Y. Amenori; K.H. Lu; J.L. Voogt y J. Meites (1970).- Serum Prolactin Levels in the Rats with Pituitary Transplants or Hypothalamic Lesions. *Neuroendocrinol.* 6: 220-227.
- Chiocchio, S.R.; M.A. Cannata; J.R. Corero Funes y J.H. Tramezzani (1979).- Involvement of Adenohypophysial Dopamine in the Regulation of Prolactin Release During Suckling. *Endocrinol.* 105: 544-547.
- Cohen, C.J. y R.T. MacCarthy (1987).- Nimodipina block of Calcium Channels in Rat Anterior Pituitary. *J. Physiol.* 387: 195-225.
- Cramer, O.M.; C.R. Parker y J.C. Porter (1979).- Estrogen Inhibition of Dopamine Release into Hypophysial Portal Blood. *Endocrinol.* 104: 419-421.
- Curtis, B.M. y W.A. Catterall (1984).- Purification of the Calcium Antagonist Receptor of the Voltage-Sensitive Calcium Channel from Skeletal Muscle Transverse Tubules. *Biochemistry.* 23: 2113-2118.
- Curtis, B.M. y W.A. Catterall (1985).- Phosphorylation of the Calcium Antagonist Receptor of the Voltage Sensitive Calcium Channel by cAMP-Dependent Protein Kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 2528-2532.
- Curtis, B.M. y W.A. Catterall (1986).- Reconstitution of the Voltage-Sensitive Calcium Channel Purified from Skeletal Muscle Transverse Tubules. *Biochemistry.* 25: 3077-3083.

- Davis, J.R.E. y M.C. Sheppard (1986).- A Modulatory Role for Cyclic AMP in the Control of Thyrotropin Release: Studies with Forskolin and Dibutiryl Cyclic AMP. *J. Endocrinol.* 109: 365-369.
- DeCamilli, P. y D. Maconi (1979).- Dopamine inhibits adenilate cyclase in the Human Prolactin-Secreting Pituitary Ademas. *Nature.* 278: 252-254.
- deGreef, W.J. y J.D. Neill (1979).- Dopamine Levels in Hypophysial Stalk Plasma of the Rat during Surges of Prolactin Secretion Induced by Cervical Stimulation. *Endocrinol.* 105: 1093-1099.
- deGreef, W.J. y J.D. Neill (1979).- Dopamine Levels in Hypophysial Stalk Plasma and Prolactin Levels in Peripheral Plasma of the Lactating Rat: Effects of a Stimulated Suckling Stimulus. *Neuroendocrinol.* 32: 229-233.
- deGreef, W.J. y T.J. Visser (1981).- Evidence for the Involvement of Hypothalamic Dopamine and Thyrotropin-Releasing Hormone in Suckling-Induced Release of Prolactin. *J. Endocrinol.* 91: 213-223.
- deGreef, W.J.; W. Klootwijk; B. Karels y T.J. Visser (1984).- Levels of Dopamine and Thyrotropin-Releasing Hormone in Hypophysial stalk blood during an Oestrogen-Stimulated Surge of Prolactin in the Ovariectomized Rat. *J. Endocrinol.* 105: 107-112.
- Delbeke, D.; J.C. Scammell; A. Martinez-Campos y P.S. Dannies (1986).- Dopamine Inhibits Prolactin Release When Cyclic Adenosine 3',5"-Monophosphate Levels Are Elevated. 118: 1271-1277.
- Drust, D.S. y T.F.J. Martin (1985).- Protein Kinase C Translocates from Cytosol to Membrane upon Hormone Activation: Effects of Thyrotropin-Releasing Hormone in GH3 Cells. 128: 531-537.
- Dubinski, J.M. y G.S. Oxford (1984).- The Currents in Two Strains of Rat Anterior Pituitary Tumor Cells. *J. Gen. Physiol.* 83: 309-339.
- Dufy, B.; V. Jean-Didier; H. Fleury; P.D. Parquier; D. Gourdji y Tixier-Vidal (1979).- Dopamine Inhibition of Action Potential in a Prolactin Secreting Cell Line is Modulated by Oestrogen. *Nature.* 282: 855-857.
- Enyeart, J.J. y P.M. Hinkle (1984).- The Calcium Agonist Bay K 8644 Stimulates Secretion from a Pituitary Cell Line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 122: 991-996.

- Enyeart, J.J.; T. Aizawa y P.M. Hinkle (1985).- Dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> Antagonists: Potent Inhibitors of Secretion from Normal and Transformed Pituitary Cells. *Cell. Physiol.* 17: C510-C519.
- Enyeart, J.J.; T. Aizawa y P. M. Hinkle (1986).- Interaction of Dihydropyridine Ca<sup>2+</sup> agonist Bay K 8644 with normal and Transformed Pituitary Cells. *Am. J. Physiol.* 250: C95-C102.
- Enyeart, J.J.; S.S. Sheu y P.M. Hinkle (1987).- Dihydropyridine Modulators of Voltage-Sensitive Ca<sup>2+</sup> Channels Specifically Regulate Prolactin Production by GH4C1 Pituitary Tumor Cells. *J. Biol. Chem.* 262: 3154-3159.
- Evert, J.W. (1988).- Pituitary and Hypothalamus Perspectives and Overview. pp 1145. En: Knobil, E. y J.D. Neill (Eds).- *The Physiology Reproduction*. Raven Press Inc, New York.
- Fagin, K.D. y J.D. Neill (1981).- The Effect of Dopamine on Thyrotropin-Releasing Hormone-Induced Prolactin Secretion in vitro. *Endocrinol.* 109: 1835-1840.
- Fink, G.; Y. Koch y B. Aroya (1982).- Release of Thyrotropin Releasing Hormone into Hypophysial Portal Blood is High Relative to other Neuropeptides and May Be Related to Prolactin Secretion. *Brain. Research.* 243: 186-189.
- Geshengorn, M.C.; S.T. Hofftein; M.J. Rebecchi; E. Geras y B.C. Rubin (1981).- Thyrotropin-Releasing Hormone Stimulation of Prolactin Release from Clonal Rat Pituitary Cells. *J. Clin. Invest.* 67: 1769-1776.
- Geshengorn, M.C. (1982).- Thyrotropin Releasing Hormone. *Mol. Cell. Biochem.* 45: 163-179.
- Geshengorn, M.C. y C. Thaw (1983).- Calcium influx is not Required for TRH to Elevate Cytoplasmic Calcium in GH3 cells. *Endocrinol.* 113: 1522-1524.
- Geshengorn, M.C. y C. Thaw (1985).- Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Stimulates Biphasic Elevation of Cytoplasmic Free Calcium in GH3 Cells. Further Evidence that TRH Mobilizes Cellular and Extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Endocrinol.* 116: 591-596.
- Geshengorn, M.C. (1985).- Thyrotropin-Releasing Hormone Action: Mechanism of Calcium-Mediated Stimulation of Prolactin Secretion. *Recent Prog. Horm. Reserch.* 41: 607-652.
- Gibbs, D.M. y J.D. Neill (1978).- Dopamine Levels in Hypophysial Stalk Blood in the Rat are Sufficient to Inhibit Prolactin Secretion IN vivo. *Endocrinol.* 102: 1895-1900.

- Liberman, M.E.; R.A. Maurer; P. Claude y J.Gorski (1982).- Prolactin Synthesis in Primary Cultures of Pituitary cells Regulation by Estradiol. *Mol. Cell. Endocr.* 25: 277-294.
- Gourdji, D.; D. Bataille; N. Vauclin; D. Grouselle; G. Rosselin y A. Tixier-Vidal (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 Letters.* 104: 165-168.
- Grosvenor, C.E. y F. Mena (1980).- Evidence that Thyrotropin-Releasing Hormone and a Hypothalamic Prolactin-Releasing Factor May Function in the Release of Prolactin in the Lactating Rat. *Endocrinol.* 107: 863-868.
- Gudelsky, G.A.; D.D. Nansel y J.C. Porter (1981).- Role of Estrogen in the Dopaminergic Control of prolactin Secretion. *Endocrinol.* 108: 440-444.
- Guillemette, G.; T. Balla; A.J. Baukal y K.J. Catt (1987).- Inositol 1,4,5-Triphosphate Binds to a Specific Receptor and Releases Microsomal Calcium in the Anterior Pituitary Gland. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84: 8195-8199.
- Gunter, T.; R. Grob y M. Schramm (1984).- Calcium Channels Modulation: Ability to Inhibit or Promote Calcium influx Resides in the Same Dihydropyridine Molecule. *J. Card. Pharmacol.* 6: 1170-1176.
- Hagiwara, S. y H. Ohmori (1982).- Studies of Calcium Channels in Rat Clonal Pituitary Cells With Patch Electrode Voltage Clamp. *J. Physiol.* 331: 231-252.
- Harris, A.R.C.; D. Cristianson; M.S. Smith; S.L. Fang; L.E. Braverman y A.G. Vagenakis (1978).- The Physiological Role of Thyrotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Thyroid-Stimulating Hormone and Prolactin Secretion in the Rat. *J. Clin. Invest.* 61: 441-448.
- Heiman, M.L. Y N. Ben-Jonathan (1982).- Dopaminergics Receptors in the Rat Anterior Pituitary Changes During the Estrous Cycle. *Endocrinol.* 111: 37-41.
- Hess, P.; J.B. Lansman y R.W. Tsien (1984).- Different Modes of Ca Channel Gating behaviour Favoured by Dihydropyridine Ca Agonists and Antaginists. *Nature.* 311: 538-544.
- Hokfelt, T. (1967).- The posible Ultrastructural Identification of Tubero-Infundibular Dopamine Containing Nerve Endings in the Median Eminence of the Rat. brain. *Res.* 5: 121-124.

- Horn, A.M.; H.M. Fraser y G. Fink (1985).- Effects of Antiserum to Thyrotrophin-releasing on the Concentrations of Plasma Prolactin, Thyrotrophin and LH in The pro-oestrus Rat. *J. Endocrinol.* 104: 205-209.
- Hosey, M.M.; M. Borsotto y M. Lazdunski (1986).- Phosphorylation and Dephosphorylation of Dihydropyridine Sensitive Voltage Dependent Ca<sup>2+</sup> Channel Skeletal Muscle Membranes by cAMP and Ca<sup>2+</sup> -dependent processes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83: 3733 3737.
- Hosey, M.M.; F.C. Chang; C.M. O'Callahan y J. Ptasienski (1989).- L-Type Calcium Channels in Cardiac and Skeletal Muscle. En: Dennies, W.W.; R.I. Norman y P. Hess (EDs).- Calcium Channels: Structure and Function. New York Acad. Sci. New York.
- Ingram, C.D.; R.J. Bicknell y W.T. Mason (1986).- Intracellular Recordings from Bovine Anterior Pituitary Cells: Modulation of Spontaneous Activity by Regulators of Prolactin Secretion. *Endocrinol.* 119: 2508-2518.
- Israel, J.M.; C. Kirk y J.D. Vincent (1987).- Electrophysiological Responses to Dopamine of Rat Hypophysial Cells in Lactotroph-Enriched Primary Cultures. *J. Physiol.* 390: 1-22.
- Janis, R.A. y A. Scriabine (1983).- Sites of Action of Ca<sup>2+</sup> Channel Inhibitors. *Biochem. Pharmacol.* 32: 3499-3507.
- Josephson, I.R. y N. Sperelakis (1990).- Fast Activation of Cardiac Ca<sup>2+</sup> Channel Gating Charge by the Dihydropyridine Agonist, Bay K 8644. *Biophys. J.* 58: 1307-1311.
- Josephson, I.R. y N. Sperelakis (1991).- Phosphorylation Shifts the Time-Dependence of Cardiac Ca<sup>++</sup> CHANNEL Gating Currents. *Biophys. J. Biophysical. Soc.* 60: 491-497.
- Journet, L.; V. Homburger; C. pantoloni; M. Priam; J. Bockaert A. Enjalbert (1987).- An Islet-Activating Protein-Sensitive Protein G is Involved in Dopamine Inhibition of Angiotensin and Thyrotrophin-Releasing Hormone-Stimulated Inositol Phosphate Production in Anterior Pituitary Cells. *J. Biol. Chem.* 262: 15106-15110.
- Kaczorowski, G.J.; R.L. Vandlen; G.M.Katz y J.P. Reuben (1983).- Regulation of Excitation-Secretion Coupling by Thyrotrophin-Releasing Hormone (TRH): Evidence for TRH Receptor-Ion Channel Coupling Cultured Pituitary Cells. *J. Membrane Biol.* 71: 109-118.

- Kebabian, J.W. y D.B. Calne (1979).- Multiple Receptors for Dopamine. *Nature*. 277: 93-96.
- Kelly, P.A.; J.D. Jiame; M.C. Postel-Vinay y M. Ebery (1991).- The Prolactin/Growth Hormone Receptor Family. *Endocr. Rev.* 12: 235-251.
- Kidokoro, Y. (1975).- Spontaneous Calcium Action Potential in a Clonal Pituitary Cell Line and Their Relationship to Prolactin Secretion. *Nature*. 258: 741-742.
- Kimura, H.; M.A. Calabro y R.M. MacLeod (1976).- Suppression of Prolactin Secretion and cAMP accumulation by Dopamine in the Pituitary. *Fed. Proc.* 35: 305-308.
- Koch, Y.; G. Goldhaber; I. Fireman; U. Zor; J. Shani y E. Tal (1977).- Suppression of Prolactin and Thyrotropin Secretion in the Rat by Antiserum to Thyrotropin-Releasing Hormone. *Endocrinol.* 100: 1476-1478.
- Kokubun, S. y H. Reuter (1984).- Dihydropyridine Derivates Prolong the Open State of Ca Channels in Cultured Cardiac Cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 4824-4827.
- Kolesnick R.N. y M.C. Gershengorn (1986).- Thyrotropin-Releasing Hormone Stimulation of Prolactin Secretion Is Coordinately but not Synergistically Regulated by an Elevation of Cytoplasmic Calcium and 1,2-Diacylglycerol. *Endocrinol.* 119: 2461-2466.
- Lai, Y.; M.J. Seagar; M. Takahashi y W.A. Catterall (1990).- Cyclic AMP-dependent Phosphorylation of Two Size Forms of  $\alpha 1$  Subunits of L-Type Calcium Channels in Rat Skeletal Muscle Cells. *J. Biol. Chem.* 265: 20839-20848.
- Lazdunski, M.; J. Barhanin; M. Bosortto; C. Corgnard; C. Cooper; T. Coppola; M. Fosset; J.P. Galizzi; M.M. Hosey; C. Mourre; J.F. Renaud; G. Romey; A. Schmid y S. Vandale (1988).- Molecular Properties of Structure and Regulation of the Calcium Channel. En: Vanhoute, P.M.; R. Paoletti y L.H. Opie (Eds.).- Calcium Antagonists: Pharmacology and Clinical Research. New York Acad. Sci. New York.
- Login, J.S.; A.M. Judd y R.M. MacLeod (1985).- Dopamine Inhibits Calcium Flux in the 7315a Prolactin-Secreting Pituitary Tumor Cell. *Cell. Calcium*. 9: 27-31.
- MacLeod, R.M.; E.H. Fonthan y J.E. Lehmyer (1970).- Prolactin and Growth Hormone Production as Influenced by Catecholamines and Agents that Affect Brain Catecholamines. *Neuroendocrinol.* 6: 283-294.

- Malgaroli, A.; L. Vallar; A. Spada; A. Ciardo y J. Maldolesi (1987).- Internal Ca<sup>2+</sup> Fluctuation in Rat lactotroph Cell: Inhibitory Effects of Dopamine. *Pharmacol. Res. Commun.* 19: 957-958.
- Martin, T.F.J. y J.A. Kowalchuk (1984).- Evidence for the Role of Calcium and Diacylglycerol as Dual Second Messengers in Thyrotropin-Releasing Hormone Action: Involvement of Ca<sup>2+</sup>. *Endocrinol.* 115: 1527-1536.
- Martin, T.F.J. y J. Kowalchuk (1984).- Evidence for the Role of Calcium and Diacylglycerol as Dual Second Messengers in Thyrotropin-Releasing Hormone Action: Involvement of Diacylglycerol. *Endocrinol.* 115: 1517-1725.
- Martin T.F.J. (1986).- Measurement of Phospholipid Turnover in Cultured Hormone Responsive Pituitary Cells. *Meth. in Enzimol.* 124: 424-443.
- Martínez de la Escalera, T.F.J. Martin y R.I. Weiner (1987).- Phosphoinositide Hydrolysis in Response to the Withdrawal of Dopamine Inhibition in Enriched Lactotrophs in Culture. *Neuroendocrinol.* 46: 545-548.
- Martínez de la Escalera; J. Gutthrie y R.I. Weiner (1988).- Transient Removal of Dopamine Potentiates the Stimulation of Prolactin Release by TRH Not VIP: Stimulation via Ca<sup>2+</sup>/Protein Kinase C Pathway. *Neuroendocrinol.* 47: 38-45.
- Martínez de la Escalera y R.I. Weiner (1988).- Mechanism(s) by which the Transient Removal of Dopamine Regulation Potentiates the Prolactin-Releasing Action of Thyrotropin-Releasing Hormone. *Neuroendocrinol.* 47: 186-193.
- Martínez de la Escalera, G.; K.C. Swearingen y R.I. Weiner (1989).- Superfusion and Static Culture Technics for Measurement of Rapid Changes in Prolactin Secretion. *Methods. in Enzimol.* 168: 254-262.
- Matteson, D.R. y C.M. Armosntrong (1984).- Na and Ca Channels in the Transformed Line of Anterior Pituitary Cells. *J. Gen. Physiol.* 83: 371-394.
- Mena, F.; A. Enjalbert; L. Carbonelli; M. Priam y C. Kordon (1976).- Effect of Suckling on Plasma Prolactin and Hypothalamic Monoamona Levels in the Rat. *Endocrinol.* 99: 445-451.
- Mena, F.; P. Pacheco y C.E. Grosvenor (1982).- Effect of Electrical Stimulation of Mammary Nerve upon Pituitary and Plasma Prolactin Concentrations in Anesthetized Lactating Rats. *Endocrinol.* 106: 458-462.

- Merrit, J.E. y B.L. Brown (1984).- An Investigation of the Involvement of Calcium in the Control of Prolactin Secretion: Studies with Low calcium, Metoxyverapamil, Cibalto and Manganese. *J. Endocrinol.* 101: 319-325.
- Mishkinski, Y.; K. Khazen y F.G. Sulman (1968).- Prolactin Releasing Activity of the Hypothalamus in Post-Partum Rats. *Endocrinol.* 82: 611-613.
- Murphy, B.J. y B.S. Tuana (1989).- Phosphorylation and the Identification of a Protein Kinase Activity Associated with the Dihydropyridine Receptor Asolated from Rabbit Heart and Skeletal Muscle. En: Dennis, W.W.; R.I. Norman y P. Hess (Eds.).- *Calcium Channels: Structure and Function.* New York Acad. Sci. New York.
- Nansel, D.D.; G.A. Gudelsky y J.C. Porter (1979).- Subcellular Localization of Dopamine in the Anterior Pituitary Gland of the Rat: Apparent Association of Dopamine with Prolactin Secretory Granules. *Endocrinol.* 105: 1073-1077.
- Neill, J.D. (1972).- Comparison of Plasma Prolactin Levels in Cannulated and Decapitated Rats. *Endocrinol.* 90: 568-572.
- Nicoll, C.S. (1974).- Physiological Actions of prolactin. En: Greep, R.O.; E.B. Astwood; E. Knobil; W.H. Sawyer y S.R. Geiger (Eds.).- *Handbook of Physiology. Seccion 7. Vol. 4 Parte 2* Pp 253-292.
- Norman, R.L.; S.K. Quadri y H.G. Spies (1980).- Differential Sensitivity of Prolactin Release to Dopamine and Thyrotrophin-Releasing Hormone in Intact and Pituitary Stalk-Sectioned Rhesus Monkeys. *J. Endocrinol.* 84: 479-487.
- Nowycky, M.C. A.P. Fox y R.W. Tsien (1985).- Long-opening Mode of Gating of Neural Calcium Channels and its Promotion by the Dihydropyridine Calcium agonist Bay K 8644. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 2178-2182.
- Nunoki, K.; V. Florio y W.A. Catterall (1989).- Activation of Purified Calcium Channel by Stoichiometric Protein Phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 86: 6816-6820.
- Ozawa, S. y N. Kimura (1979).- Membrane Potential Changes Caused by Thyrotrophin-Releasing-Hormone in The Clonal GH3 cell and their Relationship to Secretion of Pituitary Hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 6017-6020.
- Pasqualini, C.; V. Lenoir; A. ElAbed y B. Kerdelhue (1984).- Anterior Pituitary Dopaminergic Receptors During the Rat Estrous Cycle. *Neuroendocrinol.* 38: 39-44.

- Plotsky, P.M.; D.M. Gibbs y J.D. Neill (1978).- Liquid Chromatographic Electrochemical Measurement of Dopamine in Hypophyseal Stalk Blood of Rats. *Endocrinol.* 102: 1887-1894.
- Plotsky, P.M. y J.D. Neill (1982).- Interactions of Dopamine and Thyrotropin-Releasing Hormone in the Regulation of Prolactin Release in Lactating Rats. *Endocrinol.* 111: 168-173.
- Pryor-Jones, R.A.; J.J. Silverlight; S.J. Kennedy y J.S. Jenkins (1988).- Vasoactive Intestinal Peptide and the Stimulation of Lactotroph Growth by Oestradiol in Rats. *J. Endocrinol.* 116: 259-265.
- Ray, K.P. y M. Wallis (1981).- Effects of Dopamine on Prolactin Secretion and cyclic AMP Accumulation in the Rat Anterior Pituitary Gland. *Bioch. J. Cell. Asp.* 194: 119-128.
- Rebecchi, M.J. y M.C. Gershengorn (1983).- Thyroliberin Stimulates Rapid Hydrolysis of Phosphatidilinositol 4,5-bisphosphate by a Phosphodiesterase in Rat Mammatropic Pituitary Cells. Evidence for an Early  $Ca^{2+}$  Independent Action. *Biochem. J.* 216: 287-294.
- Reichlin, S. (1981).- *Neuroendocrinology*. En: Wilson, J.D. y D.W. Foster (Eds.).- *Textbook of Endocrinology*. Seventh Edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia.
- Reuter, H. (1983).- Calcium Channel Modulation by Neurotransmitters, Enzymes and Drugs. *Nature.* 301: 569-574.
- Reuter, H. (1987).- Modulation of Ion Channels by Phosphorylation and Second Messengers. *NIPS.* 2: 168-171.
- Rillema, J.A. (1980).- Mechanism of prolactin Action. *Fed. Proc.* 39: 2593-2598.
- River, C. y W. Vale (1974).- In Vivo Stimulation of Prolactin Secretion in the Rat by Thyrotropin Releasing Factor, Related Peptides and Hypothalamic Extract. *Endocrinol.* 95: 978-983.
- Scherey, M.P.; H.J. Clark y S. Franks (1986).- The Dopaminergic Regulation of Anterior Pituitary  $^{45}Ca^{2+}$  Homeostasis and Prolactin Secretion. *J. Endocr.* 108: 423-429.
- Schettini, G.; M.J. Cronin y R. M. MacLeod (1983).- Adenosine 3',5monophosphate (cAMP) and Calcium Calmodulin Interaction in the Control of Prolactin Secretion: Evidence for Dopamine Inhibition of cAMP Accumulation and Prolactin Release after Calcium Calcium Mobilization. *Endocrinol.* 112: 1801-1807.

- Sheward, W.J.; H.M. Fraser y G. Fink (1985).- Effect of Immunoneutralization of Thyrotropin-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.* 106: 113-119.
- Schlegel, W.; B.P. Winiger; P. Mollard; P. Vacher; F. Wuarin; G.R. Zahnd; C.B. Wollheim y B. Dufy (1987).- Oscillations of Cytosolic Ca<sup>2+</sup> in Pituitary Cells Due to Action Potential. *Nature.* 329: 719-721.
- Schofield, J.G. (1983).- Use of a Trapped Fluorescent Indicator to Demonstrate Effects of Thyroliberin and Dopamine on Cytoplasmic Calcium Concentrations in Bovine Anterior Pituitary Cells. *Febs.* 159: 79-83.
- Sperelakis, N. y G.M. Wahler (1988).- Regulation of Ca<sup>2+</sup> influx in myocardial cells by Beta Adrenergic receptors, Cyclic Nucleotides, and phosphorylation. *Mol. Cel. Biochem.* 82: 19-28.
- Sutton, C.A. y T.F.J. Martin (1982).- Thyrotropin-Releasing Hormone (TRH) Selectively and Rapidly Stimulates Phosphatidylinositol Turnover in GH Pituitary Cells: A possible Second Step of TRH Action. *Endocrinol.* 110: 1273-1280.
- Sweenen, L. y C. Deneff (1982).- Physiological Concentrations of Dopamine Decrease Adenosine 3',5'-Monophosphate Levels in Culture Rat Anterior Pituitary Cells and Enriched Populations of Lactotrophs: Evidence for a Causal Relationship to Inhibition of Prolactin Release. *Endocrinol.* 111: 398-405.
- Tam, S.W. y P.S. Dannies (1981).- The Role of Adenosine 3',5'-Monophosphate in Dopaminergic Inhibition of Prolactin Release in Anterior Pituitary Cells. *Endocrinol.* 109:
- Takahara, J.; A. Aimura y A.V. Schally (1974).- Suppression of Prolactin Release by a Purified Porcine PIF Preparation and Catecholamines infused into a Rat Hypophysial Portal Vessel. *Endocrinol.* 95: 462-465.
- Talwalker, P.K.; A. Ratner y J. Meites (1963).- In Vitro inhibition of Pituitary Prolactin Synthesis and Release by Hypothalamic Extracts. *Am. J. Physiol.* 205: 213-218.
- Tan, K. y A.H. Tashjian, Jr. (1984).- Voltage-Dependent Calcium Channels in Pituitary Cells in Culture. *J. Biol. Chem.* 259: 418-426.

- Taraskevich, P.S. y W.W. Douglas (1978).- Catecholamines of Supposed Inhibitory Hypophysiotropic Function Suppress Action Potentials in Prolactin Cells. *Nature*. 276: 832-834.
- Taraskevich, P.S. y W.W. Douglas (1980).- Electrical behaviour in a Line of Anterior Pituitary Cells (GH Cells) and the Influence of the Hypothalamic Peptide, Thyrotropin Releasing Factor. *Neuroscience*. 5: 421-431.
- Tashjian, A.F. Jr.; N.J. Barowski y D.K. Jensen (1971).- Thyrotropin Releasing Hormone. Direct Evidence for Stimulation of Prolactin Production by Pituitary Cells in Culture. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81: 798-806.
- Thorner, M.O.; J.T. Hackett; F. Murad y R.M. MacLeod (1980).- Calcium Rather Than Cyclic AMP as the Physiological Intracellular Regulator of Prolactin Release. *Neuroendocrinol.* 31: 390-402.
- Triggle, C.R. y D.K. Agrawal (1982).- Calcium-Channel Antagonist Binding to Isolated Vascular Smooth Muscle Membranes. *Can. J Physiol. Pharmacol.* 60: 1738-1741.
- Valverde, R.C.; V. Chieffo y S. Reichlin (1972).- Prolactin-Releasing Factor in Porcine and Hypothalamic Tissue. *Endocrinol.* 91: 982-993.

## APENDICE I

### METODOLOGIA

#### ANIMALES

En todos los experimentos se utilizaron ratas ciclantes de la cepa Wistar, con pesos entre 180 y 200 gramos. Los animales fueron ovariectomizados bilateralmente e implantadas subcutáneamente en el dorso por 30 días antes del experimento con cápsulas de silastic conteniendo 1 cm de estradiol ( $E_2$ ). Este tratamiento incrementa tanto el número de células de la adenohipófisis (de aproximadamente 1.5 millones a 10 millones de células por pituitaria), así como la proporción de lactotopos, de un 30% a un 90% (Martínez de la Escalera et al., 1989). Las células tratadas con  $E_2$  responden tanto a los estímulos de DA y TRH como a la potenciación por la suspensión transitoria del tono dopaminérgico, lo que permite que se puedan identificar los fenómenos bioquímicos intracelulares que se correlacionan con la secreción potenciada de PRL mediante la utilización de fármacos.

#### CULTIVO DE CELULAS ADENOHIPOFISIARIAS

En cada experimento se utilizaron entre 3 y 9 adenohipófisis que fueron colocadas en una solución salina balanceada de Hanks libre de  $Ca^{2+}$  y de magnesio ( $Mg^{2+}$ ) y conteniendo ácido ascórbico (AA; 100  $\mu M$ ) y DA (500 nM). Las hipófisis fueron trituradas en fragmentos de aproximadamente 1 mm, se lavaron dos veces y se incubaron en 2.5 ml de Hanks con colagenasa (2mg/ml) y DNasa (40  $\mu M/ml$ ) durante una hora en una incubadora metabólica a 37°C. Los fragmentos fueron disociados a células individuales por trituración suave con pipetas pasteur siliconizadas. La suspensión fué precipitada por centrifugación (200Xg) durante 10 minutos y lavada dos veces con DME, conteniendo suero (10%), AA (100  $\mu M$ ) y DA

(500 nM). Las células se sembraron en placas Thermanox de 24 pozos con una concentración de 300,000 células/ml en cada pozo. Previamente los pozos se cubrieron con una matriz extracelular de células endoteliales de córnea bovina (Matrigel). Las células colocadas sobre el matrigel se adhieren rápidamente al "portaobjetos" (coverlips) y permanecen adheridas a este durante el tiempo en que dura el experimento. Las células se incuban por toda la noche con oxígeno (95%) y bióxido de carbono (5%) en presencia de AA (100  $\mu$ M) y DA (500 nM) a 37°C.

### **ESTUDIOS FARMACOLOGICOS**

Después del período de incubación, se agregó 1  $\mu$ l de DA a cada pozo durante una hora. A continuación el medio fué cambiado por DME sin suero con DA (500nM) y se esperó una hora más. Posteriormente se realizaron las pruebas farmacológicas.

Estos estudios se realizaron para determinar si la secreción potenciada de PRL que se dá en respuesta a la breve suspensión de DA y que se expresa cuando TRH estimula la secreción de la hormona, involucra la fosforilación de los canales de calcio dependientes de voltaje y sensibles a las dihidropiridinas. Para ello, las células fueron sometidas a dos tratamientos diferentes. En el primer tratamiento se utilizó al agonista de canal de calcio Bay K 8644, mientras que en el segundo se utilizaron bloqueadores de canales de calcio como fueron el metoxiverapamil y la nifedipina tanto en la secreción potenciada de PRL inducida por la suspensión de DA como en la secreción potenciada de PRL inducida por el activador de canales de calcio Bay K 8644. El procedimiento que se siguió fué el siguiente:

#### **Primer tratamiento**

Después del período de incubación, las células fueron sometidas a las siguientes condiciones experimentales:

- 1) Células en presencia tónica de DA
- 2) Células con suspensión transitoria del tono dopaminérgico
- 3) Células en presencia tónica de DA más TRH
- 4) Células con suspensión transitoria del tono dopaminérgico más TRH
- 5) Células en presencia tónica de DA más Bay K 8644
- 6) Células en presencia tónica de DA más Bay k 8644 más TRH

Los experimentos se realizaron en tres períodos consecutivos (A, B y C) de 30 minutos cada uno. En el período A todas las células estuvieron en presencia tónica de DA (500 nM); en el segundo período, los pozos 2 y 4 fueron sometidos a la ausencia aguda de DA y los grupos restantes estuvieron en presencia tónica de DA a la vez, a los pozos de las hileras 5 y 6 se les aplicó el agonista Bay k 8644 ( $10^{-5}$  M). En el período C, la DA (500 nM) se reincorporó a los pozos de las hileras 2 y 4 y en ese mismo momento a los pozos de las hileras 3, 4 y 6 se les aplicó TRH ( $10^{-6}$  M) y Bay k 8644 a los pozos de las hileras 5 y 6 durante 30 min. Después de terminados los tres períodos de experimentación, los medios fueron colectados, centrifugados a 15,000 rpm en una microfuga eppendorf y almacenados en tubos eppendorf de 1.5 ml a  $-70$  C hasta su medición por radioinmunoensayo (RIA). Cada experimento se realizó por quintuplicado con determinaciones por cuatruplicado. La prueba estadística que se utilizó fué la de t-student.

#### Segundo tratamiento

En este caso, las condiciones en las que se trataron a las células fueron iguales a las utilizadas con el agonista Bay K 8644, sólo que aquí, las células estuvieron en presencia de los bloqueadores metoxiverapamil ( $10^{-5}$  M) y nifedipina ( $10^{-5}$  M), cada uno con su respectivo grupo control por 30 minutos cada período. Cada experimento fué realizado por triplicado con determinaciones por cuadruplicado y, al igual que con el primer tratamiento, los medios fueron colectados, centrifugados y almacenados para su posterior análisis por RIA.

## RADIOINMUNOENSAYO

El radioinmunoensayo (RIA) es una técnica inmunológica que se desarrolla en una fase líquida. Esta técnica se utilizó para cuantificar la concentración de PRL contenida en cada una de las muestras obtenidas en los cultivos celulares de cada tratamiento. Los pasos requeridos para cuantificar la hormona en la muestra problema de los cultivos a analizar, comprende los siguientes pasos:

### MARCAJE Y SEPARACION DE PROLACTINA

Dos miligramos de sefadex G 50-100 se hincharon en agua desionizada durante toda la noche. Al día siguiente, el sefadex se lavó 2 veces con buffer de fosfatos salino (PBS 0.01 M, pH 7.6) y se empacó en una columna de 10 ml. Una vez realizado este paso, la columna se bloqueó con un mililitro de albúmina de suero bovino (BSA 1%) y posteriormente con 30 ml de BSA (0.1%). Con este tratamiento, se asegura que la unión inespecífica sea menor y no interfiera en la cuantificación de la hormona.

### Iodación de la hormona

La PRL (2µg) se diluyó en 20µl de buffer de fosfatos (PBS 0.05M, pH 7.4). Posteriormente, se le agregó 0.6 mCi de yoduro de sodio 125 (<sup>125</sup>I) y 10 µl de cloramina T. La reacción se dejó por 2 minutos a temperatura ambiente; después de este tiempo, esta se detuvo al agregar 100µl de metabisulfito de sodio. Después, la solución se colocó sobre la columna de sephadex G 50-100 para separar la hormona que reaccionó con el yodo 125, de aquel que quedó libre. Una vez que la columna está corriendo, se obtienen fracciones de 1ml en tubos de ensaye de 15X75. Después de haber recolectado 1 ml del eluido, se tomaron 10 µl de cada una de las fracciones para determinar en cual de ellas se encuentra la hormona marcada y en cual el yodo libre. Por último, se seleccionan todos aquellos tubos que contienen a la hormona marcada y los demás se

desechan.

Antes de realizar la cuantificación de la hormona en la muestra problema, primero se realiza una prueba con cada una de las fracciones obtenidas para determinar el porcentaje de pegado de cada una de ellas, es decir, que tanto es reconocida por el primer anticuerpo. Para esto, se tomaron 100  $\mu\text{l}$  de cada una de las fracciones y se colocaron en presencia de 500  $\mu\text{l}$  de BSA 0.01%, 200  $\mu\text{l}$  de primer anticuerpo a una dilución 1/3000, el complejo se dejó reaccionar por 24 h a temperatura ambiente. Al día siguiente, se administró a la pansorbina (15  $\mu\text{l}$ ), como el agente presipitador por 30 minutos, se centrifugó por 30 minutos (3000 rpm) y el sobrenadante se desechó y se cuantificó el precipitado. Después de esto, se realizan los cálculos necesarios para determinar el porcentaje de pegado de cada una de las fracciones, se seleccionan las mejores para cuantificar, posteriormente, la concentración de PRL contenida en la muestra problema.

#### **Cuantificación de la Hormona**

Antes de cuantificar todas las muestras obtenidas en cada uno de los experimentos, primero se realiza una prueba con una muestra representante de cada tratamiento para determinar que cantidad de hormona contenida en ella y asegurar de que esta caiga dentro de la curva estándar. Para esto, se colocaron diferentes cantidades de cada muestra seleccionada (1, 10 y 100  $\mu\text{l}$ ) y la prueba se realizó con los mismos pasos utilizados para determinar el porcentaje de unión. Después, se procedió a cuantificar cada una de las muestras obtenidas de cada experimento. Para tal efecto, se preparó la curva estándar con concentraciones que fueron de 0.05ng a 6ng y se colocaron las cuentas totales, el pegado no específico y el pegado máximo, todo por duplicado. Una vez realizado este paso, se tomó la cantidad requerida de la muestra y se colocó en los tubos de ensaye. Posteriormente, se administraron 200 $\mu\text{l}$  de suero normal de conejo (NRS) a los dos primeros tubos para obtener el pegado inespecífico (el cual sólo contenía PBS-BSA 0.1%) y a los tubos restantes se les agregó 200 $\mu\text{l}$  del primer anticuerpo (S-9 1/3000).

Por último se les administró a todos los tubos, 100 $\mu$ l de  $^{125}\text{I}$ -PRL (esta cantidad contenía lo equivalente a 20,000 cuentas por minuto de hormona marcada); la mezcla se dejó reaccionar toda la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, se agregó a todos los tubos, excepto a las cuentas totales, 15  $\mu$ l de pansorbina como agente precipitante y se dejó reaccionar durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después de este periodo los tubos se centrifugaron por 30 min. a 3000 rpm, el sobrenadante se desechó y el precipitado se cuantificó en un contador para radioactividad gamma.