

03072

1  
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES  
Y DE POSGRADO DEL COLEGIO DE CIENCIAS Y  
HUMANIDADES**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**

**EFFECTO DE LA ACTIVACION DE LA FOSFOLIPASA  
A2 SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIROGLUTAMIL  
PEPTIDASA II EN ADENOHIPOFISIS**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**MAESTRO EN BIOTECNOLOGIA**

**P R E S E N T A :**

**ING. MARTIN ARTURO BAEZA HERRERA**

**CUERNAVACA, MORELOS**

**AGOSTO 1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

ESTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE NEUROENDOCRINOLOGIA MOLECULAR DEL DEPARTAMENTO DE FISIOLOGIA Y GENETICA MOLECULAR DEL INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA-UNAM, BAJO LA ASESORIA DEL DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA Y DRA. GEORGINA PONCE ROMERO. EL TRABAJO FUE PARCIALMENTE FINANCIADO POR EL CONACYT Y POR LA DGAPA-UNAM.

**COMITE TUTORIAL:**

DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA (TUTOR)  
DRA. GEORGINA PONCE ROMERO (TUTOR)  
DR. MARIO SOBERON CHAVEZ (COTUTOR)

**JURADO DE EXAMEN:**

PRESIDENTE: DR. ALBERTO DARSZON ISRAEL  
VOCAL: DRA. MARTHA ROBLES FLORES  
SECRETARIO: DR. JEAN LOUIS CHARLI CASALONGA  
SUPLENTE: DRA. GEORGINA PONCE ROMERO  
SUPLENTE: DR. ALEJANDRO ALAGON CANO

## Dedicatoria.

**A mis padres: los cuales han sido el principal estímulo y base sólida de mi formación.**

## Agradecimientos.

**A mis profesores de quienes tanto he aprendido.**

**A Bernardo Uriostegui por su colaboración con el RIA de prolactina.**

**A Ely por su generosidad y ayuda desinteresada**

**A mis compañeros y amigos por compartir conmigo su tiempo y comprensión.**

## INDICE

<b>RESUMEN</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	1
<b>I.- INTRODUCCION</b> .....	2
<b>II.- ANTECEDENTES</b> .....	3
1.- Hormona liberadora de tirotrópina (TRH) .....	3
1.1.- Distribución .....	3
1.2.- Importancia fisiológica .....	4
1.3.- Biosíntesis .....	4-5
1.4.- Liberación .....	5
1.5.- Inactivación .....	5-6
1.6.- Receptores .....	6-7
1.7.- Regulación de los receptores .....	7-8
1.8.- Mecanismos de transducción de señales de la TRH en adenohipófisis ...	8-9
2.- Movilización del ácido araquidónico .....	9-10
2.1.- Fosfolipasas A2 .....	11
2.2.- Importancia de las PLA2 y la movilización del ácido araquidónico .....	11
2.3.- Efectos intracelulares del ácido araquidónico .....	12
3.- Introducción a los eicosanoides .....	12
3.1.- Metabolismo del ácido araquidónico por la vía ciclooxigenasa .....	12-13
3.2.- Metabolismo del ácido araquidónico por la vía lipoxigenasa .....	14-15
3.3.- Metabolismo del ácido araquidónico por la vía epoxigenasa .....	16
3.4.- Efectos de los metabolitos del ácido araquidónico .....	17
3.5.- Catabolismo de los metabolitos del ácido araquidónico .....	17-18
4.- Secreción de prolactina .....	18
4.1.- Regulación de la secreción de prolactina .....	18-19
4.2.- Efecto de eicosanoides sobre la secreción de prolactina .....	19-21
5.- Piroglutamil peptidasa II (PPII) .....	21-22
5.1.- Distribución .....	22
5.2.- Regulación de la PPII en adenohipófisis .....	23
<b>III.- OBJETIVOS</b> .....	24
<b>IV.- MATERIALES Y METODOS</b> .....	24
IV.1.- Animales .....	24
IV.2.- Reactivos .....	24
IV.3.- Cultivo de células dispersas de adenohipófisis .....	25
IV.4.- Tratamientos .....	25-26
IV.5.- Determinación de la actividad enzimática de la PPII .....	26
IV.6.- Cuantificación de proteína .....	26
IV.7.- Radioinmunoensayo de prolactina .....	26
IV.8.- Análisis estadístico .....	27

<b>V.- RESULTADOS</b> .....	28
V.1.- Efecto de la melitina .....	28-32
V.2.- Efecto del ácido araquidónico .....	33-35
V.3.- Controles de viabilidad celular y efecto de otros ácidos grasos .....	35
V.4.- Efecto de la inhibición del metabolismo del ácido araquidónico .....	36-37
V.5.- Efecto del TRH sólo o combinado con ácido araquidónico o melitina .....	37-40
<b>VI.- DISCUSION</b> .....	41-46
<b>VII.- CONCLUSIONES</b> .....	47
<b>VIII.- BIBLIOGRAFIA</b> .....	48-63

**RESUMEN:** La hormona liberadora de tirotrópina (TRH; pglu-his-proNH<sub>2</sub>) es inactivada por la acción de la piroglutamil peptidasa II (PPII). La PPII es una zinc ectopeptidasa de alta especificidad principalmente expresada en el cerebro y en los lactótrofos de la adenohipófisis. En este último tejido, la actividad de la PPII es regulada por múltiples hormonas. *In vitro*, la incubación con TRH a tiempos largos (horas) induce una inhibición de la actividad de la PPII, este efecto es mimetizado por la activación de la protein cinasa C o por incrementos en los niveles de AMPc. Debido a que la TRH induce una rápida liberación de ácido araquidónico (AA) de los lactótrofos, en este trabajo evaluamos el efecto de la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) y del AA sólo o combinado con TRH sobre la actividad de la PPII. Células de adenohipófisis provenientes de ratas Wistar de 3 meses de edad, fueron cultivadas en medio suplementado durante 5 días antes del tratamiento, la actividad de la PPII en las superficie de las células se cuantificó utilizando un ensayo radioquímico y la liberación de prolactina por radioinmunoensayo. La melitina (un activador de la PLA<sub>2</sub>) a concentraciones de 0.25 a 1.0 ug/ml induce una rápida disminución de la actividad de la PPII; a 0.5 ug/ml la disminución fue máxima (30-45% de inhibición) a los 20-30 minutos. El efecto de la melitina fue probablemente debido a la producción de AA ya que 0.5 uM de AA también inhibió la actividad de la PPII (41-72%) a los 20 minutos. El efecto inhibitorio del AA es probablemente el resultado de su metabolismo por la vía lipoxigenasa ya que su efecto es bloqueado por un inhibidor de ésta vía (ácido nordihidroguayaretico 10 uM) pero no por inhibidores de la vía ciclooxigenasa (indometacina 10 uM). El efecto del AA o la melitina no son aditivos; sin embargo, el efecto del TRH más AA o melitina fue adicional, sugiriendo que el efecto del TRH no requiere movilización de AA. El efecto de los tratamientos sobre la secreción de prolactina esta en consideración con los reportes publicados previamente. Estos datos sugieren que la producción de AA por efectores extracelulares puede regular la actividad de la PPII a tiempos cortos.

**ABSTRACT:** Thyrotropin releasing hormone (TRH; pglu-his-proNH<sub>2</sub>) is abolished by the action of pyroglutamyl peptidase II (PPII). This is a narrow specificity zinc ectopeptidase mainly expressed in brain and lactotrophs of the adenohipophysis. In this latter tissue, PPII activity is regulated by multiple hormones. TRH long term (hours) *in vitro* incubation down regulates PPII activity, this effect is mimicked by protein kinase C activation or increased cAMP levels. Since TRH induced rapidly arachidonic acid (AA) liberation of the lactotrophs. In this work we have tested the phospholipase A<sub>2</sub> activation and AA only or in combination with TRH on PPII activity. Three months old Wistar adenohipophyseal cells were cultivated in serum supplemented medium for 5 days prior to treatment; surface PPII activity quantified using a radiochemical assay and prolactin liberation by radioimmunoassay. Melittin (an activator of PLA<sub>2</sub>) concentrations from 0.25 to 1.0 ug/ml induced a rapid decrease of PPII activity; at 0.5 ug/ml the decrease was maximum (30-45% of inhibition) at 20-30 min. The melittin effect was probably due to production of AA since 0.5 uM AA also inhibited PPII activity (41-72%) at 20 min. The inhibitory effect of AA is probably the result of its metabolism by the lipoxigenase pathway since it is blocked by lipoxigenase inhibitor (10 uM nordihidroguayaretic acid) but not ciclooxigenase pathway inhibitors (10 uM indomethacin). AA or melittin effect are not additives; however, TRH effect with AA or melittin was additional, suggesting that TRH effect no require AA mobilization Prolactin was secreted with these treatments in agreement with previously published reports. These data suggest that production of arachidonic acid by extracellular effectors may regulate PPII activity a short time.

## I.- INTRODUCCION.

Una de las características esenciales de los seres vivos es su capacidad de responder y ajustarse a las condiciones de un sistema dinámico, dando una respuesta global y específica mediante un complejo sistema de comunicación celular que opera básicamente por medio de mensajeros químicos. Esta comunicación se coordina principalmente por los sistemas: nervioso, endócrino e inmune.

Uno de los grandes descubrimientos en la historia de la neuroendocrinología fue la observación de que algunas células nerviosas especializadas pueden secretar hormonas. Mucho antes de que se reportara la primera estructura química de un factor hipotálamo-hipofisiotrópico (factor liberador de tirotrópina en 1969), Paul Ehrlich ya había formulado su postulado clásico "*corpora non agunt nisi fixata*" : las sustancias no actúan a menos de que se fijen, refiriéndose a los receptores y sentando las bases de la comunicación celular.

La hipófisis anterior o adenohipófisis es una glándula muy vascularizada; la sangre que llega a esta glándula pasa primero por un lecho capilar situado en el extremo ventral del hipotálamo llamado eminencia media, la cual se conecta por debajo con el tallo de la hipófisis. A este sistema vascular se le denomina sistema porta hipotálamo-hipofisiario.

El descubrimiento de la neurosecreción y la importancia de los vasos portales hipotálamo-hipofisiarios permitió el establecimiento de la hipótesis del quimiotransmisor que propone que las sustancias humorales producidas por neuronas hipotalámicas son transportadas vía este sistema vascular a la adenohipófisis para regular la secreción de hormonas. Una de estas sustancias es el factor liberador de tirotrópina que se identificó inicialmente como una hormona hipofisiotrópica con funciones endócrinas en el eje hipotálamo-hipofisis-tiroides. Sin embargo, su amplia distribución en el sistema nervioso central así como diversas funciones fisiológicas y efectos farmacológicos en el sistema nervioso central son evidencias de sus funciones neuromoduladoras. Se ha demostrado que esta neurohormona puede ser inactivada a nivel de la membrana plasmática de células postsinápticas en el sistema nervioso central o a nivel de la membrana plasmática de los lactótopos en la adenohipófisis, por una peptidasa de alta especificidad.



## II.- ANTECEDENTES.

### 1.- HORMONA LIBERADORA DE TIROTROPINA (TRH).

La TRH es un tripéptido con los residuos aminoacil de los extremos amino y carboxilo modificados. La glutamina amino-terminal esta ciclizada y el residuo de prolina en el carboxilo terminal esta alfa-amidado.

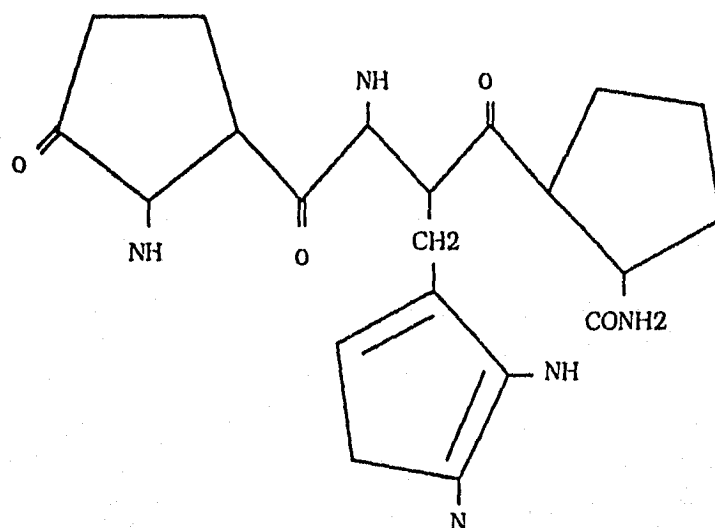


Fig. 1: Estructura de la TRH (Pglu-His-Pro-NH<sub>2</sub>).

#### 1.1.- DISTRIBUCION.

La TRH se encuentra ampliamente distribuida en el sistema nervioso central (SNC) y en otros órganos. Los estudios de distribución de este tripéptido se han realizado utilizando técnicas de radioinmunoensayo (RIA), inmunocitoquímica, hibridación *in situ* y fraccionamiento subcelular.

Las neuronas que sintetizan hormonas hipotalámicas se encuentran en varios núcleos hipotalámicos. Para el caso de la TRH, éstas neuronas están localizadas en el núcleo paraventricular (NPV) y se proyectan hacia la eminencia media (EM). Los capilares localizados en esta zona desembocan en la arteria superior hipofiseal, la cual drena su contenido a lo largo de los vasos portales hasta la adenohipófisis (1). Por estudios de inmunocitoquímica se han mostrado además, cuerpos TRHérgicos en el hipotálamo anterior, en los núcleos hipotalámicos ventromedial, supraquiasmático y supraóptico; en la médula oblongada, área preóptica, bulbo olfatorio, amígdala, corteza cerebral y médula espinal (2,3,4,5,6,7). Así también, por hibridación *in situ* se han encontrado células positivas al precursor de la TRH en estas mismas regiones.

Terminales axónicas de neuronas TRHérgicas se han encontrado en áreas que incluyen, además de la EM, el área preóptica, la amígdala, el tallo cerebral inferior, el cerebro anterior, el diencefalo posterior y la neurohipófisis (6,7,8,9,10). En el hipotálamo, la EM contiene el mayor número de terminales TRHérgicas. Se han encontrado también terminales TRHérgicas en el asta ventral y dorsal de la médula espinal.

## 1.2.- IMPORTANCIA FISIOLÓGICA.

Las funciones de la TRH se pueden dividir en funciones endócrinas, centrales y periféricas.

Dentro de las funciones endócrinas, la TRH estimula la síntesis y liberación de la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y de la prolactina (PRL). La TSH al ser liberada en respuesta a la TRH pasa a la circulación sistémica, alcanzando la glándula tiroides donde estimula la secreción de hormonas tiroideas, mientras que la PRL tiene múltiples funciones fisiológicas incluyendo acciones en la glándula mamaria, afectando procesos de crecimiento, diferenciación, producción láctea y mantenimiento de la lactancia.

Los efectos fisiológicos de este péptido en el SNC son muy complejos y en la actualidad insuficientemente comprendidos. Se han descrito efectos a nivel de neurotransmisión, excitabilidad nerviosa y comportamiento.

La TRH interactúa con varios sistemas neuronales en el SNC; algunas evidencias presentadas por Bennett et al (11), sugieren interacciones entre la TRH y mecanismos catecolaminérgicos en el cerebro y cordón espinal. Estos estudios proponen que la TRH induce respuestas a nivel del comportamiento y de la actividad motora mediados por la liberación de noradrenalina en el cerebro o médula espinal así como la liberación de dopamina en el cerebro mesolímbico. Evidencias farmacológicas sugieren que la TRH potencia la liberación de dopamina en el núcleo acumbens y el estriatum (12) afectando la actividad motora. Sin embargo, existe controversia en cuanto a la actividad de la TRH endógena sobre la estimulación de la liberación de dopamina y acerca de los mecanismos específicos que transmiten esta respuesta (13). También se han descrito efectos sobre la neurotransmisión colinérgica, afectando la densidad de receptores muscarínico colinérgicos, los cuales se incrementan en respuesta al péptido TRH (14).

En neuronas motoras de la médula espinal, la TRH induce una despolarización de larga duración, con un incremento en la conductancia y excitabilidad de la membrana, facilitando la excitación de neuronas motoras y modulando los reflejos espinales (15,16). Efectos similares se han observado en neuronas del tracto solitarius y neuronas septohipocámpales (17,18).

La aplicación de TRH a regiones específicas del cerebro o su inyección intracerebroventricular (19) produce una amplia gama de efectos sobre el comportamiento y funciones autónomas:

- Reversión de la sedación inducida por narcóticos, alcohol o la sedación natural en especies hibernantes.

- Inducción de un tipo de comportamiento conocido como "wet-dog shaking" que se describe como un estremecimiento o movimientos propulsivos del cuello y la cabeza.

- A nivel periférico se observan efectos sobre los sistemas circulatorio, cardiovascular, respiratorio y gastrointestinal.

Otros efectos consisten en funciones neurotróficas y neuroprotectoras observadas en varios modelos de trauma al SNC (20). Se ha reportado la presencia de terminales TRHérgicas a proximidad de neuronas motoras alfa de la médula espinal y se han sugerido funciones neurotróficas en esta área.

## 1.3.- BIOSÍNTESIS.

La TRH se sintetiza en neuronas del hipotálamo y otras células, a partir de un precursor de alto peso molecular (21) que contiene cinco veces la secuencia **Gln-His-Pro-Gly** (Pro-TRH) flanqueada por pares de aminoácidos básicos. Estos últimos pueden ser reconocidos por algunas endoproteasas (convertasas) que hidrolizan al precursor a este nivel. Los aminoácidos básicos que quedan en el extremo carboxilo-terminal son posteriormente removidos por una

carboxipeptidasa E.

La acción conjunta de estas enzimas sobre el precursor produce cinco copias del péptido Pro-TRH. El residuo glutamínico en el extremo N-terminal del Pro-TRH es ciclizado por la enzima glutamínico ciclasa, y el residuo de glicina en el extremo carboxilo-terminal es procesado por una monooxigenasa peptidilglicina  $\alpha$ -amidante, dejando el grupo amido de la glicina unido a la prolina; y quedando finalmente el péptido biológicamente activo " **Pglu-His-Pro-NH<sub>2</sub>** " (22,23).

Todos estos eventos se llevan a cabo en la vía de secreción regulada de las neuronas TRHérgicas. De acuerdo con esto, un alto porcentaje de TRH hipotalámico y extrahipotalámico se localiza en gránulos de secreción dentro de los axones y las terminales de las neuronas TRHérgicas (4,24,25).

#### **1.4.- LIBERACION.**

La TRH sintetizada en las neuronas TRHérgicas del NPV del hipotálamo, es transportada en gránulos desde el soma de la neurona hacia la terminal axónica en la EM del hipotálamo. El contenido de los gránulos posteriormente es liberado al sistema porta hipotálamo-hipofisiario a la llegada del potencial de acción, el cual surge en respuesta a estímulos fisiológicos específicos (26,27,28,29). La TRH viaja a través de los vasos portales hacia la adenohipófisis, donde ejercerá su acción sobre receptores específicos en tirótrofos y lactótrofos (30,31).

#### **1.5.- INACTIVACION.**

Ante la gran variedad de funciones neuromoduladoras y neuroendócrinas de la TRH, resulta razonable pensar en la existencia de mecanismos que regulen su disponibilidad en el espacio sináptico y otras áreas extracelulares.

Para los neurotransmisores clásicos, se ha observado que el mecanismo de recaptura es preponderante en la terminación de su actividad. La TRH puede acumularse en rebanadas de hipotálamo (32), pero no hay evidencia de que éste sea un mecanismo importante de inactivación. Por otro lado, para otros péptidos neuroactivos como la angiotensina y encefalinas éste mecanismo no es relevante para su inactivación y en cambio, existen mecanismos enzimáticos hidrolíticos que inactivan estos péptidos (33).

Existen varias peptidasas que participan en el procesamiento postsecretorio o catabolismo de neuropéptidos liberados sinápticamente. Estas peptidasas son proteínas integrales que se encuentran embebidas en la membrana plasmática de las células con su sitio activo orientado hacia el medio extracelular (ectopeptidasas) (34). Estas enzimas incluyen carboxipeptidasas, aminopeptidasas y endopeptidasas.

La degradación de la TRH *in vitro* puede llevarse a cabo por dos vías principales:

- 1.- Desamidación carboxilo terminal, para producir **Pglu-His-Pro**.
- 2.- Hidrólisis aminoterminal, para producir **His-Pro-NH<sub>2</sub>**.

La desamidación carboxilo-terminal se realiza por una endopeptidasa llamada prolina endopeptidasa (PE) (E.C.3.4.21.26) (34,35,36,37). Hidroliza el enlace imido que se encuentra después de la prolina; es una serín-proteasa de naturaleza soluble y su actividad en membranas sinaptosomales o microsomales es muy baja (38,39).

La hidrólisis aminoterminal puede realizarse por una aminopeptidasa soluble llamada piroglutamil peptidasa I (PPI) (E.C.3.4.11.8.), por una aminopeptidasa membranal llamada piroglutamil peptidasa II (PPII) (E.C.3.4.19.6.) o una isoforma de esta enzima probablemente generada por procesamiento transcripcional

alternativo (40) que se encuentra en el suero (PPII sérica). La PPI es una cisteín proteasa que hidroliza el enlace Pglu-X de péptidos, donde X es cualquier aminoácido excepto prolina (41). La PPII membranal es una ectopéptidasa (42) sólo capaz de hidrolizar pequeños péptidos cuya estructura es Pglu-His-X o Pglu-His-Pro-Y, donde X puede ser prolina, triptófano o Pro-beta-naftilamida y Y puede ser glicina o el grupo NH<sub>2</sub> (43,44,45). La PPII membranal comparte con la enzima sérica las mismas características de especificidad de sustrato con un valor de Km para la TRH cercana a 45 uM (42).

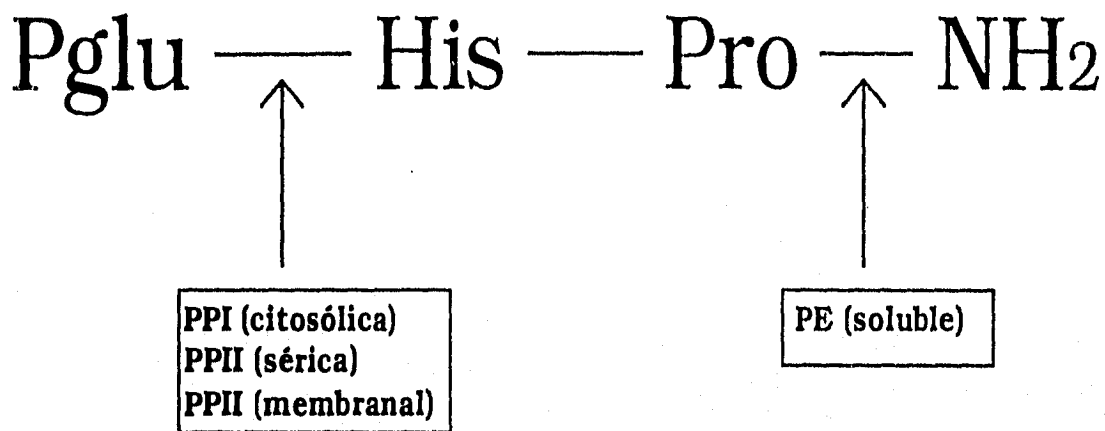


Fig. 2: Vías de degradación primaria de la TRH *in vitro*. Prolina endopeptidasa (PE), Piroglutamil peptidasas I y II (PPI y PPII).

En el cerebro, la degradación de la TRH *in vitro* por fracciones subcelulares se realiza principalmente por enzimas solubles (29,38). Sin embargo, no hay evidencias de que la PE y la PPI sean capaces de degradar a la TRH presente en el espacio extracelular, ya que inhibidores específicos de estas enzimas no modifican, *in vitro*, la recuperación del TRH liberado en rebanadas de hipotálamo (46) sugiriendo que estas enzimas no son importantes en la degradación de la TRH. Por el contrario, la alta especificidad de la PPII por la TRH, y su localización en terminales nerviosas orientada hacia el espacio sináptico, sugieren que es la responsable de la inactivación extracelular de la TRH en el SNC (44,47).

### 1.6.- RECEPTORES.

Usando el <sup>3</sup>H-TRH y <sup>3</sup>H-(3-Met-His)-TRH (un análogo del TRH que es un agonista mas potente) como ligandos, se demostraron uniones específicas de alta afinidad a membranas de homogenados de células de varias especies de mamíferos. Los primeros estudios demostraron sitios de alta afinidad en membranas de hipófisis bovina (48,49) y en una clona de células lactotrópicas tumorales de hipófisis de rata (GH) (50,51). Estos reportes fueron seguidos por los de Burt y Snyder (52) quienes demostraron con <sup>3</sup>H-TRH la unión estereoespecífica a membranas de cerebro y establecieron que la distribución de los receptores es heterogénea con constantes de afinidad en el rango nanomolar. En cultivos de células de adenohipófisis se ha mostrado que el receptor de la TRH (R-TRH) se encuentra sobre la membrana plasmática de tirótrofos y lactótrofos (53,54). Estudios subsecuentes revelaron una estrecha similitud entre los R-TRH en el cerebro y en la adenohipófisis (55,56).

La evidencia inicial de que el receptor de la TRH interactúa con proteínas G proviene de las observaciones de que el GTP y análogos de GTP reducen la unión del <sup>3</sup>H-TRH disminuyendo su afinidad para el receptor (57). Posteriormente, la asociación del R-TRH con proteínas G se dedujo de la estimulación de la fosfolipasa C (PLC) por la TRH, potenciándose la hidrólisis de fosfoinosítidos cuando GTP está presente (58,56,60). Finalmente, la clonación y secuenciación del R-TRH demostró que contiene siete dominios transmembranales, característicos de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G heterotríméricas (61,62,63).

La mayoría de los datos colectados por estudios de unión de ligando sugieren la presencia de múltiples isoformas del R-TRH con posibles diferencias funcionales en cerebro y adenohipófisis. Se han aislado varias isoformas del R-TRH murino generadas por procesamiento alternativo del precursor del RNAm del R-TRH. Por análisis de restricción y amplificación por PCR del R-TRH cDNA de hipófisis, se obtuvieron dos clonas diferentes. El cDNA de una de las clonas codifica una proteína de 412 aminoácidos y fue idéntica al R-TRH cDNA reportado previamente. El análisis de secuencia de la segunda clona mostró una secuencia idéntica a la anterior con la excepción de una deleción de una secuencia consenso que corresponde probablemente al sitio de empalme del RNA (61,64,65).

Estas dos variantes productos del procesamiento diferencial del precursor del RNAm predicen una variación en el C-terminal del R-TRH, el cual contiene varios sitios potenciales de regulación por fosforilación, los cuales pueden estar implicados en la desensibilización promovida por agonistas. Así también, se han identificado dos dominios en el C-terminal que están involucrados en el proceso de internalización (66).

### **1.7.- REGULACION DE LOS RECEPTORES.**

Los receptores acoplados a proteínas G pueden ser regulados una vez que se dio la respuesta o por exposiciones sucesivas a su agonista (desensibilización homóloga) o agonistas diferentes (desensibilización heteróloga). Este tipo de regulación puede darse a diferentes niveles; para el caso del receptor de la TRH, se han descrito varios mecanismos que regulan su densidad o número de receptores a nivel de la membrana plasmática tanto homóloga como heterológamente así como desensibilización de la respuesta sin pérdida de receptores. Los principales mecanismos de desensibilización son:

- 1.- A nivel transcripcional y estabilidad del RNAm.
- 2.- Desensibilización de la vía de transducción
- 3.- Internalización-reincorporación del complejo TRH-receptor.

Estos eventos se diferencian en particular en base a su cinética: la desensibilización de la vía de transducción es muy rápida (segundos), la endocitosis y resensibilización es lenta (minutos), y la regulación a nivel de síntesis es todavía más lenta (horas).

1).- La unión de la TRH a su receptor induce una disminución en los niveles del RNAm del R-TRH que conduce a la pérdida de receptores en la membrana plasmática. Ocurre tanto en los lactótrofos (67) como en los tirótrofos (68). Este proceso es lento alcanzando efectos máximos a las 24 horas.

En células GH3 (línea celular de somatolactótrofos) el número de receptores es regulado negativamente por la TRH y se ha encontrado que también disminuyen los niveles del R-TRH RNAm (69). En células GH3 establemente transfectadas con el R-TRH cDNA de hipófisis de ratón y estimuladas con la TRH, se incrementó la velocidad de transcripción del R-TRH RNAm y se incrementó aún más la inestabilidad o degradación del R-TRH RNAm. De esta manera, los niveles del R-TRH RNAm disminuyeron durante las primeras seis horas y después se incrementaron (70). Narayama et al, (71) mostraron que los lisados obtenidos de

células GH3 estimuladas con la TRH tienen una actividad degradativa de RNAs *in vitro* incrementada. Los niveles del RNAm del receptor también pueden ser regulados de manera heteróloga. Las hormonas tiroideas disminuyen los niveles del RNAm del receptor en la adenohipófisis (72). Por otro lado, el tratamiento de ratas macho con estrógenos induce un incremento transitorio de los niveles del RNAm del receptor en la adenohipófisis (73).

2).- La activación de un sistema de transducción de señales procede si el receptor una vez activado por su agonista, interactúa con una proteína G heterotrímica. Por otro lado, la desensibilización del receptor ocurre cuando el receptor activado interactúa con otras proteínas. Se sabe por ejemplo, que después de que el receptor adquiere su conformación activa puede ser sustrato de una cinasa de receptores acoplada a una proteína G citosólica (GRKs) fosforilando múltiples residuos de serina y treonina en el extremo carboxilo terminal del receptor e incrementando la afinidad del receptor a proteínas de la familia  $\beta$ -arrestinas impidiendo que el receptor se acople a una proteína G heterotrímica y por lo tanto impidiendo la activación de sistemas efectoros (74). Esta fosforilación podría ser también importante para la endocitosis del receptor.

Tratamientos con TRH producen una desensibilización de la vía de transducción de la PLC, la desensibilización se logró con una preincubación y fue dependiente de la dosis. El efecto sobre la desensibilización no parece ser mediado por incrementos en la concentración de calcio intracelular o dependiente de PKC (75).

3).- Se ha mostrado para receptores acoplados a proteínas G que la longitud del C-terminal es importante para la internalización, y se piensa que este proceso es una manera de redistribuir los receptores de la membrana plasmática a un compartimiento intracelular donde la vía de señalamiento no ocurre y que el reclutamiento posterior del receptor a la membrana plasmática es un componente de la resensibilización.

Se ha mostrado que en respuesta al TRH, el R-TRH de hipófisis de ratón experimenta una rápida transformación a una forma en la cual el TRH no puede ser disociado del receptor en condiciones de fuerza iónica incrementada (66), sugiriendo que la resistencia se debe a un proceso de internalización del complejo hormona-receptor. Este complejo se ha reportado previamente en compartimientos intracelulares (76), y se ha sugerido que el mecanismo es dependiente de clatrina (77).

Se ha propuesto que la resensibilización requiere que el receptor sea internalizado (78), y que la acidificación de las vesículas endocíticas cambia la conformación del receptor permitiendo que fosfatasa específica desfosforilen el receptor y finalmente el receptor sea reciclado a la membrana plasmática (79).

### **1.8.- MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑALES DE LA TRH EN ADENOHIPOFISIS.**

El receptor de la TRH en adenohipófisis se acopla a la fosfolipasa C (PLC- $\beta$ ) a través de una proteína Gq/11 (59,60); es el mecanismo de transducción de señales de la TRH más conocido. La activación de esta vía, estimula la producción de diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP3). El calcio y el DG son responsables (entre otros eventos) de la activación de ciertas isoformas de la proteína cinasa C (PKC), las cuales fosforilan residuos de serina y treonina de proteínas blanco.

La TRH controla la concentración de calcio intracelular de varias maneras:

1.- Movilización de calcio del retículo endoplásmico dependiente de IP3, el cual produce un incremento inicial en la concentración de calcio intracelular (80,81,82,83).

2.- Disminución del incremento inicial de la concentración de calcio intracelular, posiblemente a través de la activación de una bomba de calcio en la membrana

plasmática (84).

3.- Estimulación de un influjo de calcio extracelular, el cual causa una segunda fase de incremento en la concentración de calcio intracelular más persistente que la primera (80,81,82,83). Este incremento puede ser mediado por la activación de la PKC durante la fase 1, la cual activa canales de calcio sensibles a voltaje (CCSV) y sensibles a dihidropiridinas en membranas de células GH (85).

Se ha reportado que el receptor de la TRH interactúa directamente con una proteína Gs para la activación de la adenilil ciclasa (AC) (86). Sin embargo, también se ha sugerido que los efectos de la TRH sobre la producción de adenosin monofosfato cíclico (AMPC) pueden ser mediados por la proteína cinasa C (PKC) o la calmodulina actuando sobre la actividad de la AC (87,88,89). En los lactótopos, existen dos subtipos de receptores para TRH y dopamina generados por procesamiento transcripcional alternativo. Para el caso del receptor de la dopamina, la isoforma truncada se acopla negativamente a la PLC mientras que la isoforma no truncada se acopla negativamente a la AC, ambas a través de una proteína Gi (88). Es posible que cada isoforma del R-TRH se acople positivamente a través de una proteína Gq a la PLC y a través de una proteína Gs a la AC. Sin embargo, también existen evidencias que indican que un sólo subtipo de receptor puede ser responsable de la generación de señales intracelulares de más de una vía de transducción de señales tanto para la dopamina (89) como para la TRH (86). Estos datos sugieren que si bien, las isoformas del R-TRH pueden activar vías de transducción diferentes a través de proteínas G diferentes, también es posible que un sólo subtipo de receptor pueda dirigir la generación de señales intracelulares de vías de transducción diferentes.

Se ha reportado que la activación de la PLC por la TRH conduce a la movilización de ácido araquidónico (AA) como consecuencia de la hidrólisis del DG por la DG-lipasa. Sin embargo, el principal origen del AA liberado en respuesta a la TRH podría ser la activación de la fosfolipasa A2 citosólica (PLA2c) por translocación a la membrana plasmática, subsecuente al incremento en la concentración de calcio intracelular (85,91).

Se ha mostrado que la activación de receptores unidos a proteínas G tales como los de TRH (90), endotelina (91), trombina (92) y angiotensina II (93), puede resultar en la activación de la proteína cinasa que se activa por mitógenos (MAPK), probablemente a través de la vía de la PLC (90,91,92,93,94,95). La TRH regula la actividad de la MAPK, estimula la formación de complejos RAS-GAP e incrementa la fosforilación de Raf-1 en células GH3. La activación de la MAPK fue dependiente de PKC; sin embargo, parece haber una segunda vía que es independiente de la PKC (90). Varios receptores acoplados a Gq activan a la MAPK a través de una vía independiente de Ras y dependiente de PKC (97). Algunas de las subespecies de PKC tales como la alfa y la delta tienen potencial para la activación de la MAPK (96) y Raf-1 (98). Es posible que la vía independiente de PKC que activa a la MAPK sea a través de Ras y que la vía dependiente de PKC sea a través de Raf-1 o directamente sobre MAPK. No se conocen con precisión cuáles serían las consecuencias de la activación de la MAPK por la TRH. Algunas evidencias sugieren que podría ser la activación por fosforilación de la PLA2 citosólica.

Debido a que la movilización de AA en los lactótopos es un mecanismo potencial de transducción de la señal TRHérgica, se describen a continuación las vías de movilización del AA.

## **2.- MOVILIZACION DE ACIDO ARAQUIDONICO (AA).**

El ácido 5,8,11,14-cis-eicosatetraenoico (20:4) o AA es un constituyente importante de los fosfolípidos de las membranas (hay alrededor de 5-15 % de AA esterificado en los diferentes fosfolípidos). Estudios de incorporación de <sup>3</sup>H-AA en células de adenohipófisis muestran 41 % de incorporación a fosfatidil colina

seguido de un 21 y 19 % en fosfatidil inositol y fosfatidil etanolamina respectivamente (99). En los mamíferos este ácido graso proviene del ácido linoleico (20:3) de la dieta o se ingiere como tal de los alimentos que lo contienen. El principal mecanismo de liberación de AA es a través de la activación directa de la fosfolipasa A2 (PLA2). Los mecanismos responsables de la activación de la PLA2 citosólica mediada por receptor no han sido totalmente dilucidados. Hay evidencias que indican que receptores acoplados a proteínas G pueden directamente (a través de las subunidades de la proteína G) activar a la PLA2 (100,101). Otras evidencias sobre los mecanismos de activación, incluyen incrementos en la concentración de calcio intracelular por influjo de calcio extracelular (102,103), movilización de calcio intracelular (104), fosforilación directa o de proteínas que la regulan, dependiente de PKC (1105,106) o de MAPK (1107,108). El AA puede ser liberado de los fosfolípidos de la membrana, por la PLA2 citosólica(109) o intracelularmente de plasmalógenos (alkil derivados de fosfolípidos) por una PLA2 intracelular (110). Alguna de las rutas indirectas por la cual es también posible la movilización de AA, es a través de la producción de araquidonil-ácil-glicerol por la acción de la PLC sobre los fosfolípidos y posterior liberación del AA del diacilglicerol por la diacilglicerol lipasa (111,112,113). Alternativamente, el diacilglicerol puede ser fosforilado por la enzima glicérido quinasa a ácido fosfatídico el cual puede ser sustrato de una PLA2 específica (111). Otra vía de movilización de AA es por acción de la fosfolipasa D la cual genera ácido fosfatídico, del cual puede liberarse directamente AA (por el mecanismo antes mencionado) o indirectamente del diacilglicerol (al formarse este por acción de una fosfatasa). Finalmente, otra posibilidad de movilización del AA es a través de lisofosfolipasas precedidas de la acción de la fosfolipasa A1 (ver figura 3).

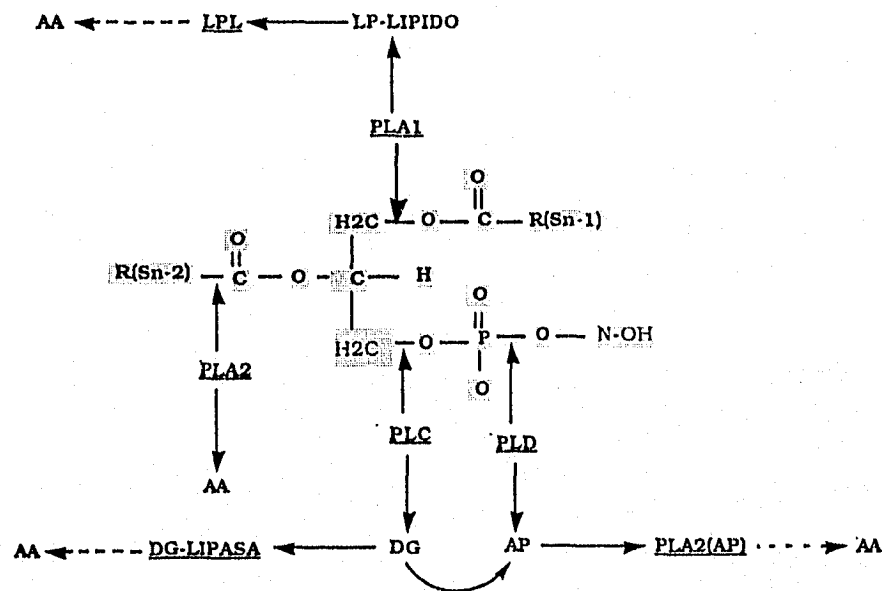


Fig 3: Representación esquemática de la especificidad de las principales fosfolipasas y vías de movilización del AA. (PLA1, PLA2, PLC PLD, LPL, LP-lípido, DG, DG-Lipasa, AP y PLA2(AP)) Fosfolipasas A1, A2, C, D, lisofosfolipasa, lisofosfilípido, diacilglicerol, diacilglicerol-lipasa, ácido fosfatídico, PLA2 específica de AP respectivamente. Las flechas cortadas indican las vías indirectas de la movilización del AA.



## **2.1.- FOSFOLIPASAS A2.**

Existen varias clases de fosfatidil-2-acilhidrolasas (PLA2; E.C.3.1.1.4) identificadas en mamíferos. Existen PLA2 de bajo peso molecular que son transportadas hacia el exterior de la célula; otras se encuentran embebidas en la fase lipídica de la membrana plasmática y otras son intracelulares.

Todas las PLA2 clonadas y secuenciadas, muestran una absoluta conservación de los residuos His-48, Asp-49, Asp-99 y Tyr-52 (114,115). Se propone que son elementos importantes para la catálisis y posiblemente para la especificidad. El mecanismo catalítico de todas las PLA2 es virtualmente el mismo, y la geometría de los residuos en el centro activo es similar (114).

Las PLA2 que se secretan, incluyen a las PLA2 de jugo pancreático y fluido sinovial. De su estructura primaria se deduce una secuencia de 20 aminoácidos en el amino terminal que contiene un alto grado de homología con la secuencia señal característica de las proteínas que se secretan (116). Para su actividad requieren concentraciones de calcio milimolar y no muestran selectividad absoluta para los ácidos grasos esterificados en la posición sn-2 de los fosfolípidos (100). De las PLA2 membranales, se ha demostrado una PLA2 localizada sobre la superficie extracelular de células neuronales y gliales en cultivo (101) y una enzima similar se ha reportado en neutrófilos de conejo (117).

De las PLA2 intracelulares, hay por lo menos dos tipos. Un tipo cuyo sustrato es intracelular y es importante en la generación del factor activador de las plaquetas (derivado acetilado de 1-O-alkil-2-acil-Sn-glicero-3-fosfolina), y la PLA2 citosólica (PLA2 c) que contiene una secuencia de elementos homólogos a la región C de la PKC, región implicada en la unión del calcio (118). La PLA2 c se transloca del citosol a la membrana plasmática y sus sustratos son los fosfolípidos (118,119), requiere calcio para su actividad y es selectiva para los fosfolípidos que tienen esterificado AA en la posición sn-2 del esqueleto del glicerol (120).

## **2.2.- IMPORTANCIA DE LAS FOSFOLIPASAS A2 Y LA MOVILIZACION DE ACIDO ARAQUIDONICO.**

Existe actividad fosfatidil acil-2-hidrolasa en la mayoría de las células y tejidos. La PLA2 c participa en la liberación y generación de mediadores lipídicos o eicosanoídes en respuesta a hormonas, neurotransmisores, factores de crecimiento, autocoides y otros ligandos (100,121). Las PLA2 son importantes en el mantenimiento de la integridad de la membrana celular, acoplando la síntesis y el recambio de los ácidos grasos en los fosfolípidos de la membrana (122).

La peroxidación de fosfolípidos es acompañada por un incremento en la actividad acil-hidrolasa de la PLA2 (123), debido probablemente a que los ácidos grasos poli-insaturados susceptibles de peroxidación, se encuentran principalmente esterificados en la posición sn-2 de los fosfolípidos (111). Así, la PLA2 contribuye a la detoxificación de lípidos peróxidos o hidroperóxidos.

Otra función importante de las PLA2 es la generación de lisofosfolípidos y del factor activador de las plaquetas (PAF). Los lisofosfolípidos son detergentes biológicos que deben ser rápidamente degradados por una lisofosfolipasa o ser reaclados por una aciltransferasa. Por otro lado, los lisofosfolípidos pueden tener funciones fusogénicas.

El PAF es generado a través de una reacción de deacetilación-reacetilación iniciada con la hidrólisis del plasmalógeno de fosfatidilcolina (1-O-alkil-2-acil-sn-glicero-3-fosfolina) por una PLA2 intracelular y el 1-O-alkil-2-liso-sn-glicero-3-fosfolina (liso-PAF) generado es acetilado a PAF por una acetil-CoA:liso-PAF acetil transferasa (110). Tiene importantes funciones sobre: quimiotaxis, adherencia, degranulación y metabolismo oxidativo.

### **2.3.- EFECTOS INTRACELULARES DEL ACIDO ARAQUIDONICO.**

Una vez liberado, el AA puede ser metabolizado o interactuar con otros sistemas de transducción de señales.

Hay evidencias de que el AA liberado en respuesta a estímulos hormonales específicos puede interactuar con la vía de transducción de la PLC (124), y regular por retroalimentación la actividad de la PLA2.

En la rata, la liberación de hormona luteinizante inducida por la hormona liberadora de gonadotropina es mediada por la movilización de AA a través de la acción de la PLA2, así como por la acción de la diacilglicerol lipasa una vez que se ha activado la PLC (125). De este modo, la PLA2 y la PLC pueden actuar de una manera mutuamente regulatoria en la liberación de AA, amplificando la respuesta y aumentando la diversidad y preferencia de las proteínas que serán blanco de los segundos mensajeros que se generen.

Se ha propuesto, que solamente los ácidos grasos libres y no los que se encuentran esterificados en los fosfolípidos de la membrana son capaces de activar a algunas subespecies de PKC en el citosol. Las subespecies alfa y gamma de PKC pueden ser activadas por AA más calcio y por bajos niveles de AA sin calcio, respectivamente (126,127). Las isoformas independientes de calcio pueden ser activadas por los ácidos grasos *cis*-insaturados, sugiriendo que la activación de algunas subespecies de PKC puede ocurrir en el citosol por ácidos grasos libres (AA) y en la membrana por diacilglicerol (128). También se ha propuesto que los ácidos grasos *cis*-insaturados que activan la PKC (127,129,130) pueden actuar directamente en la membrana o producir cambios en las propiedades biofísicas de la membrana que promueven una mayor disponibilidad de diacilglicerol (131,132). Finalmente, se ha reportado que el AA puede regular la vía de Ras (133).

### **3.- INTRODUCCION A LOS EICOSANOIDES.**

Una vez liberado el AA de los fosfolípidos de la membrana se metaboliza rápidamente a varios compuestos cíclicos eicosatetraenoides, eicosatrienoides y otros metabolitos los cuales en conjunto se denominan eicosanoides. Estos eicosanoides se generan por medio de tres rutas metabólicas principales: ciclooxigenasa (Cox), lipoxigenasa (Lox) y epoxigenasa (Epox). Se ha mostrado que en la hipófisis la mayoría de los productos del metabolismo del AA son del tipo de la vía Lox (55%), mientras que las otras vías son minoritarias (Epox (29%) y Cox (1-20%) (134)).

Algunas de estas vías, pueden también producir metabolitos a partir del ácido eicosatrienoico (20:3) y ácido eicosapentaenoico (20:5). A continuación, nos referiremos solamente a los eicosanoides derivados del AA.

#### **3.1.- METABOLISMO DEL AA POR LA VIA CICLOXIGENASA.**

Todos los tipos de células de mamíferos estudiadas hasta ahora tienen enzimas microsomales ciclooxigenasas (EC 1.14.99.1) para la síntesis de prostaglandinas (PGs). La prostaglandina H2 sintasa (PGHS-1) se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células. La PGH-2 cuya expresión basal es baja o no detectable, es fuertemente inducida en respuesta a estímulos proinflamatorios (135,136).

El mecanismo oxidante de las PGHS se lleva a cabo por dos pasos catalíticos principales:

1.- El AA es oxigenado para formar el lípido cíclico hidroperóxido inestable o PGG2. La actividad responsable de este paso es referida como PGHS ciclooxigenasa

2.- El grupo hidroperóxido de la PGG<sub>2</sub> es reducido a un alcohol produciendo un compuesto más estable o PGH<sub>2</sub>. La actividad responsable de este paso es referida como PGHS peroxidasa.

La PGHS-1 se localiza en el retículo endoplásmico y la envoltura nuclear. El sitio activo de la actividad peroxidasa se encuentra en la superficie de la proteína orientada hacia el citosol. En contraste, el sitio activo que contiene la actividad ciclooxigenasa se encuentra en el interior de la membrana (137). La síntesis de PGs es inhibida por las drogas tipo aspirina, las cuales provocan la acetilación irreversible de un residuo de serina que afecta la actividad ciclooxigenasa o ambas (138). Por procesos de isomerización y reducciones enzimáticas de la PGH<sub>2</sub> se forman las demás prostaglandinas, y por mecanismos aún no conocidos, se forman también, la prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) y los tromboxanos (Tx<sub>s</sub>) (139) (ver figura 4). Cada prostaglandina difiere en la posición de un grupo en el anillo ciclopentano (CP), en la presencia y posición de dobles enlaces, así como la posición espacial del grupo OH en el carbono número nueve del anillo CP. Se designan de acuerdo con los sustituyentes que contienen y con el número de dobles enlaces carbono-carbono en la cadena lateral. Las clases principales se designan como A, B, E, F y subclases por ejemplo, E1, E1-alfa y F2-alfa. Alfa designa la configuración del hidroxilo en el carbono número nueve, y el subíndice indica el número de dobles enlaces en la cadena alifática.

Los tromboxanos tienen el anillo CP interrumpido por un átomo de oxígeno (oxano). En la síntesis de Tx<sub>s</sub>, primeramente se forma un compuesto con un anillo bicíclico axano-axetano inestable (TXA<sub>2</sub>), el cual rápidamente se convierte al oxano estable (TXB<sub>2</sub>).

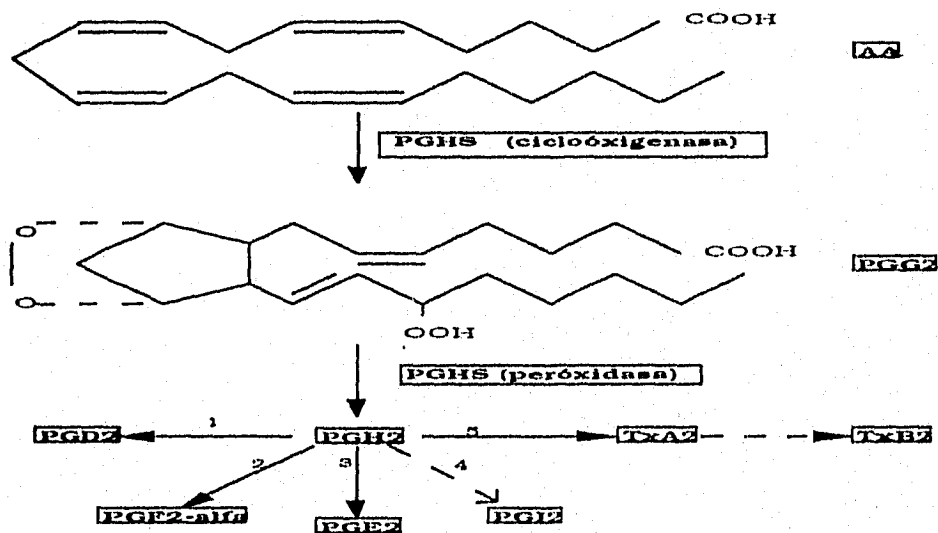


Fig. 4: Representación esquemática del metabolismo del ácido araquidónico por la vía ciclooxigenasa. Enzimas involucradas:

1) PGH-D isomerasa, 2) PGD<sub>2</sub>-H cetoreductasa 3) PGH-E isomerasa 4) prostaciclina sintasa 5) tromboxano sintasa.

Las flechas cortadas indican procesos no enzimáticos o no conocidos.

### 3.2.- METABOLISMO DEL AA POR LA VIA LIPOXIGENASA.

Las lipoxigenasas (araquidónico oxígeno oxidoreductasa; E.C.1.13.11.12) constituyen una familia de enzimas dioxigenasas que contienen hierro no hémico. Están ampliamente distribuidas tanto en plantas como en animales. En los animales el sustrato más importante es el AA y cantidades considerables de estas enzimas se han encontrado en la hipófisis de porcinos (140). Dependiendo de la especificidad posicional de la reacción de lipoxigenación, las lipoxigenasas se dividen en tres tipos: 5,12 y 15-Lox.

La enzima 5-Lox se localiza en el citosol; sin embargo, se demostró que en la presencia de calcio hay una translocación de la enzima a la membrana que es reversible después de la remoción del calcio (141). La unión de la enzima a la membrana se propone como un paso previo a su activación. Sin embargo, se encontró que la 5-Lox unida a la membrana puede ser inactivada o inhibida (142). Se ha postulado que ésta inactivación puede deberse en parte a la producción de radicales intermediarios.

La 5-Lox de mamíferos es activada en la presencia de una proteína activadora (143) calcio y ATP. Esta proteína activadora es un componente integral de la membrana plasmática y parece activar a la 5-Lox facilitando su unión a la membrana (144), y proporcionándole el AA (145).

Se ha propuesto como modelo, que la enzima ferrosa (5-Lox-Fe<sup>2+</sup>) debe ser oxidada a la forma férrica (5-Lox-Fe<sup>3+</sup>) para ser activada.

La enzima férrica se une y oxida al sustrato (AA), produciendo el complejo E-(Fe<sup>2+</sup>)-AA<sup>ox</sup> y en la presencia de oxígeno este complejo consume un mol de O<sub>2</sub> para producir el complejo E(Fe<sup>3+</sup>)-P. A continuación, el complejo se disocia y queda la enzima férrica activa más el producto (146).

El proceso catalítico por las lipoxigenasas comprende dos pasos:

1.- Abstracción de un hidrógeno metílico doble alílico por la acción oxidante del ion férrico.

2.- Introducción de dioxígeno en el radical butadienil unido a la enzima.

Generalmente, ambos procesos actúan con especificidad posicional y estérica (154). El primer paso en las vías Lox es la formación de ácidos hidroperoxieicosatetraenoicos (HPETEs) (148,149,150,151,152,153) que son subsecuentemente convertidos a ácidos hidroxieicosatetraenoicos (HETEs), dihidroxieicosatetraenoicos (DHETEs) o trihidroxieicosatetraenoicos (THETEs), dependiendo de si la reacción de lipoxigenación ocurre una, dos, o tres veces en la misma molécula. Los THETEs pueden formarse además, por una vía no enzimática. Varios de estos metabolitos son inestables y se convierten por reducción a sus correspondientes ácidos monohidróxidos.

Por la vía 5-LOX se producen los leucotrienos (LTs) a partir de 5-HPETE. El LTA<sub>4</sub> es el primero de la serie. Es un epóxido inestable que puede ser hidrolizado a 5,12- y 5,6-DHETE. La leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolasa (LTA<sub>4</sub>H) puede transformar el LTA<sub>4</sub> en el LTB<sub>4</sub> por hidratación (154,155,156,157). Su actividad ha sido detectada en virtualmente todos los tejidos de la rata así como en el plasma de varias especies (158). La LTA<sub>4</sub>H es una Zn-metaloenzima que contiene la secuencia consenso para la coordinación del Zn (HEXXH) (159,160). Pertenece a la familia de las gluzincinas y al grupo de las aminopeptidasas (161). El LTC<sub>4</sub> se forma a partir del LTA<sub>4</sub> por acción de la gamma glutamil S-transferasa (162), uniéndole el péptido glutatión a través de un enlace tioéter de la cisteína. Los péptido-leucotrienos unidos por el enlace de la cisteína pueden ser procesados enzimáticamente a nivel del glutatión. El LTD<sub>4</sub> se forma a partir del LTC<sub>4</sub> por la acción de la gamma glutamil transpeptidasa la cual remueve el ácido glutámico, y la remoción subsecuente de glicina por la cisteinil glicinasa da el LTE<sub>4</sub>. El LTE<sub>4</sub> también puede ser formado por una ecto-dipeptidasa a partir del LTD<sub>4</sub> (163) y en microsomas de hígado puede ser N-acetilado.

La 12-LOX es la principal lipoxigenasa en el cerebro (164,165,166). El producto de lipoxigenación 12-HPETE puede ser metabolizado a varios compuestos incluyendo hepoxilinas, las cuales a su vez pueden ser metabolizadas a trioxilinas (139).

Finalmente, del producto de lipoxigenación 15-HPETE se producen las lipoxinas (ver figura 5), las cuales contienen una estructura tetraeno conjugada y tres grupos alcohol.

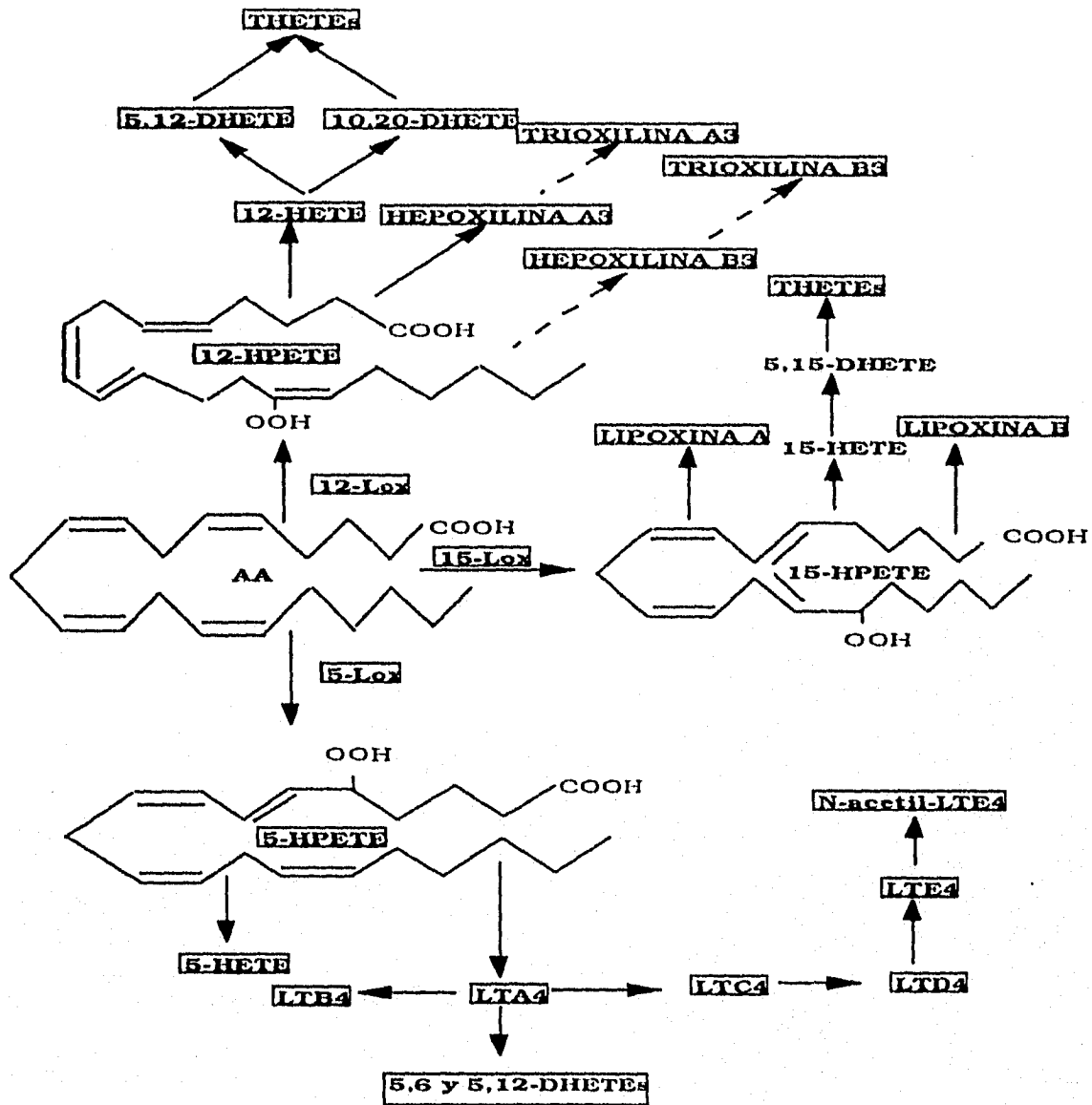


Fig. 5: Representación esquemática del metabolismo del ácido araquidónico por la vía Lipoxigenasa.

Las enzimas que se han encontrado involucradas en el metabolismo de esta vía se describen en el texto. Las flechas cortadas indican procesos no enzimáticos o no conocidos. Modificado de Shimizu y Wolfe (139)

### 3.3.- METABOLISMO DEL AA POR LA VIA EPOXIGENASA.

Existen evidencias de que el AA puede ser metabolizado a epóxidos por un sistema monooxigenasa microsomal en células de adenohipófisis (167,168).

La vía epoxigenasa (EpoX) del AA también se conoce como la vía del citocromo P-450. El sistema citocromo P-450 constituye una familia de proteínas membranales no relacionadas estructuralmente, que metabolizan una gran cantidad de drogas, xenobióticos y sustancias endógenas.

El mecanismo catalítico es dependiente de NADPH y oxígeno molecular (169). El AA se une a una enzima citocromo P-450 oxidada ( $Fe^{+3}$ ), el complejo enzima-substrato resultante es reducido por la citocromo P-450 reductasa y luego se combina con el oxígeno molecular. El citocromo P450 metaboliza al AA por tres tipos de reacciones:

- 1.- Oxidación alílica que conduce a la formación de ácidos hidroieicosatetraenoicos (HETEs).
- 2.- Epoxidación, resultando en la formación de ácidos 5,6-; 8,9-; 11,12-; 14,15-epoxieicosatrienoicos (EETs) y sus correspondientes ácidos dihidroxieicosatrienoicos (DHETs).
- 3.-  $\omega$  y  $\omega-1$  hidroxilación para dar 20,5- y 19-HETE, así como 20-HETE y 20-COOH-AA (170,172). En endotelio vascular, el producto 20-HETE puede ser metabolizado por la vía Cox a compuestos tipo prostanoídes o endoperoxidos (171). Los EETs son metabolizados por la enzima epóxido hidrolasa a DHETs y HETEs, algunos de los cuales también son producidos en la vía lipoxigenasa.

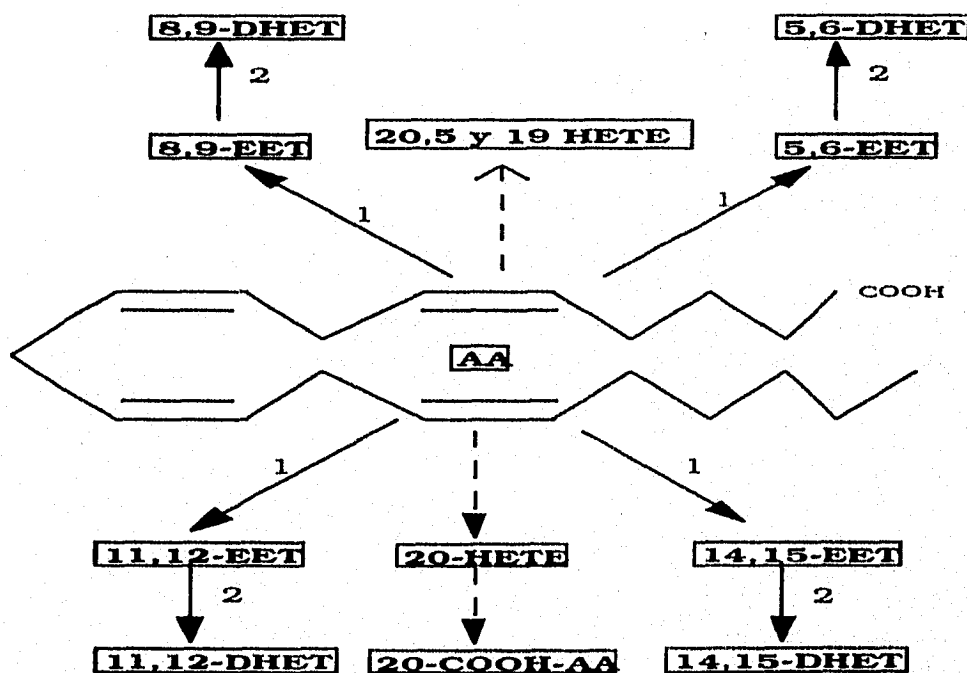


Fig. 6: Representación esquemática del metabolismo del ácido araquidónico por la vía Epoxigenasa (citocromo P-450). Enzimas involucradas:

1).- Citocromo P-450, 2).-Epóxido hidrolasa.

Las enzimas involucradas en la generación de los productos indicados con flechas cortadas no se encontraron descritos en la bibliografía.

### **3.4.- EFECTOS DE LOS METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO.**

Los efectos de los metabolitos del AA pueden ser directos o a través de receptores y transducción de señales.

Se ha reportado la existencia de varios receptores a eicosanoides, principalmente para leucotrienos y prostaglandinas. Se ha sugerido que el receptor del LTD4 se encuentra acoplado a una proteína G y que ejerce su efecto induciendo la entrada de calcio la cual se ha relacionado directamente con un incremento en los niveles de AMPc (173). El LTB4 activa a la proteína cinasa Raf-1 y a la MAPK en eosinófilos de cuyo a través de la activación de un receptor y por un mecanismo aparentemente independiente de la PKC (174). Otros leucotrienos pueden inhibir la actividad del complejo Ras-GAP y por lo tanto, estabilizar el estado activo de Ras (Ras-GAP) (174). Fiore et al (175) reportaron un cDNA que codifica para un receptor con siete dominios transmembranales que une con alta afinidad tanto al LTD4 como a la lipóxina A4. Experimentos *in vivo*, muestran que la lipoxina A4 antagoniza los efectos del LTD4, posiblemente por competencia sobre un receptor común (176). En cuanto a las prostaglandinas, se sabe que sus efectos pueden estar mediados por incrementos en la concentración de AMPc actuando a través de un receptor acoplado a una proteína G (137). Existen otros efectos de los metabolitos del AA para los cuales no se ha podido mostrar que sean mediados a través de la activación de receptores específicos para estos metabolitos y transducción de señales.

Los leucotrienos en general, estimulan la contracción del músculo liso, promueven la secreción de mucosa bronquial, la secreción de algunas hormonas, pueden afectar el flujo de iones a través de la membrana plasmática y se consideran mediadores en procesos de hipersensibilidad. Los péptido-leucotrienos (LTC4, D4 y E4) juntos forman lo que anteriormente se conocía como sustancia de reacción lenta anafiláctica (177,178).

El papel fisiológico de los productos de las vías 12 y 15-Lox no está bien caracterizado. Sin embargo, se ha reportado que pueden estar involucrados en el rompimiento de las membranas mitocondriales durante la maduración de células hematopoyéticas (179).

Los productos de la vía Epox, principalmente el 5,6 y 14,15-EETs y sus productos hidrolíticos (DHTEs), pueden afectar funciones neuronales y el flujo sanguíneo cerebral, afectando principalmente el tono vascular de vasos y arterias.

Los prostanoides (prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos) son mensajeros autócrinos o parácrinos involucrados en una gran variedad de respuestas celulares tales como la agregación plaquetaria, inflamación (inducción de edema, dolor y piresis), vasodilatación y vasoconstricción (137). Sin embargo, en órganos como el riñón, médula y tejido reproductivo, las PGs tienen funciones no relacionadas con procesos inflamatorios. En el SNC las PGs modulan procesos febriles, nociceptivos y el sueño.

### **3.5.- CATABOLISMO DE LOS METABOLITOS DEL ACIDO ARAQUIDONICO.**

Existen eficientes mecanismos para el catabolismo e inactivación de casi todos los metabolitos del AA. En términos generales, las reacciones catabólicas son de dos tipos: un paso inicial relativamente rápido, catalizado por enzimas específicas, donde los metabolitos pierden la mayor parte de su actividad biológica, y un segundo paso (relativamente lento) en el que son oxidados por enzimas probablemente idénticas a las responsables de la beta y omega oxidación de casi todos los ácidos grasos. Durante la beta oxidación peroxisomal del AA se requiere de una dienoil-CoA reductasa y una dienoil-CoA isomerasa para la remoción de los

carbonos de número impar de la cadena hidrocarbonada (180).

Algunas enzimas que intervienen en el catabolismo de la vía Cox son la 15-hidroxi prostanoato deshidrogenasa y la delta 13-reductasa, las cuales producen dihidro compuestos. Estas enzimas se encuentran en la mayoría de los tejidos, pero son particularmente abundantes en el hígado, riñón y pulmón. Otros procesos catabólicos contribuyen a la degradación de los metabolitos de esta vía en un gran número de productos como el malondialdehído (MDA) y el ácido 12-hidroxiheptadecatrienoico, los cuales son formados por la descomposición directa de los endoperóxidos.

Otra fuente de inactivación se produce por conjugación de epoxicompuestos y otros derivados del AA con acetato y glutatión principalmente, para formar derivados glucurónidos o mercaptúricos que son secretados por la bilis y la orina de los organismos.

#### **4.- SECRECIÓN DE PROLACTINA.**

En la adenohipófisis la prolactina se sintetiza sobre poli-ribosomas en el retículo endoplásmico rugoso, inicialmente como un precursor. Posteriormente a través de cortes proteolíticos se produce la molécula biológicamente activa, la cual es transferida al aparato de Golgi donde es empacada en gránulos de secreción.

A la llegada de un estímulo, se dispara una cadena de eventos que conducen a la liberación del contenido de los gránulos (181,182). La liberación de prolactina está asociada a la activación de múltiples mecanismos de transducción de señales. Los mecanismos involucrados en la liberación de PRL incluyen, modulación de la concentración intracelular de AMPc, alteraciones de los flujos de calcio, alteraciones de la actividad fosforil transferasa, hidrólisis de fosfoinosítidos, movilización de AA y posiblemente otros.

La secreción de la PRL puede ser modulada por un gran número de sustancias neuroendócrinas, de las cuales las más comúnmente estudiadas son los neuropéptidos TRH, péptido intestinal vasoactivo (VIP), angiotensina II (AII), neurotensina (NT), bombesina y la amina dopamina (DA). Estas sustancias difieren en cuanto a su mecanismo principal de transducción de señales.

TRH, AII, NT y bombesina producen un incremento en la hidrólisis de fosfoinosítidos, produciéndose los segundos mensajeros DG e IP<sub>3</sub> y la subsecuente activación de la PKC. Por otro lado, la DA y el VIP tienen efectos sobre la concentración intracelular de AMPc.

Estas mismas neurohormonas que afectan la secreción de PRL, también tienen un efecto sobre la movilización de AA (183,184,185,186) con la posible excepción del VIP. Esto ocurre por un mecanismo aún no esclarecido que puede involucrar la participación de la PLA<sub>2</sub>, o indirectamente a través de la activación de la PLC.

#### **4.1.- REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA.**

La regulación de la secreción de prolactina es compleja y muchas neurohormonas estimulan su secreción, pero su significado fisiológico es controversial. Tal vez de los más importantes por su relevancia fisiológica sean la TRH como factor estimulador de la secreción de prolactina y la dopamina como factor inhibidor.

La TRH está presente en grandes concentraciones en la sangre del tallo hipofisiario (187,188). Durante la lactancia las concentraciones de PRL en el suero se incrementan en forma paralela con incrementos en la concentración de la TRH en el tallo (187). También, los niveles de PRL pueden incrementarse después de tratamientos con estrógenos (189), afectando su síntesis y almacenamiento (190,191) e incrementando el número de receptores a la TRH en adenohipófisis (192). La respuesta secretoria a la TRH varía de acuerdo con las condiciones



fisiológicas de los lactótopos afectando preferencialmente la liberación de PRL previamente almacenada, sin afectar la liberación de la hormona recién sintetizada (193). Se ha demostrado que la TRH induce una secreción bifásica de PRL dependiente de incrementos en la concentración de calcio intracelular. Un incremento inicial en la concentración de calcio intracelular dependiente de IP<sub>3</sub>, produce una fase inicial de secreción de PRL. El influjo de calcio extracelular a través de CCSV produce una segunda fase de secreción de PRL que es dependiente de la activación de la PKC (80,81,82,83).

En células GH3 se han reportado interacciones del receptor de la TRH con proteínas G para la activación de la adenilil ciclasa (87) y tal vez, la generación de AMPc también esté involucrada en la secreción de PRL. Por otro lado, se ha sugerido que la tirosin fosforilación por la MAPK puede ser otro de los mecanismos involucrados en la secreción de PRL estimulada por la TRH (90).

Las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA) se asocian anatómicamente con los vasos portales hipofisarios (194,195). Estas neuronas tienen sus cuerpos celulares en el núcleo arcuato, y sus axones se prolongan a la eminencia media (196,197). La DA secretada por estas neuronas tiene una concentración en sangre portal suficiente para ocupar aproximadamente el 80% del receptor D2 en adenohipófisis (198) y mantener una inhibición tónica de la secreción de PRL. Disminuciones en la concentración portal de DA pueden suceder en respuesta a varios estímulos fisiológicos. Por ejemplo, en respuesta al estímulo de succión mamaria (199,200,201) y al final de la preñez (202).

Las disminuciones en la concentración de DA resultan en un incremento en la velocidad de disociación de la DA de su receptor (203), activando vías de transducción de señales que estimulan la secreción de prolactina. El receptor D2 DAérgico en la adenohipófisis se acopla de manera negativa a la AC (204,205,206,207,208). Sin embargo, también existen evidencias de que la acción inhibitoria de la DA puede ser mediada a través de la inhibición del sistema Ca<sup>2+</sup>/PKC (209,210,211) y que receptores a DA en los lactótopos se acoplan de manera negativa a la PLC (212,213). El resultado de estas interacciones es una disminución en la concentración de calcio intracelular (209).

La activación del receptor D2 DAérgico en células de adenohipófisis inhibe corrientes de calcio dependientes de voltaje, aumentando la conductancia al potasio (214). Finalmente, la DA inhibe la secreción de PRL y la movilización de AA estimulada por la TRH así como el efecto del AA sobre la secreción de PRL (215) posiblemente afectando la concentración de calcio intracelular o la actividad de la PLA2.

#### **4.2.- EFECTO DE EICOSANOIDES SOBRE LA SECRECIÓN DE PRL.**

TRH, AII Y NT inducen la liberación de AA en células de adenohipófisis; las cinéticas de liberación del AA son similares a las cinéticas de liberación de PRL inducida por estos secretagogos (216).

Se ha demostrado que la melitina, quien potencia la actividad de la PLA2, estimula la liberación de PRL en cultivos de células de adenohipófisis (217,218). Además, la quinacrina y el dibromofenasil (DBP), dos inhibidores de la actividad de la PLA2, inhiben la liberación basal de PRL *in vitro* y la estimulada por la TRH y por el VIP (218).

Hay muchas evidencias experimentales que muestran que el AA exógeno o algunos de sus metabolitos estimulan la liberación de PRL en los lactótopos (219,220) y líneas celulares tumorales que secretan PRL y hormona de crecimiento (221,222). El incremento en la secreción de PRL estimulada por TRH, AII, NT, VIP, AA o agentes que incrementan la concentración intracelular de calcio es atenuada por inhibidores del metabolismo del AA (183,186,215,219,221,223,224,225,226). Se han observado incrementos paralelos en los niveles de AA y LTC<sub>4</sub> en células de

adenohipófisis y líneas celulares tumorales, cuando son estimuladas por la TRH o por la activación de canales de calcio con maitotoxina (MTX) (181,225). Algunos metabolitos de la vía Lox potencian aun más la secreción de PRL que el AA (219), lo que sugiere que probablemente el AA liberado por la PLA2 es metabolizado a eicosanoídes que estimulan la secreción de la PRL.

Los productos de la vía Cox del AA como las prostaglandinas no tienen efectos directos sobre la secreción de PRL en los lactótopos. Sin embargo, estudios desarrollados *in vivo*, muestran que las PG's estimulan de manera indirecta la liberación de PRL, hormona de crecimiento y hormona luteinizante (228,229). Se ha sugerido que las PG's pueden aumentar la excitación de neuronas hipotalámicas y de esta manera afectar la secreción de hormonas adenohipofisarias (230).

*In vivo*, los efectos de la administración intracerebroventricular de PGs sugieren que la acción sobre la secreción de PRL es ejercida predominantemente a nivel hipotalámico ya que la administración de PG's directamente a la glándula hipofisaria o introducida a los vasos del sistema porta hipotálamo-hipofisario, no tiene efecto sobre la secreción de PRL (226,227). Sin embargo, estudios *in vitro* han mostrado que la inhibición de la ciclooxigenasa con indometacina puede producir un incremento en la liberación de PRL y se propone que el efecto puede ser una consecuencia de una mayor disponibilidad del AA para ser metabolizado por otras vías.

Los productos de la vía 5-Lox como los LT's estimulan la secreción de PRL en células de adenohipófisis de una manera bifásica (219). Los leucotrienos B,C y D4 potencian la liberación de PRL en condiciones estimuladas por la TRH, pero no tienen efecto sobre la secreción basal (191). Otros metabolitos de las vías 5 y 15-Lipoxigenasa como 5 y 15-HETEs pueden estar también involucrados en la secreción de PRL (229,243). Se ha reportado que la inducción de la liberación de PRL por la TRH en líneas celulares que secretan PRL está asociada con un incremento paralelo en la formación de 15-HETE (231).

Si se inhibe la vía Lox del AA con el ácido nordihidroguaiarético (NDGA) se bloquean los efectos del AA, TRH y PLA2 exógena sobre la secreción de PRL (229,244,245). Similarmente, nafazatrom, un inhibidor de la enzima 5-Lox o un análogo del AA (ETYA, inhibe el metabolismo del AA) suprimen la secreción de PRL estimulada por la TRH así como la estimulada por el VIP (246). Los productos de la vía epoxigenasa tales como 5,6 y 14,15-EETs también tienen efecto sobre la secreción de PRL en cultivos de células de adenohipófisis (247).

Acercas de los mecanismos de transducción de señales de los metabolitos del AA sobre la secreción de PRL, se ha reportado que inhibidores del metabolismo del AA inhiben la secreción de PRL estimulada por la TRH sin tener efecto sobre la producción de fosfatos de inositol en células GH4C1 (246).

Por otro lado, la inhibición de la PLA2 o del metabolismo del AA reducen la secreción de PRL estimulada por incrementos en la concentración de AMPc. Sin embargo, el AA liberado por la acción del tratamiento con PLA2 exógena no tiene efecto sobre la acumulación total de AMPc. Por lo tanto se sugiere que puede haber un punto de convergencia al final de la cascada de eventos de diferentes vías de transducción de señales o sobre el proceso de exocitosis, en el cual los metabolitos del AA pueden estar actuando sobre la secreción de PRL.

El LTC4 potencia la liberación de PRL inducida por la TRH, MTX o TPA. En presencia de nafazatrom, el incremento en la concentración intracelular de calcio inducida por la TRH fue significativamente disminuida (246), indicando que los metabolitos del AA están involucrados en la regulación de la concentración intracelular de calcio en un paso distal a la producción de IP3 o AMPc, ya que al parecer no tienen efecto sobre la producción de fosfatos de inositol (fase inicial de la secreción de prolactina) o sobre la actividad de la AC. Se ha mostrado que metabolitos de la vía lipoxigenasa del AA inducidos por secretágonos o AA exógeno incrementan el flujo de calcio (236,237). Por estudios de fijación de voltaje en

células GH3, se ha mostrado que los efectos del AA sobre la secreción de prolactina están relacionados con una disminución en la corriente de calcio y un incremento en la corriente de calcio dependiente de voltaje que afectan la frecuencia o duración del potencial de acción. De acuerdo con esta hipótesis, metabolitos de la vía 5-Lox incrementaron el potencial de acción (238) y el NDGA disminuyó la conductancia al calcio e inhibió el disparo del potencial de acción (239).

Por otro lado, la DA y el SRIF (somatostatina) atenúan el proceso de secreción de PRL y la liberación de AA inducida por secretagogos (186,215,240,241) probablemente a causa de que estos inhibidores de la secreción de PRL disminuyen la concentración de calcio intracelular, ya que la inhibición de la secreción de PRL y de la liberación de AA por DA es similar al efecto que causa la remoción del calcio extracelular (242,243).

Esto sugiere que los metabolitos del AA inducidos por secretagogos se generan después de un incremento inicial en la concentración de calcio intracelular. También sugiere que los incrementos en la concentración de calcio inducidos por MTX o A23187 producen incrementos en la movilización y metabolismo del ácido araquidónico y que estos metabolitos actúan sobre la secreción de prolactina, incrementando la concentración de calcio intracelular.

## **5.- PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II (PPII).**

La PPII es una proteína integral de membrana. No se solubiliza de la membrana por tratamientos con fosfolipasa C tipo III de *Bacillus cereus*, lo que sugiere que el anclaje a la membrana no es a través de residuos de fosfatidilinositol glicano (244). El análisis por cromatografía de exclusión molecular de esta enzima en condiciones nativas, indica una masa molecular aparente de 230 Kd y en condiciones reductoras desnaturizantes se obtiene una masa molecular aparente de 116 Kd. Con estas evidencias, se asume que la enzima consiste de dos subunidades idénticas asociadas por interacciones proteína-proteína no definidas (244). El significado de la estructura dimerica de la enzima no se conoce, pero algunos estudios indican que el ensamblaje oligomérico de proteínas puede ser importante para el transporte intracelular (245).

La banda de 116 Kd observada en electroforesis bajo condiciones desnaturizantes reductoras, sufre una reducción en su masa molecular aparente de 116 Kd a alrededor de 100 kd después de tratamientos con glicosidasas, mostrando la naturaleza glicoproteica de las subunidades de la enzima (244).

Se ha mostrado que la actividad de esta enzima es sensible a agentes quelantes de metales, e insensible a inhibidores específicos de cisteína, aspártico o serina proteasas (43,246,247,248). La clonación y secuenciación del cDNA de la PPII (figura 7) demostró que esta enzima es una Zn-metalopeptidasa de la familia de las gluzincinas, ya que contiene en su dominio extracelular una secuencia consenso (HEXXH) y un residuo de ácido glutámico que junto con las dos histidinas de la secuencia consenso sirven para formar el complejo de coordinación tetrahedral con el zinc durante la catálisis (40). Contiene un cierto grado de homología (33%) con dos Zn-metalopeptidasas integrales de membrana, las aminopeptidasas A y N.

AAGAAGAAAAAG AAGAGGAAGAAAGAGGAGGAGAGGGGGCC GAGAAGAGCAGTTCAGCGTTTCCGGCCACC  
 M G E D D A A L R A S Q R G L S D P W A D S V G V R P R T I E R H I A V H K R L  
 ATGGGAGAAACCCCGCTCCGGGCA AAGGGCAAGGGCTCCGACCCCTGGGCT GACTCGTGGAGTGAAGACCCGCAACCAG GARGGGACATGGCAGTGCAGAGAGGCTT  
 V L A F A V S I V A L L A V I M L A V L L S L R F D E C G A S A A M P R T D G G  
 GTGCTGGCTTTCGGTTCGATCGTGGCA CTGCTGGCTTCACCATGCTGGCCGCTAGT GTGAGCTCGGTTGACAGTGTGGAGCC AGCGGGGCAATGGCGGACCCAGCGTGG  
 L G G F P E R G G H S S Y P G S A H R H H A R E E S Q R E I G E V G T A G T  
 CTCGAGAGCTCCCTGAGGCTGTGAGCAAC AGCACTACCAAGATCTGCGCGGCGCAAC CAGCAGCGGGTGAAGAACTCTGCGAGCGT GAGATCGGAGTGTGGACACCGGGAGC  
 P S A H P S E E E Q E Q W P W T Q L R L E G H L K P L H Y N L L T A F H E  
 CCCTCTCCCATCCCGCTGGAGGAGAG CARGAGCAATGRCAGCCCTGGACTCAGCTG CAGCTATCGGGCAGCTTAAGCGCTGGAC TACAATTTGATGCTCAGCGCTTCATGGAG  
 N F T F B Q E V N V E I A G Q N A T R Y V V L H A S R V A V E K V Q V A E D R A  
 AACITCACCTTCGTGGAGAGTCAAGCTG GAHATCGGCTCCAGAACCCGCGCTAG GTGCTACGACACCTCCCGGGTGGCGGTG GAGAAGGTGCAAGTATGGGAGACCGGGCG  
 F G A V P V A G F F L Y P Q T Q V L V V V L N R T L D A Q R H Y N L K I I Y N A  
 TTCCGAGCTGCGGCTAGCAGGCTTTTC CTCTCCCAAAAGCAGTCTTGGTGGTGT GTGCTGAAATAGAACCTGGATGCGCAGAG GAGTACAATGAGATTAICTACAATGCC  
 L I E N E L L Q F F R S S Y V I H G E R R F L G V T Q F S P T H A R K A F P C F  
 CTGATGAGAACCGAGCTTTGGGCTTCCT CCGACCTCTAGTATCCAGCGGGAGAGA AGATTTCTCGATGTACTCAGTTTTCACCT ACACATGCCAGAAAGAGCTTCATGTTT  
 D E P I Y K A T F K I S I K H Q A T Y L S L S N M P V E T S V F E E D G W V T D  
 GATGAACCAATCTACAAGGCCAATTTCAA ATCAGCATCAAACTCAAGCAACCTATTTC TCTCTCCCAACTGGCCGTGGAAACACT GTGTTTGGAGAGATGGATGGGTAAACAGAT  
 H F S Q T P L M S T Y Y L A W A I C H F T Y R E T T T K S G V V V R L Y A R P D  
 CACTTTTCAGAGCCCTCTATGTCGACA TATTATTAGCCGCGGATTTGCAACTTC ACATACAGAGAACTACTCCAAGAGTGGG GTTGTGATCGATTAATGCAAGACCCGAC  
 A I R R G S Q D Y A L H I T K H L I E F Y E D Y F K V P Y S L P K L D L L A V P  
 GCTATCGAAGAGGATCCGGGACTATGCT CTCACATTACAAGAGATTAAGAATT TATGAAGACTACTTTAAAGTCCCTATTCT TTGCCAAAACAGATCTTITAGCTGTGCT  
 K H P Y A A M E N W G L S I F V E Q R I L L D P S V S S I S L L D V T M V I V  
 AAGCTCTTATGCTGCTATGGAGAACTGG GGACTAAGTATTTTGGGAACAAGGAATA CTGCTGGATCCCAAGTGTGCTATTTCT TATTTCGTGATGTCACCTATGCTATGTT  
 H E I C H O W F Q D L V T P V W W E D V W L K E G F A H V F E F V G R F D Y L V P  
 CATGAATATGTCACCACTGATTTGCTGAC CTGTGACCCCAATGTGTGGAAAGATGTG TGGTGAAGGAAGGCTTGGCTACTACTTT GAATTTGCTGATGACAGTACCTTACCTT  
 S W N H E K Q H F L T D V L H E V M L L D G L A S B H P V G Q E V E W A T D I D  
 TCTGGAACTGGAAAGCAGAGGTTCTG ACAGATGTTCTGATGAAGTATGCTGCTT GAGCGTTGGCCAGTTCGCACTCAGTATCA CAGGAGTGTGACGGCAACAGATTTGAC  
 K V F D W A Y K K G A A L R M A H F M G H S V F O R G L O D Y L T I H K Y  
 AAG TGTTCAGTGGATCCATACAAAAG GGTGCTGCTTATAAGAATGCTGGTAA TTTAGGGCCATTCAGTTTTCAGAGGGGA TTGCAAGTATTTAACCATTACAAGTAT  
 N A A R N D L W N T L S E A L K R N G K Y V N I Q E V M D K Y V N I Q E V M D  
 GGCATTCAGCCAGAAATGATCTCTGGAAT ACATTATCAGAGGCTTTAAAAGGAAATGGA AAATAITGAGCAATACAGAGGTAATGGAT CAGTGGACATCCAGATGGGATATCCGTT  
 I T I L G N M T A E N R I L I Q H F I Y D I G A K T K A L Q L O M Q G S Y L  
 ATTACATCTGGGAACTGACGGCAGAA AACAGAACTACTATCAGCCAAACAGCACTC ATTTAGGATATCGGTGCTAAAACCAAGGA CTTCACTTCAAAACAGCAGTTACCTGTGG  
 Q I P L T I V V G N R S H V S G E A I I W V S N K S E H H P I T Y L D O L I R N H  
 CAGATTCGATTAACCATGCTGTAGGAAAT AGAAGCCATGCTCTTCAAGCAATATT TGGGTGCTCAAAACAGCAATCAGAGA ATAACATCTTACAGCAAGGACATGGATG  
 L G N I N Q T G Y F R V N Y D L R N W R L L I D O L I R N H E V L S V S N R A G  
 CTGGAAACATCAATCAACTGCTACTTTC AGAGTCAACTATGACCTAAGGAAGTGGAGA TTACTGATCGATCAGTTAATCAGGAAACAT CAGGATCTTCTGTCAGTAAACCTGGACGG  
 L I D D A F B L A H A G Y L P Q N I P L E I R Y L S E E K G A T T I C T G T T G G C A T G G C C A G C C G A  
 C I G A T G A T G C C T C A G C C T G C C A G I  
 A L Y P L D K L L D R M E N Y N I F N E Y I L K O V A T T Y S K L G W P K N N F  
 Q C T T T A C C T C T G G A T A A T T A C T G A C  
 N G S V V Q A S Y Q H E E L R R E V I M T A T A T C T A A A C A A G T G G C A A C C T A C A H Q Q A S T L I S D  
 AATGGCTGTGCTCAAGCTTCCATGAA CATGAAGAGCTACGGAGGGAGTATGATG TTGGCTGTAGCTTGGGACAAAGCAGTGT CAGCAGCAGGCTCAACTCTTATTGAGAC  
 W I B S N R N R I P L N V R D I V Y C T G V S L D E D V W E F F W M K F H S T  
 TGGATTCAGCAATAGAAACAGAAATACCA CTGAATGTTAGAGACATGCTCTACTGCACA GAGATGCTCCCTGGATGAGGATGCTGG GAATTCATCTGGATGAATTCGACTCCAC  
 T A V S E K I L L E A V T C S D R H D G S R S L H L V G N S E V V L D Q D A  
 ACTGCAATTTCTGAAAAAAGATATTGCTG GAGGCGCTAATCTGCAATGATCAGGAAAT TTACTAAGTAGGCTCTGAATCTGCTCTG AATTCAGAGTGGTGTGGATCAAGATGCA  
 I D D V I I N V A Y R N P H G R D L A W K F F R D K W K I L N T R Y G E A L F H N S  
 ATGATGTAATATCCAGTACCGAGAAAT CCACATGCCGAGACCTTGGCTGGAGTTT TTAGAGATAAATGGAAATCTAATAATCC AGGATGGAGAGCAATTTATTGAAATG  
 K L I S Q V T E F L N T E G E L K E L K H F M K S Y D G V A S A S F S R A V E T  
 AAATCTATCAGTGGAGTTACAGAAATTCCT AATACAGAAAGGTGAACCTTAAAGAGCTAAAG AACTTCATGAAGTCTATGATGGGGTAGCA TCTGCTTCTTCTCAGAGCCGTGGAAACC

Fig. 7 : Secuencia nucleotídica del cDNA de la PPII y la deducción de su estructura primaria. La secuencia doblemente subrayada es la secuencia hidrofóbica que probablemente corresponde a la parte que atraviesa la membrana. Los sitios probables de glicosilación están de verde. La tirosina 381 y la treonina 30 (de rojo) se consideran sitios putativos de sulfatación y fosforilación respectivamente. La secuencia consenso de la región de coordinación del zinc está en azul.

**5.1.- DISTRIBUCION.**

La PPII se encuentra ampliamente distribuida en el SNC. En cerebro y médula espinal su distribución es muy heterogénea. La corteza cerebral posterior y el bulbo olfatorio son regiones del cerebro con niveles altos de actividad. En la adenohipófisis la actividad de esta enzima es mas baja (250) restringida principal o exclusivamente a los lactótrofos (251). Otros órganos como el páncreas, no presentan actividad detectable (252). A nivel celular, la PPII de cerebro se encuentra asociada casi exclusivamente con células neuronales, mientras que las células gliales están desprovistas de esta actividad (253). Por fraccionamiento subcelular se ha demostrado que la enzima está enriquecida en terminales nerviosas del cerebro (40) localizada sobre la membrana plasmática (44). Posiblemente está sobre la membrana plasmática de las células postsinápticas.

## 5.2.- REGULACION DE LA PPII ADENOHIPOFISIARIA.

La PPII en la adenohipófisis es regulada por hormonas tiroideas. En estudios *in vivo*, se ha observado un incremento considerable en la actividad de la PPII después de tratamientos con hormonas tiroideas (253,254) acompañada de un rápido retorno a los niveles de actividad basal después de la última inyección de la hormona. Así mismo, se ha observado un incremento considerable en los niveles del RNAm de la PPII en la adenohipófisis, después de tratar ratas eutiroides con triyodotironina (T3) durante cuatro horas, alcanzando niveles máximos (10 veces más que en el control) después de 6-24 horas. Los niveles del RNAm de la PPII variaron de manera opuesta cuando las ratas eutiroides fueron tratadas con el agente goitrogénico propiltiouracilo (induce un estado hipotiroideo en el animal) disminuyendo a niveles de 40-15 % del control después de 1- 4 días del tratamiento (72).

La actividad de la PPII en la adenohipófisis, también es influenciada por el estado estrogénico. En ratas ovariectomizadas, la actividad de la PPII se incrementó varias veces comparado con las hembras intactas y disminuyó rápidamente a niveles basales con una terapia de reconstitución a base de benzoato de estradiol (255). Los niveles de RNAm de la PPII son varias veces más altos en las ratas macho que en las hembras y en las ratas macho disminuyen drásticamente a apenas el 10% del nivel basal después de 4-6 horas de tratamiento con estrógenos (256).

Estos resultados muestran que la actividad de esta enzima en la adenohipófisis puede ser regulada de manera positiva por hormonas tiroideas y de manera negativa por los estrógenos. Aparentemente, estos efectos hormonales son a nivel de la transcripción del gen de la PPII y/o de la estabilidad del ARNm.

Durante el ciclo estral, se han reportado fluctuaciones de la actividad de la PPII de una manera opuesta a los niveles de RNAm de la TRH (257). Si bien, estas fluctuaciones se pudieran deber al efecto del estradiol es posible que otros efectores también participen.

Se ha reportado que la actividad de la PPII en cultivos primarios de células de adenohipófisis es regulada de manera negativa por tratamientos prolongados con la TRH, efecto que pudiera ser mediado por la activación de una isoenzima de la PKC vía la activación del receptor, ya que un efecto similar sobre esta enzima se observa después de tratamientos prolongados con tetradecanoil-forbol-acetato (TPA), un activador de la PKC. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de que otros efectores también puedan estar involucrados (258).

Estudios recientes muestran que en cultivos primarios de células de adenohipófisis, la actividad de la PPII es regulada negativamente por incrementos en la concentración intracelular de AMPc. Sin embargo, los efectos de la TRH mas forskollina o toxina del cólera (ambas drogas incrementan los niveles de AMPc por mecanismos diferentes) por tiempos prolongados (16 horas) son aditivos. Esto sugiere que el efecto inhibitorio de la TRH sobre la actividad de la PPII es independiente de la producción de AMPc (Vargas et al, en preparación).

Todos los eventos previos son relativamente lentos (horas). Sin embargo, una fase de inactivación rápida de la PPII se ha reportado en cultivos de células derivadas de retinoblastoma, después de tratamientos cortos (minutos) con TPA (259). También estudios preliminares realizados en el laboratorio, sugieren que pudiera existir un efecto inhibitorio rápido de la TRH sobre la actividad de la PPII.

### III.- OBJETIVOS.

En vista de que tanto la TRH como otras neurohormonas movilizan rápidamente ácido araquidónico de los lactótopos, el cual puede ser subsecuentemente metabolizado, se decidió determinar si la movilización del AA puede afectar la actividad de la PPII a corto plazo (minutos). Para lograr este objetivo, se trazaron las siguientes metas.

- 1).- Determinar si la activación de la PLA2 con melitina a dosis que tienen un efecto sobre la secreción de PRL, tiene un efecto sobre la actividad de la PPII.
- 2).- Determinar el efecto del AA administrado exógenamente sobre la actividad de la PPII a concentraciones que también tienen efecto sobre la secreción de PRL.
- 3).- Evaluar el efecto de otros ácidos grasos poli-insaturados con propiedades lipofílicas similares a las del AA, como control.
- 4).- Analizar el efecto de la inhibición de las enzimas ciclooxigenasa, lipoxigenasa y del metabolismo del AA, sobre estas respuestas.
- 5).- Analizar si el TRH sólo o en combinación con melitina o AA tiene algún efecto sobre la actividad de la PPII a tiempos cortos.

### IV.- MATERIALES Y METODOS.

#### IV.1.- ANIMALES.

Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 80 a 100 días de edad y un peso aproximado de 280 grs. Se mantuvieron en condiciones controladas de luz-obscuridad, acceso a agua y alimentos *ad libitum*.

#### IV.1.- REACTIVOS.

Los ácidos grasos (araquidónico, oleico y linoleico), los inhibidores de la PLA2 (dibromofenacil (DBP) y clorhidrato de quinacrina) así como los inhibidores del metabolismo del ácido araquidónico (indometacina, ácido eicosatetraenoico (ETYA), ácido nordihidroguaiarético (NDGA)) y la melitina se obtuvieron de los laboratorios Sigma (St. Louis Mo, USA).

El TRH se obtuvo de los laboratorios Península (Belmont, Cal; USA) y el <sup>3</sup>H-TRH de la compañía New England Nuclear (Boston, Mass; USA).

El "Dulbecco's modified eagle's medium" (DMEM), suero fetal bovino, vitaminas y antibióticos-antimicóticos se adquirieron de los laboratorios Gibco BRL (Grand Island, N.Y., USA).

Los ácidos grasos araquidónico, oleico, linoleico y ETYA se prepararon bajo condiciones en las cuales se evitó en lo posible la exposición a la luz y al aire. Las soluciones concentradas se almacenaron en DMSO 25 % y (100 % en el caso de ETYA) en atmósfera de nitrógeno. La melitina se diluyó en agua de cultivo y el TRH en ácido acético 0.01 %.

Después de cada toma de alícuotas de la solución concentrada el AA se burbujeó de nuevo con gas nitrógeno. En nuestras condiciones de manejo, el AA se mostró inestable al transcurrir el tiempo y no se tomaron en cuenta los resultados de los experimentos en los cuales se consideró que el AA, por el continuo uso y exposición al medio ambiente presentaba algún grado de autoxidación.

#### **IV.3.- CULTIVO DE CELULAS DISPERSAS DE ADENOHIPOFISIS.**

Las hipófisis se obtuvieron rápidamente después de la decapitación de las ratas. Las adenohipófisis se separaron de los lóbulos neurointermedios y se disecaron en pequeñas partes (8-12). Los pedazos se lavaron de 2 a 3 veces con una solución de albúmina bovina sérica (BSA) 0.3 % en DMEM. A continuación, los pedazos de adenohipófisis (de 15 ratas) se incubaron a 37° C durante 15 minutos con tripsina 0.5% en DMEM y transcurrido el tiempo se añadió DNasa a una concentración de 2ug/ul y se dejó en incubación dos minutos más. Después de la digestión enzimática se retiró el medio y los pedazos de tejido se incubaron durante cinco minutos con inhibidor de tripsina (0.1 mg/adenohipófisis). Posteriormente se incubaron en medio libre de calcio y magnesio en presencia de EDTA (2 mM) durante ocho minutos y después a una menor concentración de EDTA (1 mM) durante quince minutos más. Al terminar la incubación se retiró el sobrenadante y los pedazos de adenohipófisis se lavaron dos veces con solución C (NaCl 6.8 mg/ml, KCl 0.4 mg/ml, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14 mg/ml, NaHCO<sub>3</sub> 2.2 mg/ml, glucosa 1 mg/ml, rojo fenol 0.01 mg/ml, BSA 2.8 mg/ml y antibióticos-antimicóticos 5.0 mg/ml ). Después del segundo lavado, los pedazos de adenohipófisis fueron resuspendidos nuevamente en solución C y dispersados mecánicamente con pipeta pasteur de punta flameada. Las células dispersadas fueron centrifugadas a 1800 RPM durante diez minutos y resuspendidas en DMEM suplementado con 10 % de suero fetal bovino, 2 mM de glutamina, 14 mM de glucosa, vitaminas y antibióticos-antimicóticos así como 10<sup>-8</sup> M de triyodotironina para inducir la expresión de la PPII.

Las células se contaron en una cámara de Neubauer enfocada en un microscopio óptico y la viabilidad se determinó por medio de una prueba de exclusión de azul de tripano y se calculó como el porcentaje de células vivas (excluyen el colorante) con respecto al número total de células obtenidas. El rendimiento de los cultivos se determinó como la cantidad de células vivas obtenidas por cada adenohipófisis. En todos los experimentos los rendimientos fueron de alrededor de 3.5 millones de células por adenohipófisis y la viabilidad superior al 90 %.

Las células se sembraron a una densidad de un millón de células vivas por cada pozo (cajas de cuatro pozos de 16 mm de diámetro) en 1 ml de DMEM suplementado y se incubaron en una estufa con atmósfera saturada de humedad, 95% de oxígeno y 5% de bióxido de carbono hasta el día del tratamiento, haciendo un cambio de medio al tercer día.

#### **IV.4.- TRATAMIENTOS.**

Todos los tratamientos se hicieron al quinto día del cultivo y las drogas se añadieron directamente al medio. Las concentraciones del solvente (DMSO) fueron menores a 0.01 mM, concentración a la cual no tiene efecto sobre la actividad de la PPII. En los experimentos en los cuales se determinó la concentración de prolactina, el medio se reemplazó por medio fresco antes de añadir las drogas.

Después de la incubación con las drogas, las células fueron lavadas dos veces con "Ringer Krebs bicarbonato" (RKB: NaCl 125 mM, KCl 4.4 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.2 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.3 mM, glucosa 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 2.5 mM) para poder iniciar la determinación de la actividad enzimática de la PPII por un método radiométrico. En algunos casos, después de los tratamientos y del ensayo de la actividad de la PPII se evaluó el efecto del tratamiento sobre la viabilidad de los cultivos. Después del tratamiento y antes del ensayo, un cultivo tratado (1 caja) y una caja control se observaron bajo el microscopio de contraste de fases y se compararon la morfología de las células, la adhesión a la superficie de los pozos y macroscópicamente se observaron las diferencias en la coloración del medio de

cultivo que sugiriesen diferencias de PH. Inmediatamente después del ensayo de la actividad de la PPII un cultivo tratado y un control se lavaron dos veces con RKB y se realizó una prueba de exclusión de azul de tripano, añadiendo a cada pozo 190 ul de DMEM, 10 ul de azul de tripano diluido 1:10 en PBS y las células se observaron al microscopio de contraste de fases evaluando la permeabilidad de las células al colorante. En otros casos el medio de cultivo se colectó en tubos eppendorf y se congeló a -70° C para la posterior cuantificación de prolactina por radioinmunoensayo (RIA).

#### **IV.5.- DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA PIROGLUTAMIL PEPTIDASA II.**

Las células fueron incubadas con <sup>3</sup>H-TRH (200,000 cpm's) y 200 ul de TRH no radiactivo 10<sup>-6</sup> M en RKB a 37° C (en un caso, el tratamiento con AA fue durante la medición de la actividad; ver leyendas); se tomaron alícuotas de 13 ul a los tiempos 0,5,10, y 15 ó 0, 8 y 16 minutos de iniciada la reacción y fueron colocadas sobre papel Whatman P-81 de intercambio iónico previamente lavado. La cromatografía ascendente se desarrolló en cámaras saturadas con ácido acético 1M. El producto de la reacción enzimática His-(<sup>3</sup>H-Pro)-NH<sub>2</sub> (no migra durante la cromatografía y se queda a la altura de la línea de aplicación) se eluyó con hidróxido de amonio 2 M agítandose durante 10 minutos en viales a los cuales se les agregó posteriormente líquido de centelleo para su cuantificación en un contador de radiaciones beta.

Después del ensayo enzimático, las células se lavaron con RKB para la cuantificación de proteína.

#### **IV.6.- CUANTIFICACION DE PROTEINA.**

Las células fueron tratadas con 750 ul de hidróxido de sodio 1N durante 24 horas a temperatura ambiente. Después de la digestión química, la superficie de los pozos se raspó con el émbolo de una jeringa de 1 ml y el volumen total se colocó en tubos eppendorf que fueron centrifugados a 10,000 RPM durante 10 minutos. De los sobrenadantes se tomaron 100 ul y se completó a un volumen final de 200 ul con agua destilada. La determinación de la proteína se hizo utilizando BSA como estandar de acuerdo al método descrito por Lowry (261).

#### **IV.7.- RADIOINMUNOENSAYO DE PROLACTINA.**

La yodación de la prolactina se realizó haciendo reaccionar la PRL con NaI<sup>125</sup> (1 mCi I<sup>125</sup>) en presencia de cloramina T. La reacción fue terminada añadiendo metabisulfito de sodio en buffer (PBS + EDTA 50mM + BSA 1 %). La purificación de la prolactina yodada se realizó por cromatografía en columna sobre Sephadex G-50 en buffer NaPO<sub>4</sub> 50 mM PH 7.5 y azida de sodio.

El RIA de la prolactina liberada al medio de incubación se realizó utilizando diluciones de las muestras de 1:50, 1:100 y para el caso del anticuerpo se utilizaron diluciones de trabajo de 1:3000. Se incubaron 100 ul de prolactina yodada (10,000 CPM PRL-<sup>125</sup>), 100 ul del anticuerpo, 100 ul de la muestra y 100 ul de buffer PBS + BSA 0.05 % durante 24 horas a temperatura ambiente. Se precipitó el complejo antígeno-anticuerpo con 100 ul de  $\gamma$ -globulina 0.05 % y 500 ul de polietilenglicol 20 %; el sobrenadante se aspiró y se contó la radiactividad en el "pelet".

La cuantificación de la prolactina liberada al medio de incubación se determinó utilizando un estandar y el anticuerpo, siguiendo los criterios del NIH y de Aubert (261).



#### **IV.8.- ANALISIS ESTADISTICO.**

Los datos son expresados como porcentaje de la actividad especifica (pmolas de His-(<sup>3</sup>H-Pro)-NH<sub>2</sub> por minuto por mg de proteína) de la PPII con respecto a los grupos control (es el tiempo cero en las cinéticas).

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) seguido por la prueba de Duncan's, y validando solamente aquellos resultados en los que el nivel de significancia estadístico es tal que  $p < 0.05$ .

Los niveles de significancia estadística se representaron de la siguiente manera:  
 $p < 0.05$  : \*,  $p < 0.005$  : \*\*,  $p < 0.0005$  : \*\*\*

## V.- RESULTADOS.

### V.1.- EFECTO DE LA MELITINA.

Los tratamientos con melitina a una dosis mínima (0.25 ug/ml) causaron un efecto inhibitorio en el rango de 62-65 % sobre la actividad específica de la PPII a los 5 y 10 minutos de tratamiento, seguido de una rápida recuperación de la actividad a niveles por encima del control a los 20-30 minutos (figura 8).

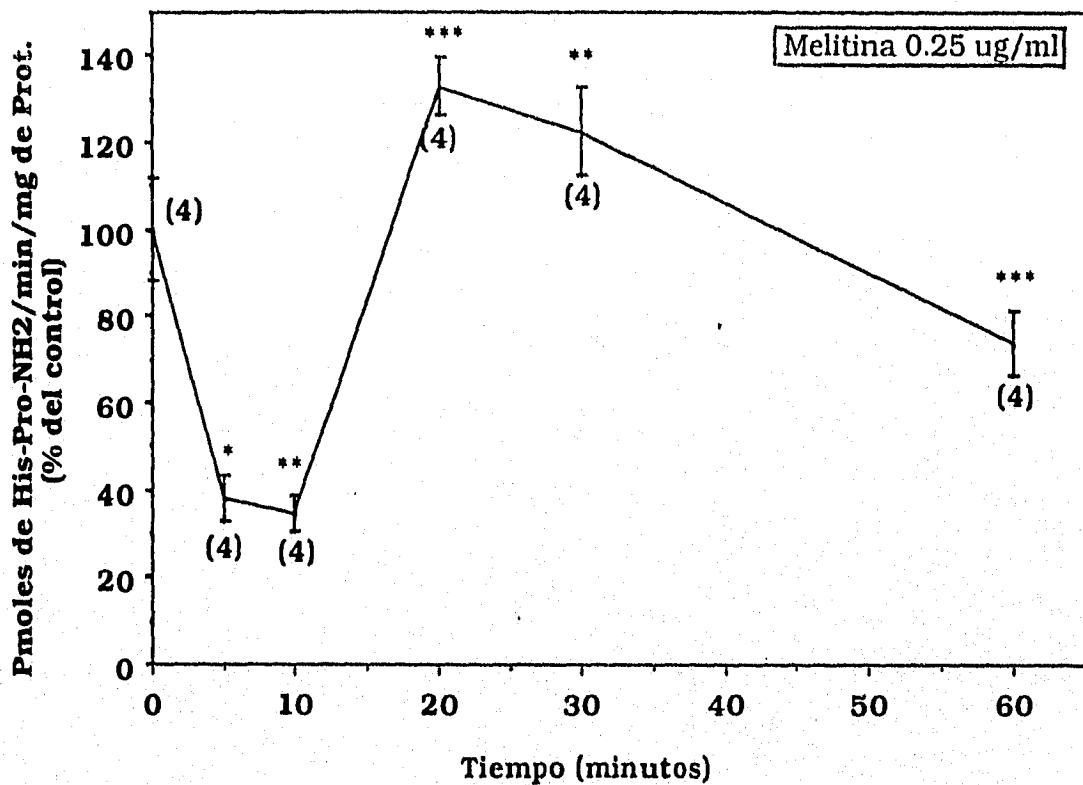


Figura 8: Efecto de 0.25 ug/ml de melittina sobre la actividad específica de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del tiempo cero) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

Una dosis media de melitina (0.5 ug/ml) causó un efecto inhibitorio sobre la actividad específica de la PPII en un rango de 30 a 45 % entre los 20-30 minutos de tratamiento; el efecto es todavía significativo a los 60 minutos (figuras 9 y 10).

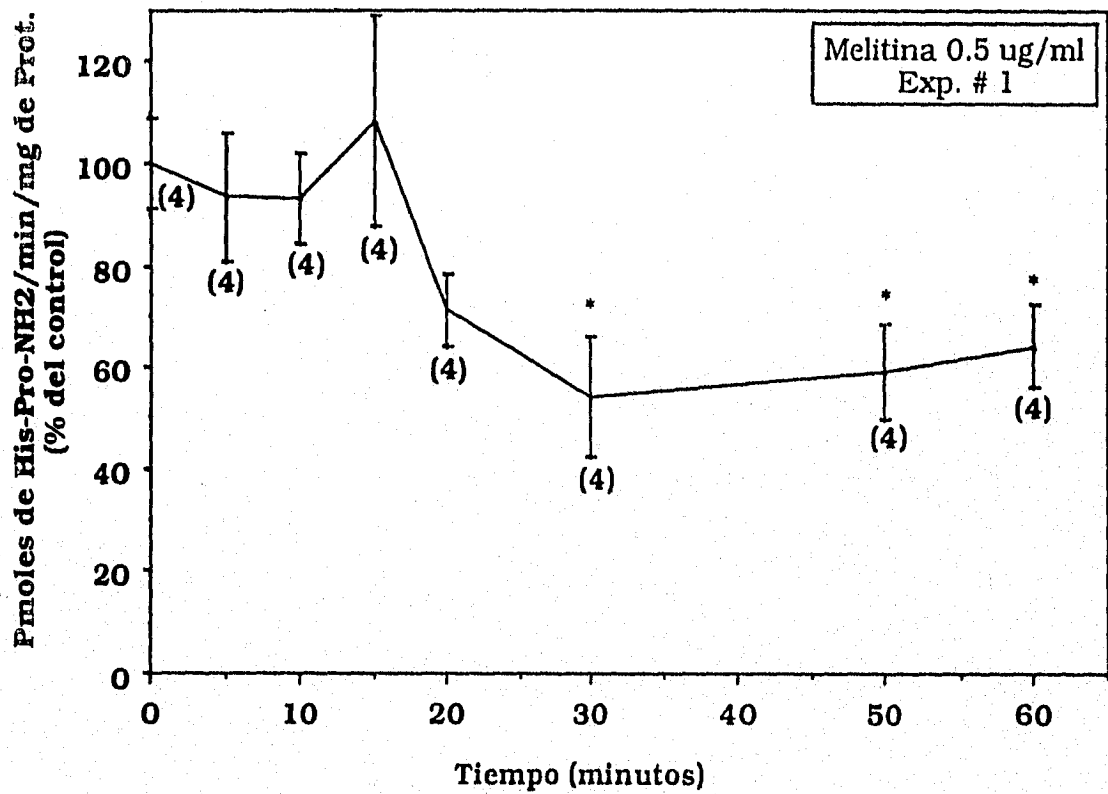


Figura 9 : Efecto de 0.5 ug/ml de melitina sobre la actividad específica de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del tiempo cero) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

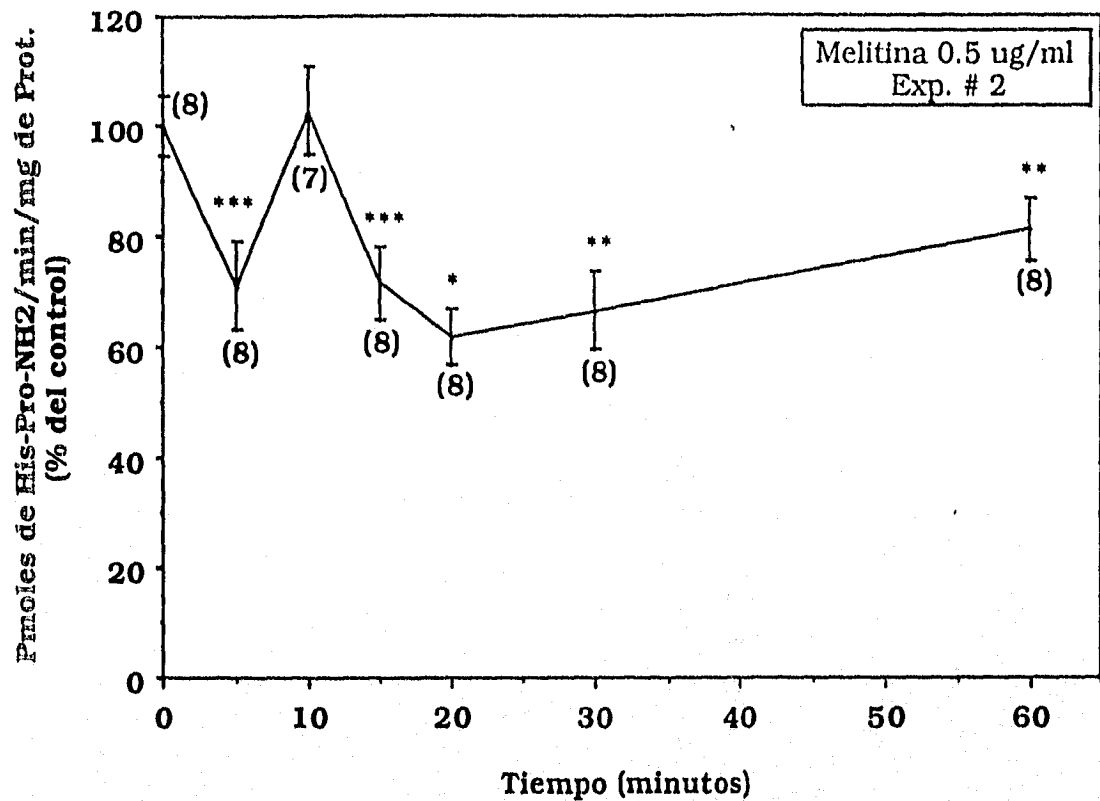


Figura 10 : Efecto de 0.5 ug/ml de melitina sobre la actividad específica de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del tiempo cero) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

Una dosis mayor de melitina (1.0 ug/ml) causó un efecto inhibitorio sobre la actividad total de la PPII en un rango de 31 a 43 % que fue máximo durante el periodo de 20-60 minutos de tratamiento (figura 11).

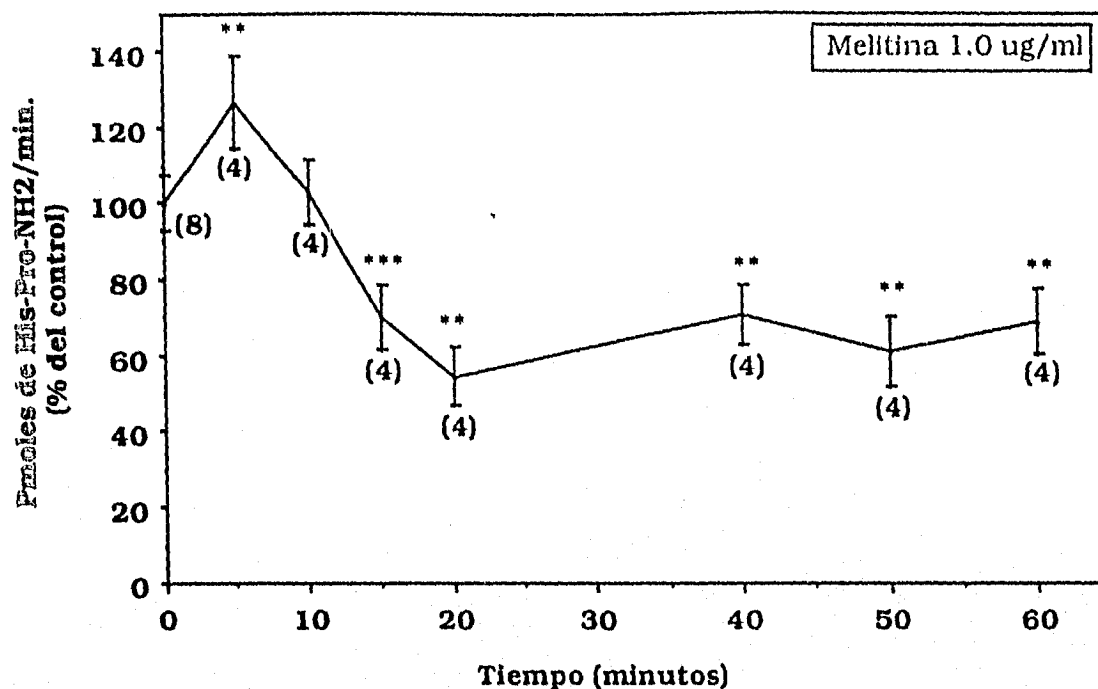


Figura 11 : Efecto de 1.0 ug/ml de melitina sobre la actividad total de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del tiempo cero) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

A tiempos mas largos (4 horas) el efecto inhibitorio de la melitina se mantuvo significativo (tabla I).

Tratamiento	Tiempo	Act. especifica	% de actividad
Control	0	1.59 $\pm$ 0.18 (4)	100 $\pm$ 11.6
Melitina (0.25 ug/ml)	4 hrs.	1.27 $\pm$ 0.08 (4)	79.5 $\pm$ 5.3*
Melitina (1.0 ug/ml)	4 hrs.	0.93 $\pm$ 0.07 (4)	58.8 $\pm$ 4.5**

Tabla 1 : Efecto de la melitina (0.25 y 1.0 ug/ml) sobre la actividad especifica de la PPII después de cuatro horas de tratamiento. Los datos son la media  $\pm$  SEM y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

El propósito de enseñar dos cinéticas diferentes que muestran el efecto de la melitina (0.5 ug/ml) es con la finalidad de mostrar que fueron no siempre reproducibles. Sin embargo, se observó en general, que a los 20-30 minutos de tratamiento el efecto inhibitorio es máximo (dosis 0.5 y 1.0 ug/ml) y más reproducible. Por esta razón, los siguientes experimentos con melitina se realizaron a los 20 minutos de tratamiento. El análisis de los datos también sugiere que las cinéticas varían de acuerdo con la dosis de melitina pero que el efecto máximo es similar a todas las dosis.

Para corroborar que el efecto de la melitina se debe a la activación de la PLA2, se utilizó en forma conjunta la melitina con un inhibidor de la PLA2 (DBP). Los resultados muestran que el efecto de la melitina sobre la actividad específica de la PPII es revertido cuando el DBP está presente (figura 12).

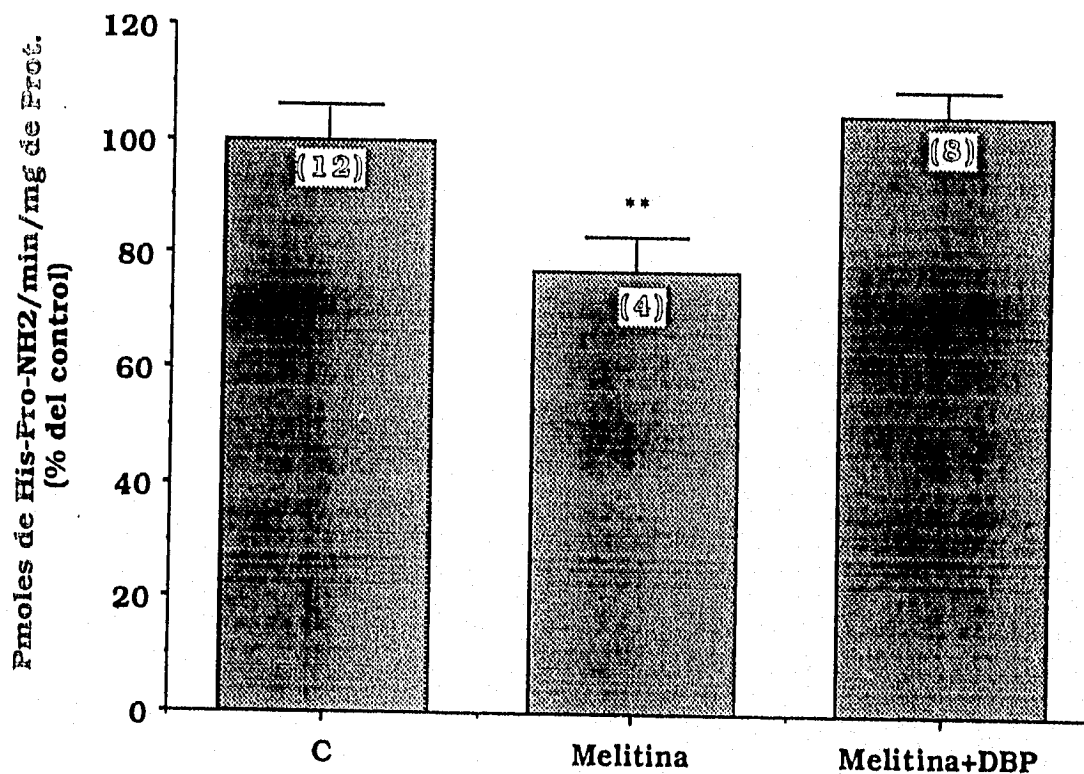


Figura 12 : Efecto de la melitina 0.5 ug/ml y DBP 10 uM (20 minutos) sobre la actividad específica de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del control) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

## V.2.- EFECTO DEL ACIDO ARAQUIDONICO.

La melitina activa a la PLA2 y conduce a la hidrólisis y liberación de AA de los fosfolípidos de la membrana. Para verificar si el efecto de la activación de la PLA2 con melitina se debe a una movilización de AA, se utilizó AA 0.5  $\mu$ M (una dosis que induce liberación de prolactina, ver tabla III) y se analizaron varios tiempos. Los resultados mostraron un efecto similar al causado por la melitina con una inhibición máxima de la actividad específica de la PPII en el rango de 41 a 72 % a los 20 minutos de tratamiento (figuras 13, 14 y 15). En general la inhibición con AA fue reversible aunque en una de las cinéticas mostradas, la inhibición a los 60 minutos es todavía significativa (figura 15); a tiempos más largos (4 y 24 horas) no hubo efecto significativo (datos no mostrados).

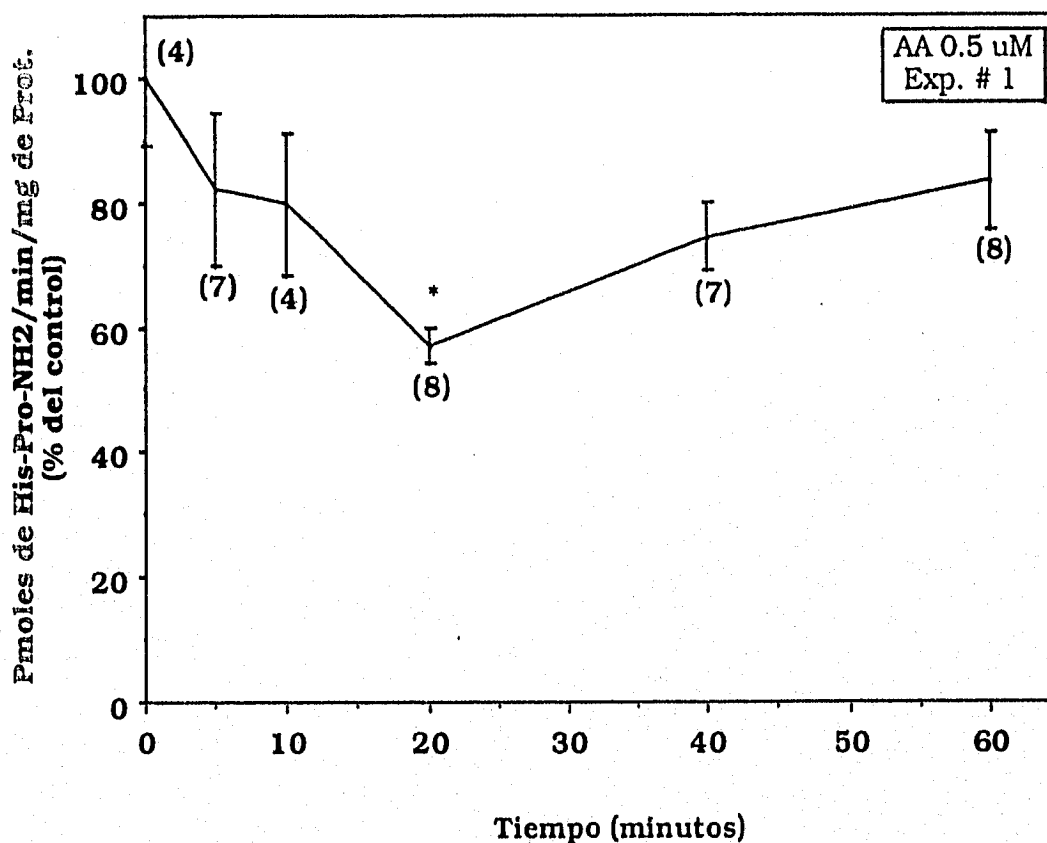


Figura 13 : Efecto del ácido araquidónico 0.5  $\mu$ M sobre la actividad específica de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del tiempo cero) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

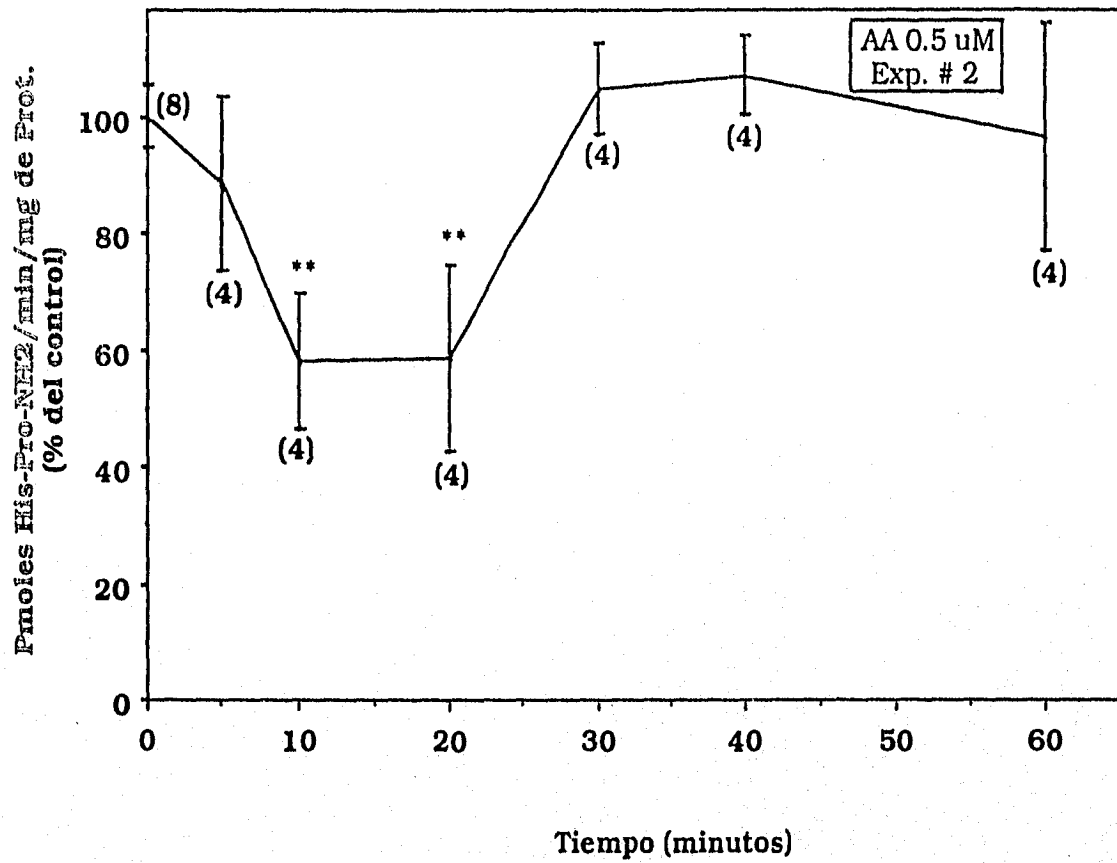


Figura 14 : Efecto del ácido araquidónico 0.5 uM sobre la actividad específica de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del tiempo cero) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.



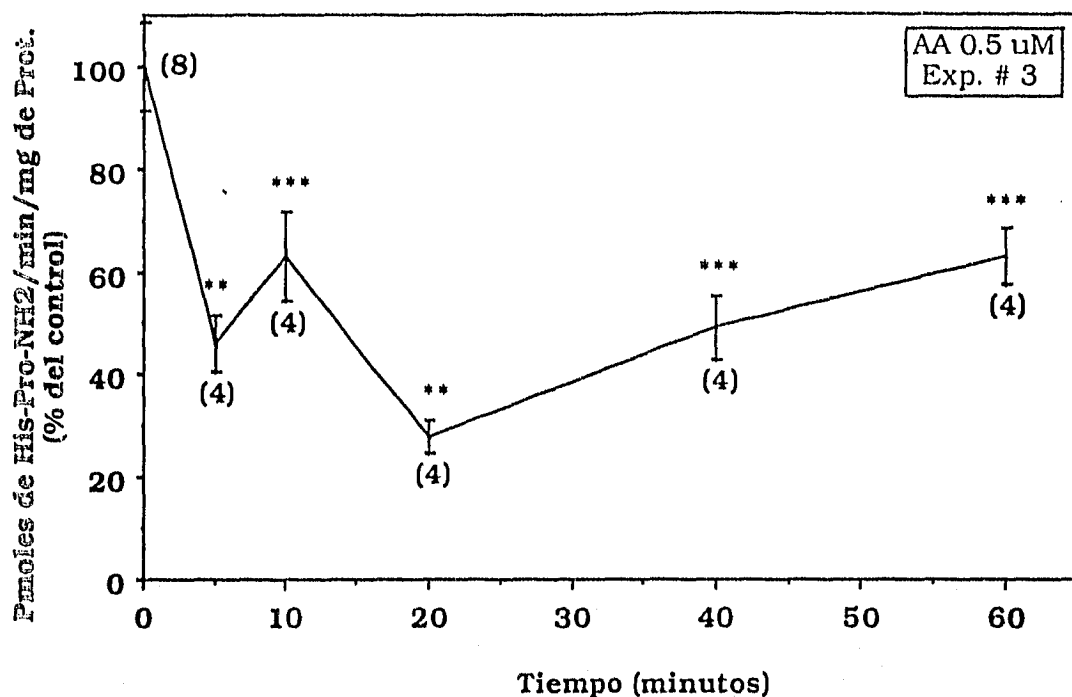


Figura 15 : Efecto del ácido araquidónico sobre la actividad específica de la PPII. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del tiempo cero) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

Las cinéticas de las figuras 13,14 y 15 muestran de manera similar a las cinéticas con melitina (0.5  $\mu$ g/ml) que el efecto inhibitorio es máximo a los 20 minutos de tratamiento. Por lo que en los siguientes experimentos, los tratamientos con AA fueron durante 20 minutos. Una dosis mayor de AA (5.0  $\mu$ M) no dio un efecto mayor sobre la actividad específica de la PPII (no mostrado) o sobre la liberación de prolactina (tabla II). Otra evidencia de que la melitina y el AA actúan por un mecanismo similar es el resultado que se obtuvo en el experimento de la figura 18 que muestra que sus efectos no son aditivos.

### V.3.- CONTROLES DE VIABILIDAD CELULAR Y EFECTOS DE OTROS ACIDOS GRASOS.

Los efectos de la melitina o del AA no se deben a un efecto tóxico, ya que las dosis utilizadas no tuvieron efecto sobre la viabilidad celular. No se observaron cambios morfológicos a nivel de microscopía de contraste de fases, ni hubo variaciones en la concentración de proteína entre los grupos control y los tratados (datos no mostrados).

Los resultados hasta aquí obtenidos no se deben tampoco a efectos inespecíficos que pudieran alterar el ambiente lipídico que rodea a la proteína, ya que otros ácidos grasos poli-insaturados con propiedades lipofílicas similares a las del AA (oleico, linoleico 0.5  $\mu$ M) no tuvieron efecto sobre la actividad de la PPII (datos no mostrados).

#### V.4.- EFECTO DE LA INHIBICION DEL METABOLISMO DEL AA.

El ácido araquidónico puede ser metabolizado a varios compuestos eicosanoides por diferentes vías enzimáticas. Para determinar si el efecto del AA sobre la actividad de la PPII es producido por alguno de sus metabolitos, se analizó el efecto de la inhibición de la vía lipoxigenasa con NDGA (Inhibe más específicamente la vía 5-Lox) y de la vía cicloxigenasa con indometacina.

Los resultados muestran que la inhibición de la vía Cox con indometacina no modificó el efecto del AA sobre la actividad específica de la PPII y que el NDGA revertió el efecto inhibitorio del AA (figura 16). El efecto del AA sobre la secreción de prolactina se corroboró mediante RIA y como previamente se había reportado, el NDGA también inhibió el efecto del AA sobre la secreción de prolactina (tabla II).

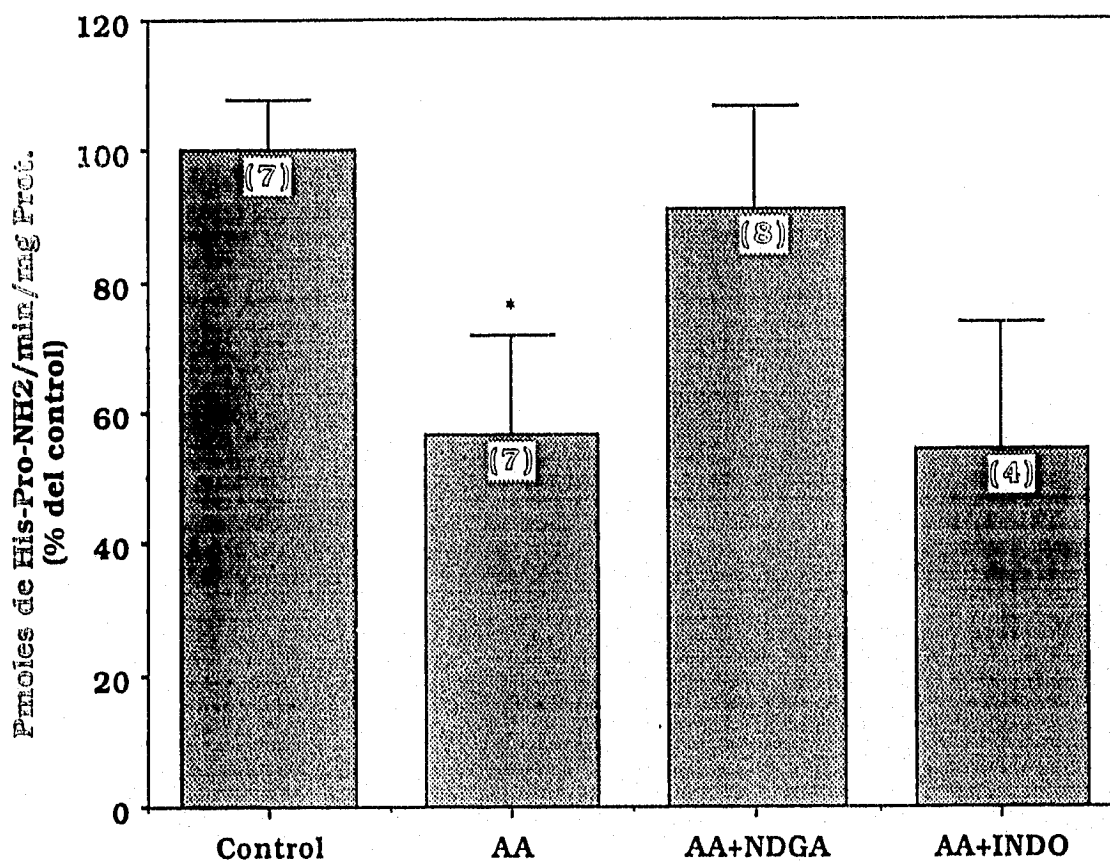


Figura 16 : Efecto del ácido araquidónico y de inhibidores de su metabolismo sobre la actividad específica de la PPII.

Los tratamientos son: C (control), AA (ácido araquidónico), AA+NDGA (AA + ácido nordihidroguaiarético) y AA+INDO (AA + indometacina). Las células fueron tratadas con AA 0.5 uM sólo o en combinación con NDGA (10 uM) o indometacina 10 uM durante 20 minutos respectivamente. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del control) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

Tratamiento	Secreción de prolactina (ng/ml)
Control	592 (2)
AA 0.5 $\mu$ M	872 (2)
AA 0.5 $\mu$ M + NDGA	628 (2)
AA 5.0 $\mu$ M	758 (2)

Tabla II : Efecto del AA sobre la secreción de prolactina de células dispersas de adenohipófisis. Las células fueron tratadas durante 20 minutos con AA sólo o en combinación con NDGA 10  $\mu$ M. Los datos son el promedio de dos determinaciones independientes.

#### **V.5.- EFECTOS DEL TRH SOLO O COMBINADO CON ACIDO ARAQUIDONICO O MELITINA.**

Debido a que la TRH estimula la secreción de prolactina, moviliza AA y regula la actividad de la PPII a tiempos largos, a que el DBP (inhibe a la PLA2) y el ETYA (inhibe el metabolismo del AA) inhiben la secreción de prolactina estimulada por la TRH (tabla III) y el NDGA (inhibe el metabolismo de la vía Lox) revierte el efecto del AA sobre la actividad de la PPII (figura 16), se analizó si una dosis máxima de TRH sola o en combinación con melitina o AA tiene algún efecto sobre la actividad de la PPII a tiempos cortos. Se utilizaron dosis de melitina de 0.5  $\mu$ g/ml (figura 17) y melitina 1.0  $\mu$ g/ml con AA 0.5  $\mu$ M (durante los 16 minutos que duro el ensayo de la PPII) en la figura 18.

Los resultados muestran que el TRH por si solo no tiene un efecto inhibitor sobre la actividad de la PPII reproducible. Sin embargo, tiene un efecto inhibitor adicional al efecto de la melitina o del AA (figuras 17 y 18).

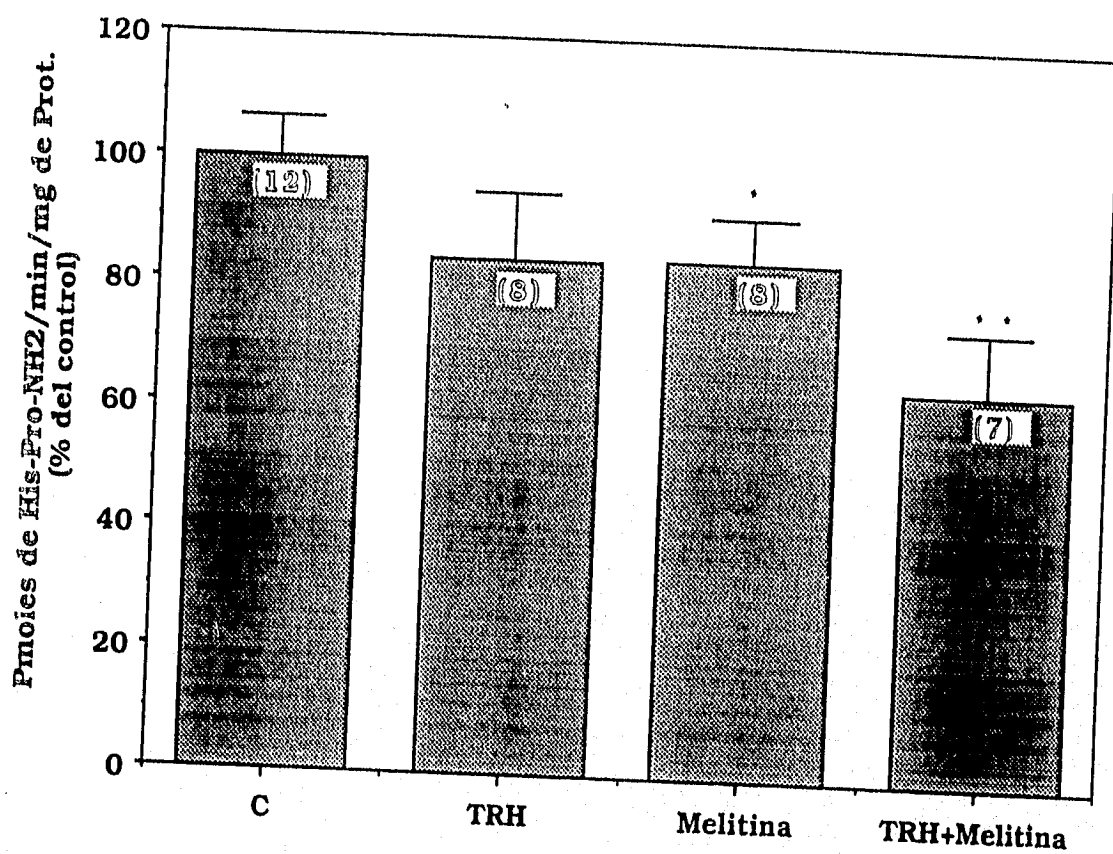


Figura 17 : Efecto de la melitina 0.5 ug/ml, TRH  $10^{-6}$  M y la combinación de ambos, sobre la actividad específica de la PPII después de 20 minutos de tratamiento. Los datos son la media  $\pm$  SEM (% del control) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

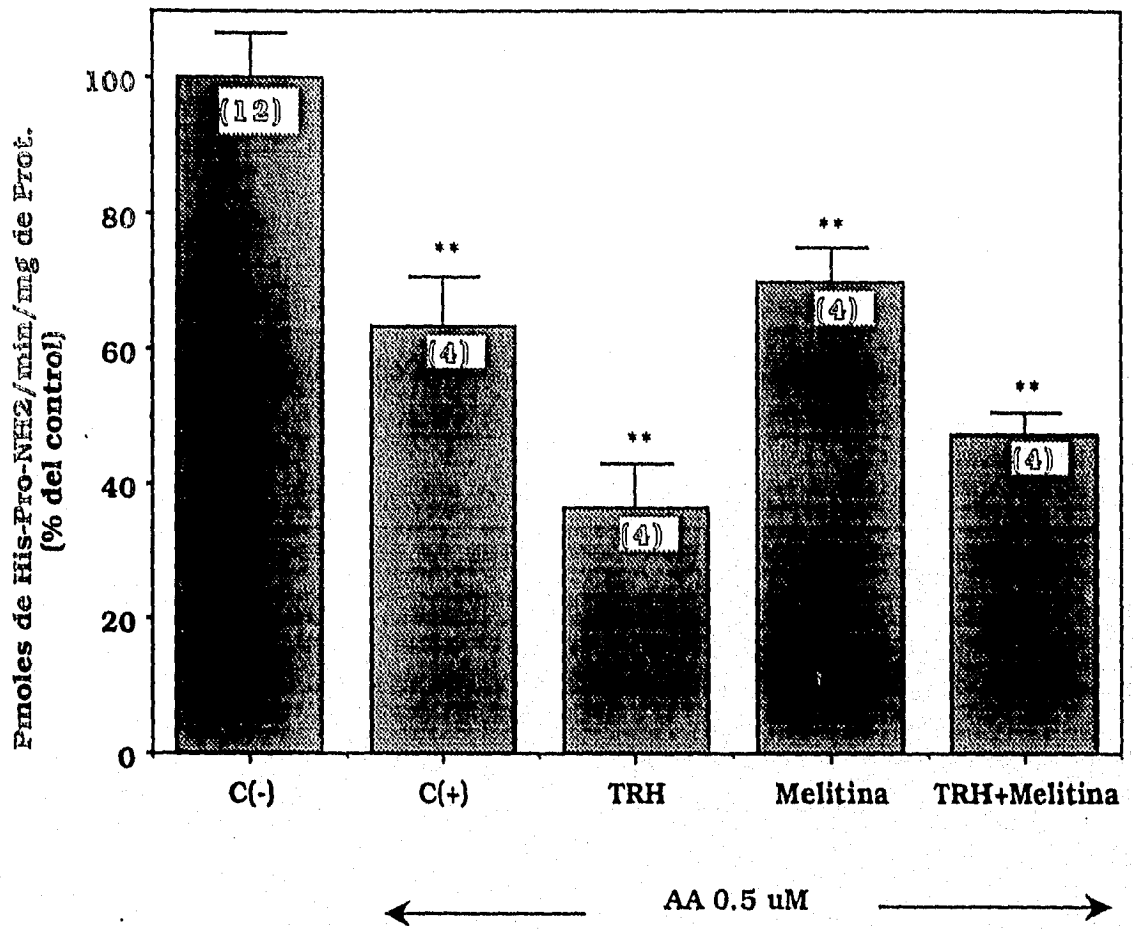


Figura 18 : Efecto de la melitina 1.0 ug/ml, TRH 10<sup>-6</sup> M y la combinación de ambos sobre la actividad específica de la PPII después de 20 minutos de tratamiento. Los tratamientos dentro del acotamiento de las flechas indican que además del tratamiento, hubo AA 0.5 uM durante los 16 minutos que duro el ensayo. Los datos son la media ± SEM (% del control) y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

En los experimentos de las figuras 17 y 18, el efecto inhibitorio que produce la TRH mas la melitina 0.5 ug/ml (figura 17) o una dosis 1.0 ug/ml de melitina mas AA 0.5 uM durante el ensayo (figura 18), son en ambos casos aditivos. Lo que sugiere, que el efecto de la TRH sobre la actividad de la PPII no se debe a una mayor disponibilidad de AA y que la TRH y el AA actúan por mecanismos independientes. Por otro lado, el efecto de la melitina y del AA (durante el ensayo) no son aditivos.

<b>Trataniento</b>	<b>Secreción de prolactina (ng/ml)</b>
<b>Control</b>	<b>752.94 ± 52.8 (16)</b>
<b>TRH</b>	<b>1521.81 ± 184 (11)**</b>
<b>TRH + DBP</b>	<b>847.87 ± 137 (8)</b>
<b>TRH + ETYA</b>	<b>792.43 ± 81 (7)</b>

Tabla III : Efecto de la TRH sobre la secreción de prolactina de células dispersas de adenohipófisis. Las células fueron tratadas con TRH ( $10^{-6}$  M) sólo o combinado con los inhibidores DBP 10 uM o ETYA 20 uM durante 20 minutos. Los datos son la media ± SEM y los números entre paréntesis indican el número de determinaciones independientes.

## VI.- DISCUSION.

La conclusión principal de este trabajo es que la activación de la movilización de AA y su subsecuente metabolismo por la vía lipoxigenasa induce una inhibición rápida de la actividad de la PPII en la superficie de células de adenohipofisis (lactótrofos).

Esta conclusión se basa en las siguientes observaciones:

- 1).- La melitina inhibe rápidamente la actividad de la PPII. Este efecto se debe probablemente a la liberación de AA por la acción de la PLA2, ya que el efecto se puede revertir con un inhibidor de la PLA2, reproducir con AA exógeno y los efectos del AA y la melitina no son aditivos. La actividad hidrolítica de la PLA2 puede contribuir a cambios en la composición lipídica de la membrana a través de la generación de ácidos grasos libres y lisofosfolípidos que pueden afectar la actividad de proteínas de la membrana plasmática. El efecto de la melitina sobre la actividad de la PPII tampoco se debe a la producción de lisofosfolípidos o a cambios en la composición lipídica de la membrana por acción de la PLA2; ya que de ser así, el AA no tendría efecto.
- 2).- El efecto del AA es revertido inhibiendo la vía lipoxigenasa pero no la vía ciclooxigenasa.
- 3).- Estos efectos sobre la actividad de la PPII no se deben a efectos farmacológicos o a efectos inespecíficos sobre la membrana plasmática. Los tratamientos no afectaron la viabilidad celular, no se observaron cambios morfológicos y ácidos grasos con propiedades lipofílicas similares a las del AA no tuvieron efecto sobre la actividad de la PPII.

Hemos observado ciertas variaciones en los resultados. Las variaciones en las cinéticas observadas a las diferentes dosis de melitina se deben probablemente a efectos dependientes de cada dosis; esto por que a una misma dosis (0.5 mg/ml) el patron es similar (después de 15 minutos) en varios experimentos. El efecto de diferentes concentraciones de melitina sobre la actividad de la PLA2 podría depender de la formación de complejos de melitina en la membrana plasmática o incrementando la disponibilidad o el acceso de sustrato cerca del sitio activo de la PLA2.

Las variaciones a la misma dosis de melitina o AA se deben probablemente a diferencias adaptativas y/o funcionales de las células en cada cultivo. Estas diferencias pueden deberse a variaciones en el procedimiento de dispersión celular, densidad de siembra o etapa del ciclo estral de las ratas al momento del sacrificio.

Las diferencias entre las cinéticas con AA y melitina se deben probablemente a diferencias en las proporciones de AA libre durante el curso de las cinéticas. La reversibilidad de la inhibición de la actividad de la PPII con AA y el efecto no reversible de la melitina podrían explicarse debido a que el AA exógeno es metabolizado y los metabolitos producidos que afectan la actividad de la enzima tienen una vida media corta. Sin embargo, la melitina que es mas estable que el AA produce una liberación continua de AA por efecto de la activación de la PLA2. Por lo tanto, es posible que durante el curso de las cinéticas con melitina se sigan produciendo los metabolitos del AA que tienen efecto sobre la actividad de la PPII.

El efecto de los metabolitos del AA sobre la actividad de la PPII adenohipofisiaria o sobre la secreción de prolactina puede ser mediado por receptores a eicosanoides actuando como primeros mensajeros o una vez producidos en la célula actuar directamente como segundos mensajeros a nivel intracelular. En el segundo caso;

afectarían por ejemplo, la actividad de canales iónicos, proteínas cinasas como Raf y algunas isoenzimas de la familia de las PKC. Sin embargo, también pueden salir fuera de la célula y actuar extracelularmente sobre componentes de la membrana o sobre receptores específicos de manera autócrina y/o parácrina. Los péptido-leucotrienos como el LTC<sub>4</sub> son excluidos de la célula por un mecanismo de transporte dependiente de ATP (262); también se ha mostrado que existe un mecanismo de transporte o una bomba para los glutatión-conjugados en células HeLa (263,264). Estos metabolitos pueden ser generados en varios tipos de células de la adenohipófisis; sin embargo, la respuesta sobre la secreción de prolactina o sobre la actividad de la PPII es exclusiva de los lactótopos.

El efecto de los metabolitos del AA sobre la actividad de la PPII en la superficie de los lactótopos puede ser por varios mecanismos; algunos de estos mecanismos se discuten a continuación.

**1).- BIOSINTESIS:** Debido a que las cinéticas durante los tratamientos con AA son de curso rápido y reversible, este mecanismo resulta improbable.

**2).- DEGRADACION Y LIBERACION:** son mecanismos poco probables debido principalmente a que la recuperación de la actividad de la enzima durante los tratamientos con AA es rápida. Un mecanismo de degradación implica que el reciclamiento requiere de la biosíntesis, maduración e importación de la enzima a una región de la membrana plasmática, proceso que es lento (horas). En cuanto a la liberación, en el laboratorio no se ha podido medir actividad detectable de la PPII en el medio de incubación después de tratamientos cortos con TRH. Aunque no se ha determinado el efecto del AA o la melitina sobre la posible liberación de la enzima, es poco probable ya que la incorporación de proteínas integrales a la membrana plasmática una vez degradada o liberada requiere síntesis de *novu*.

**3).- REDOX:** Se ha reportado que productos espin electrón reactivos y epóxidos inestables generados durante el metabolismo 5-lox del AA pueden afectar la actividad de enzimas involucradas en esta vía. Así, se ha propuesto una rápida inactivación de la enzima 5-lox por radicales intermediarios (266,267). Winterbourn (267,268) propone una hipótesis en la cual, todas las especies de radicales libres incluyendo las que se generan durante la oxidación de ácidos grasos poli-insaturados pueden transferir sus electrones espin reactivos al oxígeno a través del glutatión para producir el anión radical superóxido. En algunas células principalmente fagocíticas, el anión radical superóxido puede regular el metabolismo del AA induciendo e inhibiendo el metabolismo 5-lox (269,270) el cual *per se*, puede producir superóxido y otros radicales que a su vez, pueden regular la actividad de enzimas como la PLA<sub>2</sub> (272).

El metabolismo 5-Lox del AA lo podemos dividir en dos fases, una fase consiste en la producción de leucotrienos y la otra, en la producción de hidroperóxidos, peróxidos, epóxidos y radicales libres, que se caracterizan por ser metabolitos muy inestables. Los radicales pueden formarse durante la oxidación del Fe<sup>+3</sup> unido a la lipoxigenasa a partir de AA hidroperóxido. Estos radicales pueden extraer un electrón de otros sustratos produciendo un extres oxidativo (273).

Los metales de transición, aún los que se encuentran unidos a las proteínas pueden reaccionar con peróxidos o especies espin electrón reactivas y catalizar reacciones de oxidación-reducción. Los productos antes mencionados así como los hidroperóxidos pueden también reaccionar con los tioles, sulfidrilos o enlaces disulfuro de las proteínas produciendo cambios conformacionales o reaccionar con hidroxilos de las proteínas produciendo radicales aminoacil intraproteicos.

El efecto de estos metabolitos intermediarios podría ser responsable del efecto que produce el AA sobre la actividad de la PPII. Esto se basa en los siguientes



argumentos.

La oxidación u autooxidación de los ácidos grasos poli-insaturados como el AA es iniciada por la abstracción de un hidrógeno del enlace C-H de un metileno doble alílico. Esta reacción puede proceder en presencia de metales de transición, luz, radicales libres o enzimáticamente por lipoxigenasas.

*In vitro*, cuando el AA es mezclado con una lipoxigenasa, se detectan rápidamente por espectroscopía electrónica del espin, radicales libres peroxil. La adición de NDGA resultó en una disminución de la señal espectroscópica de los radicales peroxil y se detectó el radical derivado del NDGA (274). Cuando se agrega AA y tocoferol a homogenados de plaquetas, el metabolismo del AA se acompaña de manera paralela con la oxidación del tocoferol y formación del radical tocoferoxil. De estas observaciones se desprende que el NDGA puede actuar como antioxidante o agente atrapador de radicales libres (275,276).

El ETYA, que también inhibe la vía Lox del AA, no tiene a diferencia del NDGA, propiedades antioxidantes y es menos eficiente que el NDGA reduciendo la formación de radicales tocoferoxil que se generan durante el metabolismo del AA. Cabe señalar, que en nuestras condiciones el ETYA no revertió el efecto del AA sobre la actividad de la PPII (datos no mostrados), sugiriendo que el efecto del AA sobre la actividad de la PPII podría ser de tipo redox.

La leucotrieno A4 hidrolasa (LTA4h), otra enzima de la vía del metabolismo del AA, pertenece a la misma familia y grupo que la PPII. La homología entre estas dos enzimas, es escasa; sin embargo, la región de coordinación del zinc o sitio activo contiene un grado de homología mayor (siguiente figura).

```
HEICHQWFGDLVTPVWWEDVWLKEGF PPII
HELh Hn Wn Gn LVTnnWnnnnnWLn EGn LTA4h
HEnnH nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnWLn EGn APN
HEnnHQWn nnnnnnnnnnnnnnnnnnnnnWLn EGn APA
```

Figura 19: Secuencia de aminoácidos del sitio activo de las enzimas piroglutamil peptidasa II de rata (PPII), leucotrieno A4 hidrolasa de raton y humano (LTA4h), aminopeptidasa N de raton y humano (APN), y aminopeptidasa A de raton y humano (APA). Cada n representa a un aminoácido no conservado.

La LTA4h (EC 3.3.2.6) es una enzima bifuncional que posee actividad epóxido hidrolasa, i.e. conversión de LTA4 a LTB4 y de peptidasa; por ejemplo, son substratos de ésta enzima péptidos opioides (277). Agentes quelantes de metales inhibieron la actividad epóxido hidrolasa y peptidasa simultaneamente y ambas actividades fueron restauradas añadiendo zinc. Sin embargo, el residuo de ácido glutámico del sitio de coordinación del zinc esta directamente involucrado en la inhibición de la actividad aminopeptidasa, pero no en la actividad epóxido hidrolasa (278). Esto sugiere, que ambas actividades de la LTA4h se ejercen en sitios no idénticos pero sobrelapados.

Estudios *in vitro*, con la LTA4h han mostrado que ésta enzima puede ser inhibida o inactivada por productos endoperóxidos o epóxidos alílicos producidos por la 5-Lox (279).

Dado que los radicales peroxil e hidroperóxidos son intermediarios obligatorios en las reacciones de las lipoxigenasas y causan un estres oxidativo, ésta hipótesis podría ser potencial en la regulación de la actividad de la PPII. Sin embargo, a diferencia de los mecanismos antes mencionados estos productos intermediarios poseen una vida media muy corta (274) (segundos). Durante este tiempo el

electrón o las especies reactivas que se producen pueden reaccionar con proteínas y antioxidantes a nivel de la membrana o intracelularmente. Sin embargo, la señal espectroscópica se pierde rápidamente en cuestión de segundos y en muchos casos el efecto que produce sobre las proteínas es irreversible, sugiriendo que este mecanismo es posible pero no es el más probable.

**4).- ENDOCITOSIS:** Es posible que los metabolitos del AA involucrados en la regulación de la actividad de la PPII afecten procesos de endocitosis y fusión de membranas. Estos metabolitos pueden regular la actividad GTPasa de Ras y de otras proteínas G pequeñas, incrementar la fusión de endosomas mediada por sinexinas y anexinas (280). Ras-GAP se ha propuesto como un efector clave en la inducción de cambios a nivel de citoesqueleto. GAP también puede interactuar con Rho de una manera dependiente de la producción de leucotrienos. Esta parece ser la vía principal por la cual los metabolitos de la vía 5-Lox del AA influyen cambios conformacionales en el citoesqueleto a través de la formación de fibras de estrés y polimerización de actina (281,282). Así, los efectos de los metabolitos del AA pueden ser mediados por proteínas G de bajo peso molecular y afectar el proceso de endocitosis.

La actina del citoesqueleto parece jugar un papel crítico en la fase de endocitosis. Los filamentos de actina pueden ser parte de un motor mecanoquímico que provee la fuerza requerida para convertir una invaginación de membrana en una vesícula endocítica o para que esta se mueva a través de los microtubulos dentro del citoplasma (283).

La fusión de endosomas al igual que la endocitosis requiere de AA y el efecto es probablemente mediado por metabolitos de la vía 5-Lox. La fusión de endosomas inducida por calcio puede ser reconstituida añadiendo AA y anexina II (284). Varios inhibidores de la PLA2 bloquean la fusión de endosomas en fracciones particuladas de células y la inhibición es revertida añadiendo AA (285). Sin embargo, como ya se mencionó, los leucotrienos son en gran parte responsables de los cambios requeridos para la polimerización de actina y la endocitosis en células.

La endopeptidasa neutral o encefalinasa (EC 3.4.24.11) es una Zn-aminopeptidasa integral de la membrana plasmática que se expresa en la superficie de varias células. Esta enzima es internalizada por medio de endocitosis después de tratamientos cortos con PMA o un análogo del diacilglicerol y se ha mostrado que tanto el DBP como la melitina afectan este proceso de endocitosis (286).

El fenómeno de desensibilización y resensibilización de receptores acoplados a proteínas G se ha asociado con varios eventos que incluyen fosforilación, endocitosis, desfosforilación, reincorporación de la proteína a la membrana. Se propone que la fosforilación es mediada principalmente por miembros de la familia de serin/treonin cinasas de receptores acoplados a proteínas G (GRKs) que reconocen específicamente a las proteínas receptores como sustrato. No se sabe el mecanismo por el cual la GRK es activada por una proteína G; sin embargo se cree que debe ser acilada para que se transloque a la membrana.

Se propone que el mecanismo más probable por el cual el AA afecta la actividad de la PPII es a nivel de endocitosis. Los metabolitos del AA podrían tener efecto sobre la endocitosis o tráfico del endosoma o bien podrían participar en la fosforilación previa a la endocitosis. Esta hipótesis se refuerza con el hecho de que las cinéticas de endocitosis de la encefalinasa son similares a la inhibición y recuperación de la actividad de la PPII después de tratamientos con AA o las cinéticas de la PPII en células de retinoblastoma estimuladas con TPA. En los lactótopos, la endocitosis del R-TRH en respuesta al TRH es también similar a la cinética de inhibición de la PPII.

La activación de receptores en lactotrofos que abarcan la secreción de prolactina por ejemplo, TRH, suprime la secreción de prolactina importante en la regulación de la actividad de la TRH y los metabolitos de la TRH por ejemplo, la TRH y los metabolitos de la TRH. Los lactotrofos son aditivos y convergen para producir prolactina. El TRH por si solo tiene un efecto estimulante débil que es poco reproducible. Estas interacciones en la regulación de la secreción de prolactina en el cerebro debe a un proceso de desensibilización en la cinética del ensayo. En estudios con TRH y sus metabolitos en el cerebro se han observado que la actividad enzimática se reduce en la membrana plasmática y la desensibilización por acción de la TRH en los receptores en las membranas plasmáticas. La combinación de TRH y sus metabolitos en el cerebro se ha observado que la actividad enzimática se reduce en la membrana plasmática y la desensibilización por acción de la TRH en los receptores en las membranas plasmáticas.

La activación de receptores en lactótopos que afectan la liberación de AA y la secreción de prolactina (por ejemplo, TRH, angiotensina II, DA etc.), podría ser potencialmente importante en la regulación de la actividad de la PPII a tiempos cortos, en virtud de que in vitro, el AA puede regular ambos procesos.

El efecto de la TRH sobre la actividad de la PPII no queda completamente claro. Se propone que el incremento en la concentración intracelular de calcio inducido por la TRH y los metabolitos de la vía 5-Lox inducidos por la aplicación de AA exógeno, son aditivos y convergen para modular procesos de endocitosis. Esto se basa en los siguientes argumentos.

El TRH por si solo tiene un efecto inhibitorio rápido sobre la actividad de la PPII que es poco reproducible. Estas variaciones en la actividad de la PPII podrían deberse a un proceso de desensibilización de la enzima por endocitosis. Las cinéticas con TRH a una dosis máxima de  $10^{-6}$  M (20 minutos de tratamiento) y la cinética del ensayo (16 minutos con TRH  $10^{-6}$  M) podrían corresponder al tiempo en el cual ya se han reincorporado a la membrana plasmática la mayor parte de la enzima. Esta hipótesis se basa en las cinéticas de endocitosis-reincorporación del R-TRH a la membrana plasmática, ya que ambas cinéticas son similares. Durante la desensibilización por endocitosis del receptor, a los 5 minutos la mayor proporción del R-TRH se ha internalizado y a los 20 minutos la mayor proporción se ha reincorporado a la membrana plasmática. Esto explicaría por que el efecto del TRH es poco reproducible en nuestras condiciones.

La combinación de TRH con melitina o AA produce efectos aditivos, sugiriendo que el efecto de la TRH sobre la actividad de la PPII no se debe a una mayor disponibilidad de AA y que la TRH y el AA actúan por mecanismos independientes. Sin embargo, es posible que ambos actúen sobre la movilización de calcio para incrementar los niveles intracelulares, o que los metabolitos potencien el efecto de la TRH sobre la actividad de canales modulados por PKC o PKA. También es posible que la TRH afecte otra reserva de AA activando a la PLA2 citosólica y/o la enzima 5-lipoxigenasa (figura 20).

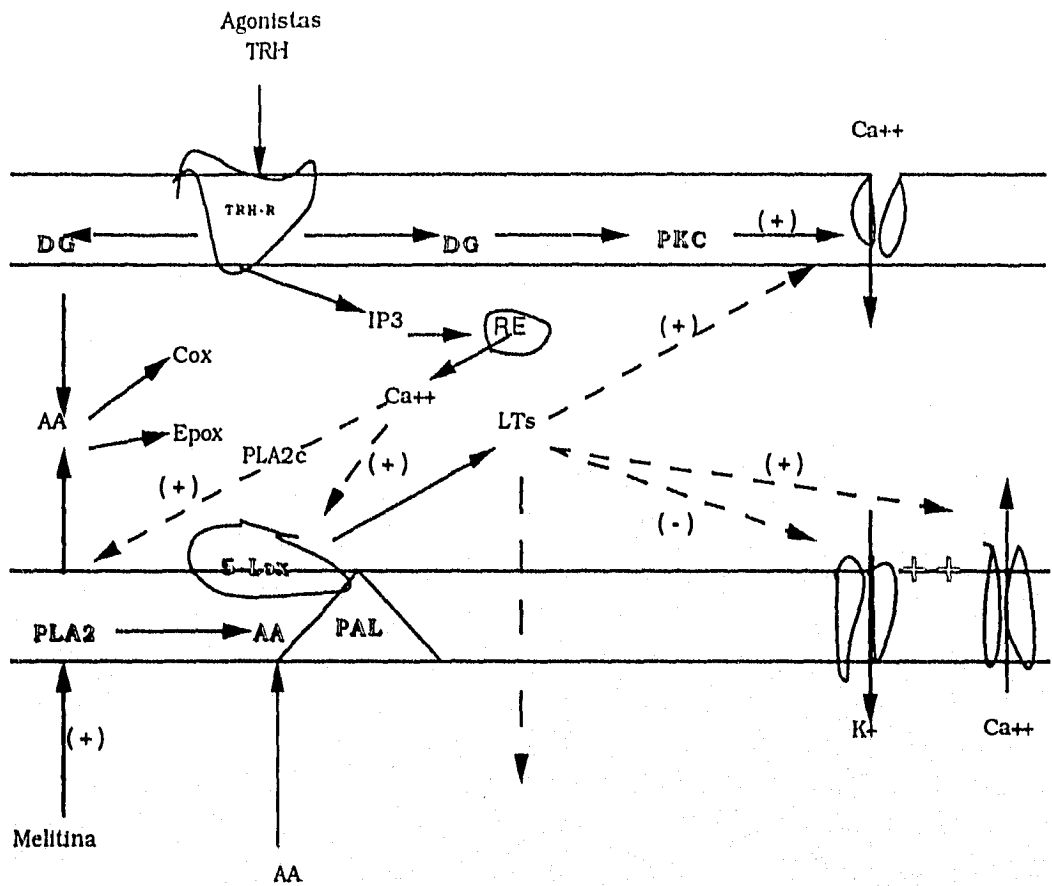


Figura 20 : Esquema hipotético del efecto de TRH, melitina y AA sobre la movilización de calcio y su posible efecto sobre enzimas dependientes de calcio tales como la PLA2c y la 5-Lox. PAL, DG y RE son: proteína activadora de la lipoxigenasa, diacilglicerol y retículo endoplásmico respectivamente.

## VII.- CONCLUSIONES.

El efecto de la melitina sobre la actividad de la PPII se debe probablemente a la activación de la PLA2 a nivel de la membrana plasmática y a la subsecuente hidrólisis y liberación de AA. El efecto reversible del AA sobre la actividad de la PPII es probablemente el resultado de su metabolismo por la vía 5-Lox. Se propone que los leucotrienos pueden ser los responsables de la inhibición de la actividad de la PPII a tiempos cortos. El mecanismo de acción de estos metabolitos sobre la actividad de la PPII adenohipofisiaria podría ser a nivel de endocitosis dependiente de calcio. Sin embargo, la actividad de la PPII también podría verse afectada por metabolitos o intermediarios reactivos que se generan durante el metabolismo 5-Lox del AA por mecanismos de tipo redox.

Los efectos de la TRH con melitina o AA son aditivos, lo que sugiere que el TRH no inhibe la actividad de la PPII a tiempos cortos a través de la movilización de AA.

La liberación de AA en la adenohipofisis podría ser importante en la regulación de la actividad de la PPII y es posible que el papel de esta enzima sea relevante en la regulación de la secreción de prolactina.

## VIII.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Oliver C, Mical RS, Porter JC.: Hypothalamic pituitary vasculature. Evidence for retrograde blood flow in the pituitary stalk. *Endocrinology* 1977, 101:598
- 2.- Lechan RM, Jackson IMD.: Immunohistochemical localization of thyrotropin-releasing hormone in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 1982, 111:55-65
- 3.- Hokfelt T, Elde R, Fuxe K, Johansson O, Ljungdahl A, Goldstein M, Luft R, Efendic S, Nilsson G, Terrenius L, Gauten D, Jeffcoate SL, Rechfeld J, Said S, Pérez de la Mora M, Possani L, Tapia R, Teran L, Palacios R.: Aminergic and peptidergic pathways in the nervous system with special reference to the hypothalamus. En: *The hypothalamus*. Reichlin S, Baldessarini RJ, y Martin B, eds. 1978, Raven Press N.Y. P. 69
- 4.- Johansson O, Hokfelt T, Jeffcoate SL, White N, Spindel E.: Light and electron microscopic immunohistochemical studies on TRH in the central nervous system of the rat. En: *Thyrotropin-releasing hormone*. Griffiths EC, Bennett GW, eds. 1983, Raven Press N.Y. P. 19
- 5.- Lechan RM, Wu P, Forte S, Jackson IMD.: Immunolocalization of the TRH prohormone in the rat central nervous system. Society for neuroscience, 15th Annual meeting, Dallas Texas, 1985, P. 114
- 6.- Palkovits M.: Topography of chemically identified neurons in the central nervous system: Progress in 1981-1983. En: *Neuroendocrine perspectives V. 3* Muller EE, Macleod RM, eds. 1984, Elsevier Science Publishers, Amsterdam. P.1
- 7.- Haekness DH, Brownfield MS.: Intra and intersegmental distribution of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in rat spinal chord: Topographical variation and presence in the dorsal horn. *Soc. Neurosci. Abstr.* 1985, 11:349
- 8.- Brownstein MJ, Palkovits M, Saavedra JM, Bassiri RM, Utiger RD.: Thyrotropin-releasing hormone in specific nuclei of rat brain. *Science* 1974, 267-269
- 9.- Winokur A, Utiger RD.: Thyrotropin-releasing hormone: distribution in rat brain. *Science* 1974, 175:265-267
- 10.- Kizer JS, Palkovits M, Tappaz M, Keabian J, Brownstein MJ.: Distribution of releasing factors, biogenic amines and related enzymes in the bovine median eminence. *Endocrinology* 1976, 98:685
- 11.- Bennet GW, Marsden CA, Fone KC, Johnson JV, Heal DJ.: TRH-catecholamine interactions in brain and spinal cord. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1989, 553:121-134
- 12.- Crespi F, Kaena PE, Mora M.: In vivo evaluation by differential pulse voltammetry of the effect of thyrotropin-releasing hormone (TRH) on dopaminergic and serotonergic synaptic activity in the striatum and nucleus accumbens of the rat. *Experimental Brain Research*. 1986, 62: 329-334
- 13.- Méndez M, Morán J, Wilk S, Joseph-Bravo P, Charli JL.: Assessment of the role of TRH in the release of (<sup>3</sup>H)-Dopamine from rat nucleus accumbens-lateral septum slices. *Brain Res. Bull.* 1993, 31:621-625
- 14.- Griffiths EC.: Thyrotropin-releasing hormone: endocrine and central effects. *Psychoneuroendocrinology* 1985,10: 225-235
- 15.- Nicoll R.: Excitatory action of TRH on spinal motoneurons. *Nature (London)* 1977, 265: 242-243
- 16.- Metcalf G.: Newer aspects of TRH pharmacology. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1989, 553:311-313
- 17.- Dekin MS, Richeson GB, Getting PA.: Thyrotropin-releasing hormone induces rhythmic bursting in neurons of the nucleus tractus solitarius. *Science* 1986, 229:67

- 18.- Lamour Y, Dutar P, Jobert A.: Effects of TRH, cyclo (His-Pro) and (3-Me-His)-TRH on identified septohippocampal neurons in the rat. *Brain Res.* 1985, 331:343-347
- 19.- Griffiths EC.: Clinical applications of thyrotropin-releasing hormone. *Clinical Science* 1987, 73:449-457
- 20.- Faden AI, Salsman S.: Pharmacological strategies in CNS trauma. *Trends Pharmacol Sci.* 1992, 13:29-35
- 21.- Lechan RM, Wu P, Jackson IMD, Cooperman S, Mandel G, Goodman RH.: Thyrotropin-releasing hormone precursor: Characterization in rat brain. *Science* 1986, 231:159-167
- 22.- Joseph-Bravo P, Charli JL, Covarrubias L.: Metabolism of thyrotropin-releasing hormone. En: Velasco M, Israel A, Romero E, Silva H, (eds). *Recent advances in pharmacology and therapeutics.* Elsevier Science Publishers, Netherlands 1989, p.p. 215-220
- 23.- Bulant M, Delfour A, Vaudry H, Nicolas P.: Processing of thyrotropin-releasing hormone (TRH) generates pre-TRH-connecting peptides. Identification and characterization of prepro-TRH (178-199) in the rat nervous system. *J. Biol. Chem.* 1988, 263:17189-17196
- 24.- Winokur A, Davis R, Utiger RD.: Subcellular distribution of thyrotropin releasing hormone (TRH) in rat brain and hypothalamus. *Brain Res.* 1977, 120:423
- 25.- Barnea A, Ben-Jonathan N, Porter JC.: Characterization of hypothalamic subcellular particles containing luteinizing hormone releasing hormone and thyrotropin-releasing hormone. *J. Neurochem.* 1976, 27:477-484
- 26.- Méndez M, Joseph-Bravo P, Cisneros M, Vargas MA, Charli JL.: Regional distribution of in vitro release of thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Peptides* 1987, 8:291-298
- 27.- Maeda K, Frohman LA.: Release of somatostatin and thyrotropin releasing hormone from rat hypothalamic fragments in vitro. *Endocrinology* 1980,106:1837
- 28.- Warberg J.: Studies on the release mechanism for hypothalamic hormones. *Acta Endocrinol.* 1982, Suppl. 250:7
- 29.- Joseph-Bravo P, Loudes C, Charli JL, Kordon C.: Subcellular distribution of brain peptidases degrading luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) and thyrotropin releasing hormone (TRH). *Brain Res.* 1979, 166:321-329
- 30.- Grossvenor CE, Mena F.: Evidence that thyrotropin-releasing hormone and hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in lactating rat. *Endocrinology* 1980,107: 863-868
- 31.- Haisenleder DJ, Ortolano GA, Dalkin AC, Ysin M, Marshall JC.: Differential actions of thyrotropin (TSH)-releasing hormone pulses in the expression of prolactin and TSH subunit messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells in vitro. *Endocrinology* 1992, 130:2917-2923
- 32.- Charli JL, Ponce G, McKelvy JF, Joseph-Bravo P.: Accumulation of thyrotropin releasing hormone by rat hypothalamic slices. *J. Neurochem.* 1984, 42:981-986
- 33.- Turner AJ, Barnes K.: Neuropeptidases: candidate enzymes and techniques for study. *Biochem. Soc. Trans.* 1994, 22:122-127
- 34.- Rupnow JH, Taylor W, Dixon JE.: Purification and characterization of thyrotropin-releasing hormone deamidase from rat brain. *Biochem.* 1979,18:1206-1212
- 35.- Taylor WL, Dixon JE.: Catabolism of neuropeptides by a brain proline endopeptidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1980, 94:9-15
- 36.- Wilk S. Prolyl endopeptidase. *Life Sci.* 1983, 33:2149
- 37.- Browne P, O'Cuinn G.: An evaluation of the role of a pyroglutamylpeptidase, a post-proline cleaving enzyme and a post-proline dipeptidylaminopeptidase, each purified from the soluble fraction of guinea-pig brain, in the degradation of



- tiroliberin. *Eur. J. Biochem.* 1983, 137:75
- 38.- Busby WH Jr, Youghblood WW, Kizer JS.: Studies on substrate requirements, kinetics properties and competitive inhibitors of the enzymes catabolizing TRH in rat brain. *Brain Res.* 1982, 242:261-270
- 39.- Torres H, Charli JL, Gonzalez-Noriega A, Vargas MA, Joseph-Bravo P.: Subcellular distribution of the enzymes degrading thyrotropin releasing hormone and metabolites in rat brain. *Neurochem. Int.* 1986 9:103-110
- 40.- Schauder B, Schomburg L, Köhrle J, Bauer K.: Cloning of a cDNA encoding an ectoenzyme that degrades thyrotropin-releasing hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91:9534-9538
- 41.- Charli JL, Cruz C, Vargas MA, Joseph-Bravo P.: The narrow specificity pyroglutamate aminopeptidase degrading TRH in rat brain is an ectoenzyme. *Neurochem. Int.* 1988, 13:237-242
- 42.- Mudge AW, Fellows RE.: Bovine pituitary pyroglutamate aminopeptidase. *Endocrinology* 1973, 93:1428
- 43.- Garat B, Miranda J, Charli JL, Joseph-Bravo P.: Presence of a membrane bound pyroglutamate aminopeptidase degrading thyrotropin releasing hormone in rat brain. *Neuropeptides* 1985, 6:27-40
- 44.- O'Connor B, O'Cuinn G.: Purification and kinetic studies on a narrow specificity synaptosomal membrane Pyroglutamate aminopeptidase from guinea pig brain. *Eur. J. Biochem.* 1985, 150: p 47-52
- 45.- Wilks S.: Neuropeptide specific peptidases: does brain contains a specific TRH degrading enzyme?. *Life Sci.* 1986, 39:1487-1492
- 46.- Charli JL, Méndez M, Joseph-Bravo P, Wilk S.: Specific inhibitors of pyroglutamate aminopeptidase I and prolendopeptidase do not change TRH in vitro release or content in rodent brain. *Neuropeptides* 1987, 9:373-378
- 47.- Charli JL, Méndez M, Vargas MA, Cisneros M, Assai M, Joseph-Bravo P, Wilk S.: Pyroglutamate aminopeptidase II inhibition specifically increases recovery of TRH released from rat brain slices. *Neuropeptides* 1989, 14:191-196
- 48.- Labrie F, Barden N, Poirier G, Delan A.: Binding of TRH to plasma membrane of bovine anterior pituitary gland. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1972, 69:283
- 49.- Wilber JF, Siebel MJ.: Thyrotropin-releasing hormone interactions with an anterior pituitary receptor. *Endocrinology* 1973, 92:888-893
- 50.- Gourdjji D, Tixier-Vidal A, Movin A, Pradelles P, Morgat JL, Fromageot P, Kerdelhue B.: Binding of a thyrotropin-releasing factor to a prolactin secreting clonal cell line (GH3). *Exp. Cell. Res.* 1973, 82:39-46
- 51.- Hinkle PM, Tashjian AH.: Receptors for TRH in prolactin producing rat pituitary cells in culture. *J. Biol. Chem.* 1973, 248:6180
- 52.- Burt OR, Snyder SH.: Thyrotropin releasing hormone (TRH): apparent receptor binding in rat brain membranes. *Brain Res.* 1975, 93:309-328
- 53.- Antakly T, Zeytinoglu F, Pelletier G, Labrie F.: Autohistoradiographic localization of thyrotropin-releasing hormone (TRH)-binding sites in cultured rat pituitary cells. *Exp. cell. Res.* 1979, 122:294-399
- 54.- Grant G, Vale W, Guillemin R.: Interactions of thyrotropin-releasing factor with membrane receptors of pituitary cells. *Biochem. Biophys Res. Commun.* 1972, 46:28
- 55.- Ogawa N, Yamawaki Y, Kuroda H, Nukina I, Ota Z, Fujino M, Yanaihara N.: Characteristics of thyrotropin releasing hormone (TRH) receptors in rat brain. *Peptides* 1982, 3:669
- 56.- Rostene WH, Morgat JL, Dussailant M, Rainbows TC, Sarrieau A, Vial M, Rosselin G.: In vitro biochemical characterization and autoradiographic distribution of <sup>3</sup>H-thyrotropin releasing hormone binding sites in rat brain. *Neuroendocrinology* 1984, 39:81
- 57.- Hinkle PM, Kinsella PA.: Regulation of thyrotropin-releasing hormone stimulates GTP hydrolysis by membranes from GH4C1 rat pituitary cells. *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. USA 1984, 116:73
- 58.- Straub RE, Gershengorn MC.: Thyrotropin-releasing hormone and GTP activate inositol triphosphate formation in membranes isolated from rat pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:2712
- 59.- Lucas DO, Bajjalieh SM, Kowalchik JA, Martin TF.: Direct stimulation by thyrotropin-releasing hormone (TRH) of polyphosphoinositide hydrolysis in GH3 cells membranes by a guanine nucleotide-modulated mechanism. *Biophys. Biochem. Res. Commun.* 1985, 132:721
- 60.- Martin TFJ, Bajjalieh S, Lucas DO, Kowalchik JA.: Thyrotropin-releasing hormone stimulation of phosphoinositide hydrolysis in GH3 cell membranes is GTP dependent but insensitive to cholera or pertussis toxin. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:10041
- 61.- De la Peña P, Delgado LM, Del Camino D, Barros F.: Cloning and expression of the thyrotropin-releasing hormone receptor from GH3 rat anterior pituitary cells. *Biochem. J.* 1992, 284:891-899
- 62.- Parmenter M, Libert F, Maenhart C, Lefert A, Gerard C, Perret J, Vansande J, Dumont JE, Vassart G.: Molecular cloning of thyrotropin-releasing hormone receptor. *Science* 1989, 246:1620-1622
- 63.- Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershengorn MC.: Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 1990, 87:9514-9518
- 64.- De la Peña P, Delgado ML, Del Camino D, Barros F.: Two isoforms of the thyrotropin-releasing hormone receptor generated by alternative splicing have indistinguishable functional properties. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:25703-25708
- 65.- Sellar RE, Taylor PL, Lamb RF, Zabavnik J, Anderson L, Eidner KA.: Functional expression and molecular characterization of the thyrotropin-releasing hormone receptor from the rat anterior pituitary gland. *J. Mol. Endocrinol* 1993, 10:199-206
- 66.- Nussenvarg DR, Heinflink M, Gershengorn MC.: Agonist-stimulated internalization of the TRH receptor is dependent on two domains in the receptor carboxyl terminus. *J. Biol. Chem.* 1993, 268:2389-2392
- 67.- Hinkle PM, Tashjian AH, Jr.: Thyrotropin-releasing hormone regulates the number of its own receptor in the GH3 strain of pituitary cells in culture. *Biochemistry* 1975, 14:3845-3851
- 68.- Gershengorn MC.: Bihormonal regulation of the thyrotropin releasing hormone receptor in mouse pituitary thyrotropic tumour cell in culture. *J. Clin. Invest.* 1978, 62:937
- 69.- Fujimoto J, Straub RE, Gershengorn MC.: Thyrotropin-releasing hormone (TRH) and phorbol myristate acetate decrease TRH receptor mRNA in rat pituitary GH3 cells. Evidence that protein kinase C mediates the TRH effect. *Mol. Endocrinol.* 1991, 5:1527-1532
- 70.- Fujimoto J, Narayanan CS, Benjamin JE, Heinflink M, Gershengorn MC.: Mechanism on action of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in stably transfected rat pituitary cells. *Endocrinology* 1992, 130:1879-1884
- 71.- Narayanan CS, Fujimoto J, Geras-Raaka, Gershengorn MC.: Regulation by TRH of TRH receptor mRNA degradation in rat pituitary GH3 cells. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:17296-17303
- 72.- Schomburg L, Bauer K.: Thyroid hormones rapidly and stringently regulate the messenger RNA levels of the thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor and the TRH-degrading ectoenzyme. *Endocrinology* 1995, 136:3480-3485
- 73.- Gershengorn MC, Marcus-Samuel BE, Geros E.: Estrogens increase the number of thyrotropin-releasing hormone receptors on mammatropic cells in culture. *Endocrinology* 1979, 105:171-176
- 74.- Premont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ.: Protein kinases that phosphorylate

- activated G protein-coupled receptors. *FASEB J.* 1995, 9: 175-182
- 75.- Perlman JH, Gershengorn MC.: Thyrotropin-releasing hormone stimulation of phosphoinositide hydrolysis desensitizes. Evidence against mediation by protein kinase C or calcium. *Endocrinology* 1991, 129: 2679-2686
- 76.- Hinkle PM.: Pituitary TRH receptors. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1989, 553:176-187
- 77.- Ashworth R, Yu R, Nelson EJ, Dermer S, Gershengorn MC, Hinkle PM.: Visualization of the thyrotropin-releasing hormone receptor and its ligand during endocytosis and recycling. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995, 92:512-516
- 78.- Yu SS, Lefkowitz RJ, Hausdorff WP.: Beta-adrenergic receptor sequestration. A potential mechanism of receptor resensitization. *J. Biol. Chem* 1993, 268:337-341
- 79.- Lefkowitz RJ.: G protein-coupled receptors and receptor kinases: From molecular biology to potential therapeutic applications. *Nature Biotechnol.* 1996, 283-286
- 80.- Gershengorn MC, Thaw C.: Thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulates biphasic elevation of cytoplasmic free calcium in GH3 cells. Further evidence that TRH mobilizes cellular and extracellular  $Ca^{2+}$ . *Endocrinology* 1985, 116:591-596
- 81.- Nelson EJ, Hinkle PM.: Characteristics of the  $Ca^{2+}$  spike and oscillations induced by different doses of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in individual pituitary cell and nonexcitable cell transfected with TRH receptor complementary deoxyribonucleic acid. *Endocrinology* 1994, 135:1084-1092
- 82.- Albert PR, y Tashjian AHJr.: Relationship of thyrotropin-releasing hormone-induced spike and plateau phases in cytosolic free  $Ca^{2+}$  concentrations to hormone secretion. Selective blockade using ionomycin and nifedipine. *J. Biol. Chem.* 1984, 259:15350-15363
- 83.- Li P, Thaw CN, Sempowsky GD, Gershengorn MC, Hinkle PM.: Characterization of the calcium response to thyrotropin-releasing hormone (TRH) in cells transfected with TRH receptor complementary DNA: Importance of voltage-sensitive calcium channels. *Mol. Endocrinol.* 1992, 6:1393-1402
- 84.- Nelson EJ, Hinkle PM.: Thyrotropin-releasing hormone activates  $Ca^{2+}$  efflux. Evidence suggesting that a plasma membrane  $Ca^{2+}$  pump is an effector for a G-protein coupled  $Ca^{2+}$ -mobilizing receptor. *J. Biol. Chem.* 1992, 269(49):30854-30860
- 85.- Dufy B, Jaken S, Baeker JL.: Intracellular  $Ca^{2+}$  dependent protein kinase C activation mimics delayed effects of thyrotropin-releasing hormone on clonal pituitary cell excitability. *Endocrinology* 1987, 121:793
- 86.- Brady KD, Han B, Tashjian AH.: Kinetics and reversibility of thyrotropin-releasing hormone-stimulated guanine nucleotide exchange in membranes from GH4C1 cells. *Mol. Pharmacol.* 46:644-652
- 87.- Paulssen RH, Paulssen EJ, Gautvic KM, Gordeladze JO.: The thyrotropin-releasing hormone receptor interacts directly with a stimulatory guanine-nucleotide-binding-protein in the activation of adenylyl cyclase in GH3 rat pituitary tumour cells. *Eur. J. Biochem.* 1992, 204:413-418
- 88.- Cussac D, Caccavelli L, Pellegrini I, Adinot V, Jaquet P, Enjalbert A.: Membrane receptors and coupling proteins in adenohypophyseal cells. *C.R. Seances Soc. Biol. Fil.* 1993, 187:14-23
- 89.- Di Marzo V, Vial D, Sokoloff P, Schwuarts JC, Piomelli D.: Selection of alternative G-mediated signaling pathways at the dopamine D2 receptor by protein kinase C. *J. Neurochem* 1993, 13:4046-4053
- 90.- Ohmichi M, Sawada T, Kanda Y, Koike K, Hirota K, Miyake A, Saltien AR.: Thyrotropin-releasing hormone stimulates MAP kinase activity in GH3 cells by divergent pathways. Evidence of a role for early tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 1994, 266:3783-3788
- 91.- Bogoyevitch MA, Glennon PE, Andersson MB, Lazou A, Marshall CJ, Sugden

- PH.: Acidic fibroblast growth factor or endothelin-1 stimulate the MAP kinase cascade in cardiac myocytes. *Biochem. Soc. Trans.* 1993, 287:589-594
- 92.- Vouret-Craviari V, Van-Obberghen-Schilling E, Scimeca JC, Van-Obberghen E, Pouyssegur J.: Differential activation of p44 MAPK (ERK-1) by alpha-thrombin-receptor peptide agonist. *Biochem. J.* 1993, 289:209-214
- 93.- Duff JL, Berker BC, Corson MA.: Angiotensin II stimulates the pp44 and pp42 mitogen-activated protein kinases in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 1992, 188:257-264
- 94.- Pang L, Decker SJ, Saltiel AR.: Bombesin and epidermal growth factor stimulate the mitogen-activated protein kinase through different pathways in Swiss 3T3 cells. *Biochem. J.* 1993, 289:283-287
- 95.- Wang Y, Simonson SJ, Saltiel AR.: Endothelin rapidly stimulates mitogen-activated protein kinase activity in rat mesangial cells. *Biochem. J.* 1992, 287:589-594
- 96.- Berra E, Diaz-Meco MT, Lozano J, Frutos S, Municio MM, Sanchez P, Sans L, Moscat J.: Evidence for a role of MEK and MAPK during signal transduction by protein kinase C zeta. *EMBO J.* 1995, 14:6157-63
- 97.- Van Biesen T, Hawes BE, Raymond JR, Luttrell LM, Koch WJ, Lefkowitz RJ.: G(o)-Protein alpha-subunits activate mitogen-activated protein kinase via a novel protein kinase C-dependent mechanism. *J. Biol. Chem.* 1996, 272:1266-1269
- 98.- Carroll MP, May WS.: Protein kinase C-mediated serine phosphorylation directly activates Raf-1 in murine hematopoietic cells. *J. Biol. Chem.* 1994, 269:1249-56
- 99.- Ross PC, Judd AM, Macleod RM.: The dynamics of arachidonic acid liberation and prolactin release: a comparison of thyrotropin releasing hormone, angiotensin II, and neurotensin stimulation in perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1988, 123:2445-2453
- 100.- Axelrod J.: Receptor-mediated activation of phospholipase A2 and arachidonic acid release in signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 1990, 18:503-507
- 101.- Burch RM.: G protein regulation of phospholipase A2: partial reconstitution of the system in cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1990, 279:185-195
- 102.- Davidson FF, Dennis EA.: Evolutionary relationship and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J. Molec. Evol.* 1990, 31:228-238
- 103.- Edgar AD, Freysz L, Mandel P, Horrocks LA.: Phospholipids metabolism in low and high density C6 cells. *Trans. Am. Soc. Neurochem.* 1980, 11:150
- 104.- Van den Bosch H.: Intracellular phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta* 1980, 604:191-264
- 105.- Burch RM.: Diacylglycerol stimulates phospholipase A2 from Swiss 3T3 fibroblast. *FEBS Lett.* 1988, 234:283-286
- 106.- Parker J, Daniel LW, Waite MJ.: Evidence of protein kinase C involvement in phorbol diester-stimulated arachidonic acid release and prostaglandin synthesis. *J. Biol. Chem.* 1987, 262:5385-5393
- 107.- Lin LL, Wartmann M, Lin A, Knopf JL, Seth A, Davis RJ.: cPLA2 is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* 1993, 72:269-278
- 108.- Nemenoff RA, Wints S, Quian N-X, Putten VV, Johnson GL, Heasley LE.: Phosphorylation and activation of high molecular weight form of phospholipase A2 by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 1993, 268:1960-1964
- 109.- Loeb LA, Gross RW.: Identification and purification of sheep platelet phospholipase A2 isoforms. Activation by physiological concentration of calcium ion. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:10467-10470
- 110.- Albert DH, Snyder F.: Biosynthesis of alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine (platelet-activating factor) from 1-alkyl-2-acyl-2sn-glycero-

- phosphocholine by rat alveolar macrophages. Phospholipase A2 and acetyl transferase activities during phagocytosis and ionophore stimulation. *J. Biol. Chem.* 1983, 258:97-102
- 111.- Irvine RF.: How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells? *Biochem. J.* 1982, 204:3-16
- 112.- Prescott SM, Majerus PW.: Characterization of 1,2-diacylglycerol hydrolysis in human platelets. Demonstration of an arachidonyl-monoacylglycerol intermediate. *J. Biol. Chem.* 1983, 258:764-769
- 113.- Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishai H, Bunsal VS, Wilson DB.: The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science* 1986, 234:1514-1526
- 114.- Verheij HM, Volwerk JJ, Jansen EH, Puyk WC, Dykstra BW, Drenth J, Haas GH.: Methylation of histidine-48 in pancreatic phospholipase A2. Role of histidine and calcium ion in the catalytic mechanism. *Biochemistry* 1980, 19:743:750
- 115.- Wery J-P, Schevits RW, Clawson DK, Bobbitt JL, Dow ER, Gamboa G, Goodson JR, Hermann RB, Kramer RM, McClure DB. *et al.*: Structure of recombinant human rheumatoid arthritic synovial fluid phospholipase A2 at 2.2 Angstrom resolution. *Nature (lond)* 1991, 352:79-82
- 116.- Kramer KM, Hession C, Johansens B, Hayes G, Mcgray P, Chow PE, Tizaed R, Pepinsky BR.: Structure and properties of human non-pancreatic phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:5768-5775
- 117.- Kennedy SP, Becker EL.: Ectophospholipase A2 activity of the rabbit peritoneal neutrophil. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 1987, 83:238-246
- 118.- Clark JD, Lim LL, Kriz RW, Ramesha CS, Sultzman LA, Milona AY, Knopf N.: A novel arachidonic acid selective cytosolic PLA2 contains a Ca<sup>2+</sup>-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell* 1991, 65:1043-1051
- 119.- Balsinde J, Diez E, Schiller A, Mollinedo FO.: Phospholipase A2 activity in resting and activated human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1991, 263:1926-1636
- 120.- Kramer RM, Roberts EF, Manetta S, Putnam JE.: The Ca<sup>2+</sup> sensitive cytosolic phospholipase A2 is a 100-Kda protein in human monoblast U397 cells. *J. Biol. Chem.* 1991, 266:52685272
- 121.- Lin L, Lin AY, Knopf N.: Cytosolic phospholipase A2 is coupled to hormonally regulated release of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1992, 89:6147-6151
- 122.- Chien KR, Reeves JP, Buja M, Bonte F, Parker RW, Willerson JT.: Phospholipids alterations in canine ischemic myocardium. *Circ. Res.* 1981, 48:711-719
- 123.-Sevanian A, Muakkassah-Kelly SF, Montestruque S.: The influence of PLA2 and glutation peroxidase on the elimination of membrane lipids peroxides. *Arch. Biochem. Biophys.* 1983, 223:441-452
- 124.- Sweatt JD, Blair IA, Crague EJ, Limbird LE.: Inhibitors of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> exchange block epinephrine and ADP-induced stimulation of human platelet phospholipase C by blockade of arachidonic acid release at a prior step. *J. Biol. Chem.* 1986, 261:8660-8666
- 125.- Chang JP, Morgan RO, Catt KJ.: Dependence of secretory response to gonadotropin-releasing hormone on diacylglycerol metabolism. Studies with a diacylglycerol lipase inhibitor RHC80267. *J. Biol. Chem.* 1988, 263:18614-18621
- 126.- Kikkawa J, Kishimoto A, Nishizuka Y.: The protein kinase C family: Heterogeneity and its implications. *Annu. Rev. Biochem.* 1989, 58:31-44
- 127.- Naor Z.: Further characterization of protein kinase-C subspecies in the hypothalamo-pituitary axis: Differential activation by phorbol esters. *Endocrinology* 1990, 126:1521
- 128.- Khan WA, Blobe GG, Hannun YA.: Activation of protein kinase C by oleic acid. Determination and analysis of inhibition by detergent micelles and

- physiologic membranes: requirement for free oleate. *J. Biol. Chem.* 1992, 267:3605-3612
- 129.- Budan L, Fargo A.: Dual effect of arachidonic acid on the protein kinase C isozyme isolated from rabbit thymus cells. *FEBS Lett.* 1990, 276:223-226
- 130.- Borns DJ, Bloomenthal J, Lee M-H, Bell X.: Expression of the alpha, beta II, and gamma protein kinase C isozymes in the vaccinia virus-insect cell expression system. *J. Biol. Chem.* 1990, 265:12044-12051
- 131.- Lester DS.: In vitro linoleic acid activation of protein kinase C. *Biochem. Biophys. Acta* 1990, 1054:297-303
- 132.- Lester DS, Collin C, Etcheberrigaray R, Alkon DL.: Arachidonic acid and diacylglycerol act synergistically to activate protein kinase C in vitro and in vivo. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991, 179:1522-1528
- 133.- Han JW, MacCormick F, Macora IG.: Regulation of Ras-GAP and the neurofibromatosis-1 gene product by eicosanoids. *Science* 1991, 252:576-579
- 134.- Pilote S, Vellarand P, Borgeat P.: Transformation of arachidonic acid in the rat anterior pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1982, 104:867-873
- 135.- Masferrer JL, Zweifel BS, Manning PT, Hauser SD, Leahy KN, Smith WA, Isakson PC, Seiber K.: Selective inhibition of inducible cyclooxygenase 2 in vivo is antiinflammatory and non ulcerogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91:3228-3232
- 136.- Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, Lee L, Isakson P.: Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994, 91:12013-12017
- 137.- Morita I, Schindler M, Ragier MK, Otto Jc, Hori DL, Dewitt DL, Smith WL.: Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and 2. *J. Biol. Chem.* 1995, 270:10902-10908
- 138.- Roth GR, Siok CJ.: Acetylation of the NH<sub>2</sub> terminal serine of prostaglandin synthetase by aspirin. *J. Biol. Chem.* 1978, 253:3782-3784
- 139.- Shimizu T, Wolfe LS.: Arachidonic acid cascade and signal transduction. *J. Neurochem.* 1990, 55:1-15
- 140.- Veda N, Hiroshima A, Natsui K, Shinjo F, Yshimoto T, Yamamoto K, Li K, Geroziannis K, Dray F.: Localization of arachidonate 12-lipoxygenase in parenchymal cells of porcine anterior pituitary. *J. Biol. Chem.* 1990, 265:2311-2316
- 141.- Wong A, Cook MN, Foley JJ, Sarau HM, Marshall P, Hwang SM. Influx of extracellular calcium is required for the membrane translocation of 5-lipoxygenase and leukotriene synthesis. *Biochemistry* 1991, 30: 9346-9354
- 142.- Rouzer CA, Kargman S.: Translocation of 5-Lox to the membrane in human leukocytes challenged with ionophore A23187. *J. Biol. Chem.* 1988, 263:1098
- 143.- Abramovits M, Wong E, Cox ME, Richardson CD, Li C, Vickers PJ.: 5-lipoxygenase-activating protein stimulates the utilization of arachidonic acid by 5-lipoxygenase. *Eur. J. Biochem* 1993, 215:105-111
- 144.- Woods JW, Evans JF, Ethier D, Scott S, Vickers PJ, Hearn L, Herbein JA, Charleson S, Singer L.: 5-lipoxygenase and 5-lipoxygenase activating protein are localized in the nuclear envelope of activated human leukocytes. *J. Exp. Med.* 1993, 178:1935-1946
- 145.- Mancini JA, Abramovits M, Cox ME, Wong E, Charleson S, Perrier H, Wong Z, Prosit P, Vickers PJ.: 5-lipoxygenase-activating protein is an arachidonate binding protein. *FEBS Lett.* 1993, 318:277-281
- 146.- Nelson MJ, Jets SP.: The structure and function of lipoxygenase. *Current Opinion in Struct. Biol.* 1994, 4:874-884
- 147.- Kühn H, Schewe T, Rapoport SM. En: *Advances in enzymology*, Maister A (ed). John Wiley Sons N.Y. 1986, V. 58, P. 273
- 148.- Shimizu T, Radmark O, Samuelsson B.: Enzyme with dual lipoxygenase activities catalyzes leukotriene A<sub>4</sub> synthesis from arachidonic acid. *Proc. Natl.*

- Acad. Sci. USA. 1984, 81:869-893
- 149.- Shimizu T, Izumi T, Seyama Y, Tadokuro K, Radmark O, Samuelsson B.: Characterization of leukotriene A4 synthase from murine mast cells. Evidence for its identity to arachidonate 5-lipoxygenase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986, 83:4175-4176
- 150.- Goetze AM, Fayer L, Bovska J, Bornemeier D, Carter GW.: Purification of a mammalian 5-lipoxygenase from rat basophilic leukemia cells. Prostaglandins 1985, 29: 689-701
- 151.- Rouzer CA, Samuelsson B.: On the nature of 5-lipoxygenase in human leukocytes: Enzyme purification and requirements for multiple stimulatory factors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1985, 82:6040-6044
- 152.- Rouzer CA, Matsumoto T, Samuelsson B.: Single protein from human leukocytes possesses 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1986, 83:857-861
- 153.- Hogaboom GK, Cook N, Newton JF, Varrichio A, Shorr RGL, Sarau HM, Crooke ST.: Purification, characterization, and structural properties of a single protein from rat basophilic leukemia cells (RBL-1) possessing 5-lipoxygenase and leukotriene A4 synthase activities. Mol. Pharmacol 1986, 30:510-519
- 154.- Radmark O, Shimizu T, Jörnvall H, Samuelsson B.: Leukotriene A4 hidrolase in human leukocytes. Purification and properties. J. Biol. Chem. 1984, 259:12339-12345
- 155.- Vans JF, Dupuis P, Ford-Hutchinson AW.: Purification and characterization of leukotriene A4 hidrolase from rat neutrophils. Biochim. Biophys. Acta 1985, 840:43-50
- 156.- Izumi T, Shimizu T, Seyama Y, Ohishi N, Takaku F.: Tissue distribution of LTA4 hidrolase in guinea pig. Biochem. Biophys. Res. Commun. 1986, 153:139-145
- 157.- Orning L, Jones DA, Fitzpatrick FA.: Mechanism-based inactivation of leukotriene A4 hidrolase during leukotriene B4 formation by human erythrocytes. J. Biol. Chem. 1990, 265:14911-14916
- 158.- Minami M, Mutoh H, Ohishi N, Honda L, Bito H, Shimizu T.: Amino-acid sequence and tissue distribution of guinea pig leukotriene A4 hidrolase. Gene 1995, 161:246-251
159. Wetterholm A, Medina JF, Radmark O, Shapiro R, Haeggstrom JL, Valle BL, Samuelsson B.: Recombinant mouse leukotriene A4 hidrolase: A zinc metalloenzyme with dual enzymatic activities. Biochim. Biophys. Acta 1991, 1080:96-102
- 160.- Medina JF, Wetterholm A, Radmark O, Shapiro R, Haeggström JZ, Valle BL, Samuelsson B.: Leukotriene A4 hidrolase: Determination of the three zinc-binding ligands by site-directed mutagenesis and zinc analysis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991, 88:7620-7624
- 161.- Hooper NM.: Families of zinc metallopeptidases. FEBS Lett. 1994, 354:1-6
- 162.- Tsuchida S, Izumi T, Shimizu T, Ishikawa T, Hatayama I, Satoh K, Sato K.: Purification of a new acidic glutathione S-transferase, GST-Yn1Yn1, with a high leukotriene-C4 synthase activity from rat brain. Eur. J. Biochem. 1987, 170: 159-164
- 163.- An S, Schmidt FJ, Campbell BJ.: Molecular cloning of sheep lung dipeptidase: a glycosyl phosphatidylinositol-anchored ectoenzyme that converts leukotriene D4 to leukotriene E4. Biochim. Biophys. Acta 1994, 1226:337-340
- 164.- Sautebin L, Spagnuolo C, Galli C, Galli G.: A mass fragmentographic procedure for the simultaneous determination of HETE and PGF2  $\alpha$  in the central nervous system. Prostaglandins 1978, 16:985-988
- 165.- Spagnuolo C, Sautebin L, Galli G, Racagni G, Galli C, Mazzari S, Finess M.: PGF2  $\alpha$ , tromboxane B2 and HETE levels in gerbil brain cortex after ligation of common carotid arteries and decapitation. Prostaglandins 1979, 18:53-61

- 166.- Shimizu T, Takusagawa Y, Izumi T, Ohishi N, Seyama Y.: Enzymic synthesis of leukotriene B4 in the guinea pig brain. *J. Neurochem.* 1987, 48:1541-1546
- 167.- Capdevilla J, Parkhill L, Chacos N, Okita R, Mosters BSS, Estabrook RW.: The oxidative metabolism of arachidonic acid by purified cytochromes P-450. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1981, 101:1357-1363
- 168.- Capdevilla J, Snijder GD, Falck JR.: Epoxidation of arachidonic acid by anterior pituitary microsomal fraction. *FEBS Lett.* 1984, 17:319-322
- 169.- Capdevilla J, Chacos N, Werringloer J, Prough RA, Stabrook RW.: Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1981, 78:5362-5366
- 170.- Oltjw EH, Guenegerich FP, Oates JA.: Oxigenation of arachidonic acid by hepatic monooxygenases. *J. Biol. Chem.* 1982, 257:3771-3781
- 171.- Schwartzman ML, Falck JR, Yadari P, Escalante B.: Metabolism of 20-hydroxyeicosatetraenoic acid by cyclooxygenase. Formation and identification of novel endothelium-dependent vasoconstrictor metabolites. *J. Biol. Chem.* 1989, 264(20):11658-11662
- 172.- Schwartzman G, Abraham.: The renal cytochrome P450 arachidonic acid system. *Pediatr. Nephrol.* 1992, 6:490-498
- 173.- Sjolander A, Gronroos E. Leukotriene D4-induced signal transduction. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1994, 744:155-160
- 174.- Ott P, Hope MJ, Verkleij AL, Roelofsen B, Brodbeck V, Van Deenen LL.: Effect of the dimyristoyl phosphatidylcholine on intact erythrocytes. Release of spectrin-free vesicles without ATP depletion. *Biochim. Biophys. Acta* 1981, 641:79-87
- 175.- Fiore S, Maddox JF, Perez HD, Serhan CN.: Identification of a human cDNA encoding a functional high affinity lipoxin A4 receptor. *J. Exp. Med.* 1994, 180:253-260
- 176.- Badr KF, Deboer DK, Schwatberg M, Serhan CN.: Lipoxin A4 antagonized cellular and in vivo actions of leukotriene D4 in rat glomerular mesangial cells: Evidence for a competition at a common receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989, 86:3438-3442
- 177.- Samuelsson BM, Goldine M, Granström E, Hamberg M, Hummarstrom S, Malmsten.: Prostaglandins and tromboxanes. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 47:947-1029
- 178.- Samuelsson B.: Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science* 1983, 220:268
- 179.- Yamamoto S.: Mammalian lipoxygenases: molecular structures and functions. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1128:117-131
- 180.- Luthria DL, Baykousheva SP, Sprecher H.: Double bond removal from odd-numbered carbons during peroxisomal beta-oxidation of arachidonic acid requires both 2,4-dienoyl-CoA reductase and 3,5,delta 2,4-dienoyl-CoA isomerase. *J Biol. Chem.* 1995, 270:13771-13776
- 181.- Barbacid M.: Ras genes. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56:779-827
- 182.- Norman TC.: Neurosecretion by exocytosis. *Int. Rev. Cytol.* 1976,46:1-8
- 183.- Judd AM, Spangelo L, Ehreth JT, Macleod RM.: A possible role for lipoxygenase and epoxigenase arachidonate metabolism in prolactin release from pituitary cell. *Neuroendocrinology* 1988, 48:407-416
- 184.- Canonico PL.: Dopamine and the inhibition of prolactin secretion: involvement of multiple intracellular signals. En: Spano PF, Biggio G, Gessa G, (eds). *Central and peripheral dopamine receptor. Biochemistry and pharmacology.* Liviana Press. Padova Italy 1988, p. 237
- 185.- Millar SBA, Rozengurt E.: Arachidonic acid release by bombesin: a novel postreceptor target for heterologous mitogenic desensitization. *J. Biol. Chem.* 1990, 265:19973-19979
- 186.- Judd AM, Ross PC, Spangelo BL, Macleod RM.: Angiotensin II increases



- pituitary cells prolactin release and arachidonate liberation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1988, 57:115-121
- 187.- De Greef WJ, Visser TJ.: Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J. Endocrinol.* 1981, 91:213-223
- 188.- Steward VJ, Horner AJ, Fraser HM, Fink G.: Thyrotropin-releasing hormone in rat pituitary stalk blood and hypothalamus: Studies with high performance liquid chromatography. *Endocrinology* 1983, 113:1865-1869
- 189.- De Greef WJ, Klootwijk W, Kavels B, Visser TJ.: Levels of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in hypophyseal stalk blood during an oestrogen-induced surge of prolactin in the ovariectomized rat. *J. Endocrinol.* 1985, 105:105-112
- 190.- Franks S.: Regulation of prolactin secretion by oestrogens: Physiological and pathological significance. *Cli. Sci. (Lond)* 1983, 65:457-462
- 191.- Augustine EC, Macleod RM.: Prolactin and growth hormone synthesis: effects of perphenazine, alpha methyl-tyrosine and estrogens in diferent thyroid states. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1975, 150:551-556
- 192.- Sharif NA.: Chronic prolactin, gonadal and thyroid hormone treatments in vivo alter levels of TRH and muscarinic receptors in male and female rat tissue. *Brain Res.* 1988, 449:364-368
- 193.- Walker AM, Farquar MG.: Preferential release of newly synthesized prolactin granules is the result of functional heterogeneity among mammatrophs. *Endocrinology* 1980, 167:1095-1104
- 194.- Annunziato L.: Regulation of the tuberoinfundibular and nigrostratial systems. *Neuroendocrinology* 1970, 29:66-73
- 195.- Hainseleder DJ, Moy AJ, Gala RR, Lawson DM.: The effect of transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in pregnant rat. *Endocrinology* 1986, 119:1980-1988
- 196.- Moore KE.: Interaction between prolactin and dopaminergic neurons. *Biol. Reprod.* 1987, 36:47-58
- 197.- Moore KE, Demarest KT, Lookingland K.: Stress, prolactin and hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuropharmacology* 1987, 26:801-808
- 198.- Martin MC, Weiner RI, Monroe SE, Roberts JM, Licko V, Jaffe RB.: Prolactin-secreting adenomas in women. Dopamine regulation of prolactin secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1984, 59:485
- 199.- Mena F, Enjalbert A, Carbonell L, Priam M, Kordon C.: Effects of suckling in plasma prolactin and hypothalamic monoamine levels in the rat. *Endocrinology* 1976, 99:445
- 200.- Chiochio SR, Cannata MA, Cordero Funes JR, Tramezzani JH.: Involvement of adenohipophyseal dopamine in the regulation of prolactin release during suckling. *Endocrinology* 1979, 105:544
- 201.- Selmanoff M, Wise PM.: Decrease dopamine in the median eminence in response to suckling in the lactating rat. *Brain Res.* 1981, 212:101
- 202.- Ben-Jonathan N, Neill MA, Arbugost LA, Peters LL, Hofer MT.: Dopamine in hypophyseal portal blood: relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* 1980, 106:690
- 203.- Cronin MJ, Roberts JM, Weiner RI.: Dopamine and dihydroergocryptine binding to the anterior pituitary and other brain areas of the rat and sheep. *Endocrinology* 1978, 103:302
- 204.- Barnes GD, Brown BL, Gard TG, Alkinson D, Ekins RP.: Effect of TRH and dopamine on cyclic AMP in enriched mammatroph and tirotroph cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1978, 12:273-284
- 205.- De Camilli P, Macconi D, Spada A.: Dopamine inhibits adenilate cyclase in human prolactin secreting adenomas. *Nature* 1979, 252:278
- 206.- Giannattasio G, Spada A, Nicosia S, De Camilli P.: Transduction of dopamine

- and vasoactive intestinal polypeptide signals in prolactin-secreting cells. En: Mena F, Valverde C (eds). Prolactin secretion: A Multidisciplinary Approach. Academic Press, Orlando FL. 1984, P. 187
- 207.- Giannattasio G, De Ferrari ME, Spada A.: Dopamine inhibited adenilate cyclase in female rat adenohypophysis. *Life Sci.* 1981, 28:1605
- 208.- Swennen L, Denef C.: Physiological concentrations of dopamine decrease cAMP levels in cultured rat anterior pituitary cells and enriched populations of lactotrophs: Evidence for a casual relationship to inhibition of prolactin release. *Endocrinology* 1982, 111:398
- 209.- Schofield SG.: Use of a trapped fluorescent indicator to demonstrate effects of thyroliberin and dopamine on cytoplasmic calcium concentrations in bovine anterior pituitary cells. *FEBS Lett* 1983, 159:79
- 210.- Lafond S, Collu R.: Effects of repeated stimulation of prolactin release in vitro from normal and adenomatous rat lactotrophs. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1986, 47:175-181
- 211.- Thorner MO, Hackett JT, Murad F, MacLeod RM.: Calcium rather than cyclic AMP as the physiological intracellular regulator of prolactin release. *Neuroendocrinology* 1981, 31:390
- 212.- Simmons SH, Strange PG.: Inhibition of inositol phospholipid breakdown by D2 receptors in dissociated bovine anterior pituitary cells. *Neurosci. Lett.* 1985, 60:267-272
- 213.- Journot L, Homburger V, Pantoloni C, Priam M, Bockaert J, Enjalbert A.: An islet-activating protein-sensitive G protein is involved in dopamine inhibition of angiotensin and thyrotropin-releasing hormone-stimulated inositol phosphate production in anterior pituitary cells. *J. Biol. Chem.* 1987, 262:15106-15110
- 214.- Lledo PM, Legendre P, Israel JM, Vincent JD.: Dopamine inhibits two characterized voltage-dependent calcium currents in identified rat lactotroph cells. *Endocrinology* 1990, 127:990-1001
- 215.- Judd AM, Koike K, Macleod RM.: A possible role of arachidonate metabolism in the mechanism of prolactin release. *Am. J. Physiol.* 1986, 250: E288-E295
- 216.- Ross PC, Judd AM, Macleod RM.: The dynamics of arachidonic acid liberation and prolactin release: a comparison of thyrotropin-releasing hormone, angiotensin II, and neurotensin stimulation in perfused rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1988, 123:2445-43
- 217.- Grandison L.: Prolactin release from bovine pituitary cells is stimulated by melittin an activator of phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* (abstract) 1983, 42:3373
- 218.- Grandison L.: Stimulation of anterior pituitary prolactin release by melittin, an activator of phospholipase A2. *Endocrinology* 1984, 114:1-7
- 219.- Kiesel L, Przyliptak A, Rabe T, Przyliptak M, Runnebaum B.: Arachidonic acid and its lipoxigenase metabolites stimulate prolactin release in superfused pituitary cells. *Human Reprod.* 1987, 2:281-285
- 220.- Canonico PL, Judd AM, Koike K, Valdenegro CA, Macleod RM.: Arachidonate stimulates prolactin release in vitro: a role for the fatty acid and its metabolites as intracellular regulator(s) in mammotrophs. *Endocrinology* 1985, 116:218
- 221.- Camarotto AM, Grandison L.: Evidence supporting a correlation between arachidonic acid release and prolactin secretion from GH3 cells. *Endocrinology* 1985, 1506-1513
- 222.- Rabier MC, Chavis A, Crostes de Paulet, Damon M.: Arachidonic acid metabolism in cloned strain of rat pituitary tumour cells: correlation between 15-hydroxyeicosatetraenoic acid release and prolactin secretion process. *Prostaglandin Leukotriene Med.* 1987, 27:27-42
- 223.- Camarotto AM, Grandison L.: Inhibitors of arachidonic acid release and metabolism block basal and cAMP-stimulated prolactin release from GH3 cells. In prolactin: basic and clinical correlates. Macleod RM, Thorner MO, Scapagnini V.

- (eds). Padua, Italy 1985. Liviana Press. p. 219-228
- 224.- Canonico PL, Schettini G, Valdenegro CA, Macleod RM.: Arachidonic acid metabolism and prolactin secretion in vitro: a possible role for the lipoxygenase products. *Neuroendocrinology* 1983, 37:212-217
- 225.- Conte D, Flaschi P, Proioietti A, D'urso R, Citarella F, Nordio M, Romanelli F, Maggi R, Motta M, Isidore R.: Role of arachidonate metabolism on the in vitro release of luteinizing hormone and prolactin from the anterior pituitary gland: possible involvement of lipoxygenase pathway. *Neuroendocrinology* 1986, 43:428-434
- 226.- Judd AM, Login IS, Ehreth JT, Macleod RM.: Nafazatrom, an arachidonate metabolism inhibitor, decrease prolactin and GH release. *Eur. J. Pharmacol.* 1986, 128:151-156
- 227.- Koike K, Judd AM, Login IS, Yasumoto T, Macleod RM.: Maitotoxin, a calcium channel activator, increases prolactin release from rat pituitary tumour 7315a cells by a mechanism that may involve leukotriene production. *Neuroendocrinology* 1986, 43:283-290
- 228.- Ojeda SR, Jameson HE, McCann SM.: Effects of indomethacin and prolactin injections on plasma prolactin and growth hormone levels in rats. *Endocrinology* 1978, 102:531
- 229.- Ojeda SR, Naor Z, Negro-Villar A.: The role of prostaglandins in the control of gonadotropin and prolactin release. *Prostaglandins and Medicine* 1979, 5:249
- 230.- Ojeda SR, Negro-Villar A, Arimura A, McCann SM.: On the hypothalamic mechanism by which prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates growth hormone release. *Neuroendocrinology* 1980, 31:1
- 231.- Rabier M, Chavis C, Crostes de Paulet A, Damon M.: 15-lipoxygenase products stimulate prolactin secretion from a cloned strain of rat pituitary cells. *Neuroendocrinology* 1988, 47:323
- 232.- Canonico PL, Valdenegro CA, Macleod RM.: The inhibition of phospholipid turnover: a possible postreceptor mechanism for the prolactin secretion inhibiting effect of dopamine. *Endocrinology* 1983, 13:7-14
- 233.- Canonico PL, Macleod RM.: The role of phospholipid in hormonal secretion mechanism. In: Müller EE, Macleod RM. (eds). *Neuroendocrine perspectives*. Elsevier Science 1993. Amsterdam Vol 2:123
- 234.- Bjoro T, Larsen V, Englund K, Torjesen PA, Haug E.: The lipoxygenase inhibitor nafazatrom inhibits stimulated prolactin secretion in cultured rat lactotrophs (GH4C1 cells). *Scand. Clin. Invest.* 1992, 52:297-303
- 235.- Cashman JR, Hanks D, Weiner RI.: Epoxy derivatives of arachidonic acid are potent stimulators of prolactin secretion. *Neuroendocrinology* 1987, 46:246
- 236.- Roudbarnici MM, Vacher P, Drouhalt R.: Arachidonic acid increases cytosolic calcium and stimulates hormone release in rat lactotroph. *Am. J. Physiol.* 1995, 268:E1215-1223
- 237.- Koike K, Judd AM, Macleod RM.: 5-hydroxyeicosatetraenoic acid (5-HETE) increases prolactin release from rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 1985, 116:1813-1817
- 238.- Vacher P, McKenzie J, Dufy B.: Complex effects of arachidonic acid and its lipoxygenase products on cytosolic calcium in GH3 cells. *Am. J. Physiol.* 1992, 263:E903-912
- 239.- *Am. J. Physiol.* 1989, (2 Pt 1): E203-211
- 240.- Ohmichi M, Hirota K, Koike K, Kadowaki K, Yamaguchi M, Miyake A, Tanizawa O.: Dopamine inhibits the arachidonate and prolactin release stimulated by thyrotropin-releasing hormone through islet-activating protein sensitive GTP-binding protein in anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 1990, 52: 75-81
- 241.- Delbeke D, Dannies PS.: Stimulation of the adenosine 3',5'-monophosphate and the calcium messenger system together reverse dopaminergic inhibition of prolactin release. *Endocrinology* 1985, 117:439

- 242.- Login IS, Judd AM.: Trophic effects of somatostatin on calcium flux: dynamic analysis and correlation with pituitary hormone release. *Endocrinology* 1986, 119:1703-1707
- 243.- Login IS, Judd AM, MacLeod RM.: Dopaminergic reduction of intracellular calcium: The role of calcium influx. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1988, 151:913-918
- 244.- Bauer K.: Purification and characterization of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme. *Eur. J. Biochem.* 1994, 38:1-10
- 245.- Danielsen EM.: Biosynthesis of intestinal microvillar proteins. Dimerization of aminopeptidase M and lactose plorizin hydrolase. *Biochemistry* 1990, 29:305-308
- 246.- O'Connor B, O'Cuinn G.: Localization of a narrow-specificity thyroliberin hydrolyzing pyroglutamate aminopeptidase in synaptosomal membranes of guinea pig brain. *Eur. J. Biochem.* 1984, 144:271-278
- 247.- Wilk S, Wilk E.: Pyroglutamil peptidase II, a thyrotropin releasing hormone degrading enzyme. *Neurochem Int.* 1985, 15:81-90
- 248.- Czekay G, Bauer K.: Identification of the thyrotropin-releasing hormone-degrading ectoenzyme as a metallopeptidase. *Biochem. J.* 1993, 290:921-9216
- 249.- Vargas MA, Cisneros M, Herrera J, Joseph-Bravo P, Charli JL.: Regional distribution of the membrane-bound pyroglutamate aminopeptidase degrading thyrotropin-releasing hormone in rat brain. *Neuroscience Lett.* 1987, 79:311-314
- 250.- Bauer K, Carmeliet P, Schulz M, Baes M, Denef C.: Regulation and cellular localization of the membrane-bound thyrotropin-releasing hormone-degrading enzyme in primary cultures of neuronal, glial and adenohipophyseal cells. *Endocrinology* 1990, 127:1224
- 251.- Vargas MA, Herrera J, Uribe RM, Charli JL, Joseph-Bravo P.: Ontogenesis of pyroglutamyl peptidase II activity in rat brain, adenohipophysis and pancreas. *Develop. Brain. Res.* 1992, 66:251-256
- 252.- Cruz C, Charli JL, Vargas MA, Joseph-Bravo P.: Neuronal localization of piroglutamate aminopeptidase II in primary cultures of fetal mouse brain. *J. Neurochem.* 1991, 56:1594-1601
- 253.- Bauer K.: Adenohipophyseal degradation of thyrotropin releasing hormone regulated by thyroid hormones. *Nature* 1987, 330:375-377
- 254.- Ponce G, Charli JL, Pasten JA, Aceves C, Joseph-Bravo P.: Tissue-specific regulation of piroglutamate aminopeptidase II activity by thyroid hormones. *Neuroendocrinology* 1988, 48:211-213
- 255.- Bauer K.: Degradation and biological inactivation of thyrotropin releasing hormone (TRH): regulation of the membrane-bound TRH-degrading enzyme from rat anterior pituitary by estrogens and thyroid hormones. *Biochimie.* 1988, 70:69-74
- 256.- Schomburg L, Bauer K.: Pretranslational regulation of the TRH-degrading ectoenzyme and the TRH receptor by estrogens. In 38<sup>th</sup> Symposium der DGE (German Society of Endocrinology) Leipzig 1995 P. 1-4
- 257.- Uribe RM, Joseph-Bravo P, Pasten J, Ponce G, Méndez M, Covarrubias L, Charli JL.: Some events of thyrotropin-releasing hormone metabolism are regulated in lactating and cycling rats. *Neuroendocrinology* 1991, 54:493-498
- 258.- Vargas MA, Joseph-Bravo P, Charli JL.: Thyrotropin-releasing hormone downregulates pyroglutamyl peptidase II activity in adenohipophyseal cells. *Neuroendocrinology* 1994, 60:322-330
- 259.- Suen CS, Wilk S.: Rapid inactivation and phosphorylation of pyroglutamyl peptidase II in Y-79 retinoblastoma cells following exposure to phorbol ester. *Endocrinology* 1990, 127:3038-3046
- 260.- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951, 193:265
- 261.- Aubert ML.: Radioimmunoassay for human prolactin en: *Handbook of*

- radioimmunoassay: clinical and biochemical analysis Vol. 5 ed: EG Abraham, Marcel Dekker INC. NY. 1977
- 262.- Schaub T, Ishikawa T, Keppler D.: ATP-dependent leukotriene export from mastocytoma cells. *FEBS Lett.* 1991, 279:83-86
- 263.- Ishikawa T, Muller M, Klunemen C, Schaub T, Keppler D.: ATP-dependent primary active transport of cysteinyl leukotrienes across liver canalicular membrane. Role of the dependent transport system for glutathione S-conjugates. *J. Biol. Chem.* 1990, 265:19279-19286
- 264.- Loe DL, Almgvist KC, Deeley RG, Cole SPC.: Multidrug resistance protein (MRP)-mediated transport of leukotriene C4 and chemotherapeutic agent in membrane vesicles. *J. Biol. Chem.* 1996, 271:9675-9682
- 265.- Van der Zee J, Eling TE, Mason RP.: Formation of free radical metabolites in the reaccion between soybean lipoxygenase and its inhibitors: an ESR study. *Biochemistry* 1990 28:8363-8367
- 266.- Kim MR, Sok DE.: Irreversible inhibition of soybean lipoxygenase-1 by hidroperoxy acids as substrates. *Arch. Biochem. Biophys.* 1991, 288:270-275
- 267.- Winterbourn CC.: Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Radic. Biol. Med.* 1993, 14:85-90
- 268.- Winterbourn CC, Metodiewa D.: The reaction of superoxide with reduced glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.* 1994, 314:284-290
- 269.- Sporn PHS, Peters-Golden M., Simon R.H.: Hydrogen-peroxyde induced arachidonic acid metabolism in the rat alveolar macrophage. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1988, 137:49-56
- 270.- Sporn PHS, Peters-Golden M.: Hydrogen peroxide inhibits alveolar macrophage 5-lipoxygenase metabolism in association with depletion of ATP. *J. Biol. Chem.* 1988, 263:14776-14783
- 271.- Rock J., Despot J., Lemanske RF: Mast cell granules modulate alveolar macrophages. *Clin. Exp. Immunol.* 1990, 74:477-482
- 272.- Au AM, Chan PH, Fishman.: Stimulation of phospholipase A2 activity by oxygen-derived free radicals in isolated brain capillaries. 1985, 27:449-453
- 273.- Walker GC.: The formation of the radicals during the reaction of soybean lipoxydase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1963, 13:431-434
- 274.- Chamulitrat W, Mason RP.: Lipid peroxy radical intermediates in the peroxidation of polyunsaturated fatty acid by lipoxygenase. *J. Biol. Chem.* 1986, 264:20968-20973
- 275.- Kemal C, Louis-Flamberg P, Krupinski-Olsen R, Shorter AL.: Reductive inactivation of soybean lipoxygenase 1 by catechols: A possible mechanism for regulation of lipoxygenase activity. *Biochemistry* 1987, 26:7064-7072
- 276.- Chan AC, Tran K, Rainor T, Ganz PR, Chow CK.: Regeneration of vitamin E in human platelets. *J. Biol. Chem.* 1991, 266(26):17290-17295
- 277.- Griffin K, Gierse J, Krivi G, Fitzpatrick FA.: Opioid peptides are substrates for the bifunctional enzyme LTA hydrolase/aminopeptidase: Structural and functional properties of the active center. *J. Lipid Mediat.* 1993, 6:1-3
- 278.- Haeggström JZ, Wetterwolm A, Medina JF, Samuelsson B.: Leukotriene A4 hydrolase: Structural and functional properties of the active center. *J. Lipid Mediat.* 1993, 6:1-3
- 279.- Ohisi N, Izumi T, Minami M, Kitamura S, Seyama Y, Okawa O, Yatsumoto H, Takaku F, Shimizu T.: Leukotriene A4 hydrolase in the human lung: Inactivation of the enzyme with leukotriene A4 isomers. *J. Biol. Chem.* 1987, 262:10200-10205
- 280.- Mayorga LS, Beron W, Sarrof MN, Colombo MI, Creutz C, Sthal PD.: Calcium-dependent fusion among endosomes. *J. Biol. Chem* 1994, 269(49):30927-30934
- 281.- Rankin S, Ruzengurt E.: Integrin and signal transduction pathways: The road taken. *Science* 1995, 268:233-239
- 282.- Peppelenbosch MP, Quiu Rg, de Vries-Smits AM, Tertoolen LG, de Laat SW,

- MacKormick K, Hall A, Symons H, Bos JL.: Rac mediates arachidonic acid release. *Cell* 1995, 81:849-856
- 283.- Gottlieb TA, Iranov IE, Adesnik MA, Sabatini DD.: Actin microfilaments play a critical role in endocytosis of the apical but not the basolateral surface of polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 1993, 120:695-710
- 284.- Kan FW, Jolicoeur M, Parment J.: Freeze-fracture analysis of the effects of intermediates of the phosphatidylinositol cycle on fusion of rough endoplasmic reticulum membranes. *Biochim Biophys Acta.* 1992, 1107:331-341
- 285.- Mayorga LS, Colombo MI, Lennartz M, Brown EJ, Stahl PD.: Inhibition of endosome fusion by phospholipase A2 (PLA2) inhibitors points to a role for PLA2 in endocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993, 90:10255-10259
- 286.- Erdos EG, Wagner B, Harbury CB, Painter RG, Skidgel RA, Fa XG.: Down-regulation and inactivation of neutral endopeptidase 24.11 (enkephalinase) in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 1989, 264:14519-14523