

TS
613

R. 6630



UNIVERSIDAD DE CADIZ
FACULTAD DE CIENCIAS



UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Depositado en Departamento Bioquímica
de la FACULTAD BIOLOGIA

de esta Universidad desde el día 16 JUNIO 1987
hasta el día 10 JULIO 1987

Sevilla 10 de Junio de 1987

EL DIRECTOR DEL DEPTO

[Signature]

"VARIACIONES DE LAS ACTIVIDADES FOSFODIESTERASA Y ATPasa TRAS LA
ADMINISTRACION DE SOMATOSTATINA EN CEREBRO E HIPOFISIS DE RATA".

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
SECRETARIA GENERAL

Queda registrada esta Tesis Doctoral
al folio 189 número 15 del libro
correspondiente.

- 8 JUN. 1987

Sevilla,

El Jefe del Negociado de Tesis,

[Signature: M. Yolanda Díaz Roldán]

MA DEL CARMEN RENDON UNCETA

Tesis presentada para optar al grado de doctora en Biología.

Sevilla, Junio de 1987.



UNIVERSIDAD DE ALCALÁ DE HENARES

DPTO. DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

D. ELADIO MONTOYA MELGAR, Profesor Titular de Bioquímica y Biología Molecular de la Universidad de Alcalá de Henares,

CERTIFICA: que el trabajo titulado "Variaciones de las actividades fosfodiesterasa y ATPasa tras la administración de somatostatina en cerebro e hipófisis de rata", realizado por la licenciada en Ciencias Biológicas D^a M^a del Carmen Rendón Unceta, para optar al grado de Doctora en Ciencias Biológicas, ha sido llevado a cabo bajo mi dirección en el Departamento de Biología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz, actuando como Ponente D. Manuel Losada, Catedrático Numerario de Bioquímica de la Facultad de Biológicas de la Universidad de Sevilla, y a mi juicio, cumple todos los requisitos necesarios para su presentación.

Alcalá de Henares, 14 de mayo de 1987

EL DIRECTOR



Fdo. Eladio Montoya Melgar

EL PONENTE

Fdo. Manuel Losada Villasante

A mis padres y hermanos.

A Jorge.

Deseo expresar mi agradecimiento a mi director Prof. Eladio Montoya Melgar, por su colaboración y orientación en la realización de este trabajo, así como por su apoyo y estímulo constante.

Al Prof. M. Losada Villasante, por haberse hecho cargo amablemente de su presentación.

A todos mis compañeros del Departamento de Biología y Bioquímica de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz, por la ayuda que de ellos he recibido y por el interés que siempre manifestaron en el desarrollo de este trabajo, a Emi por su amistad y permanente colaboración, y a todos aquellos que, en mayor o menor medida, han contribuido de alguna manera para llevarlo a buen fin.

A Ana, por su colaboración en la rotulación mecanográfica de las figuras y tablas, y por su preocupación y ayuda a nivel personal.

A Jorge, especialmente, por su continua comprensión.

Al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de Sevilla, que nos suministró los animales de este estudio.

INDICE

I . INTRODUCCION	1
1. SOMATOSTATINA.....	2
1.1. DESCUBRIMIENTO, RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.....	2
1.2. LOCALIZACION.....	4
1.3. HETEROGENEIDAD MOLECULAR.....	7
1.4. CATABOLISMO.....	10
1.5. EFECTOS ENDOCRINOS.....	12
1.6. EFECTOS NO ENDOCRINOS.....	16
1.7. MECANISMO DE ACCION.....	17
1.7.1. Receptores.....	17
1.7.2. Acciones post-receptor.....	21
2. CALCIO Y NUCLEOTIDOS CICLICOS; ATPasas Y PDE.....	29
2.1. CALCIO; ACTIVIDAD ATPásica.....	29
2.1.1. Regulación de la concentración intracelular de calcio.....	29
2.1.2. Regulación de la ATPasa cálcica por calmodulina.....	32
a. Calmodulina.....	32
b. Transporte de calcio-calmodulina.....	33
2.2. NUCLEOTIDOS CICLICOS; FOSFODIESTERASAS.....	34
II . MATERIALES Y METODOS	37
1. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL.....	38
2. ESTUDIOS EN ANIMALES.....	39
2.1. ANIMALES.....	39
2.1.1. Condiciones ambientales.....	39
2.1.2. Preparación de somatostatina.....	39
2.1.3. Sacrificio de animales.....	40
2.2. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS, FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR.....	40
2.2.1. Hipófisis.....	41
2.2.2. Cerebro.....	41
2.3. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE CEREBRO E HIPOFISIS.....	44
2.3.1. Actividad láctico deshidrogenasa.....	44
a. Fundamento.....	44

	b, Reactivos.....	44
	c, Metodología.....	45
2,3,2,	Actividad glutamato deshidrogenasa.....	45
	a, Fundamento.....	45
	b, Reactivos.....	46
	c, Metodología.....	46
2,3,3,	Actividad 5'-mononucleotidasa.....	46
	a, Fundamento.....	46
	b, Reactivos.....	47
	c, Metodología.....	47
2,4,	VALORACION DE PROTEINAS.....	48
	a, Fundamento.....	48
	b, Reactivos.....	48
	c, Metodología.....	49
2,5,	VALORACION DE LA ACTIVIDAD ATPasa.....	50
2,5,1,	Cerebro.....	50
	a, Fundamento.....	50
	b, Reactivos.....	50
	c, Metodología.....	52
2,5,2,	Adenohipófisis.....	56
	a, Fundamento.....	56
	b, Reactivos.....	56
	c, Metodología.....	56
2,6,	VALORACION DE ACTIVIDADES HIDROLIZANTES	
	DE ATP Y ADP.....	58
2,6,1,	Actividad con trifosfo-	
	y difosfonucleótidos.....	58
2,6,2,	Inhibición por trifluoperazina.....	58
2,6,3,	Inhibición de la actividad	
	adenilato quinasa.....	59
2,6,4,	Actividad apirasa.....	59
2,7,	VALORACION DE LA ACTIVIDAD CALMODULINA.....	60
	a, Fundamento.....	60
	b, Reactivos.....	60
	c, Metodología.....	61

2,8, VALORACION DE LA ACTIVIDAD	
FOSFODIESTERASA DE GMPC _i	63
a, Fundamento.....	63
b, Reactivos.....	64
c, Metodología.....	65
2,9, VALORACION DEL EFECTO DE SOMATOSTATINA	
"IN VITRO" SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa Y	
PDE DE CEREBRO.....	58
3, ESTUDIOS EN CELULAS.....	69
3,1, CULTIVO DE CELULAS GH ₄ C ₁	69
3,1,1, Cultivo celular,	
Condiciones de cultivo y medio.....	69
3,2, TRATAMIENTO CON SOMATOSTATINA.....	70
3,3, VALORACION DE PROTEINAS.....	71
a, Fundamento.....	71
b, Reactivos.....	71
c, Metodología.....	72
3,4, VALORACION DE LA ACTIVIDAD	
FOSFODIESTERASA DE GMPC _i	73
3,4,1, Homogenados.....	73
3,4,2, Adición en ensayo.....	73
4, CALCULOS ESTADISTICOS.....	74
III. RESULTADOS.....	75
1, FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE LOS HOMOGENADOS DE	
ADENOHIPOFISIS Y CEREBRO DE RATA; ESTUDIO DEL GRADO	
DE PUREZA DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES OBTENIDAS.....	77
2, ESTUDIO DE ACTIVIDAD ATPásica EN CEREBRO Y	
ADENOHIPOFISIS DE RATA.....	81
2,1, RESULTADOS EN CEREBRO.....	81
2,1,1, Actividad ATPasa total;	
efecto de la somatostatina.....	81
2,1,2, Actividad ATPasa (Ca ²⁺ - Mg ²⁺);	
efecto de la somatostatina.....	82
2,1,3, Actividad ATPasa (Na ⁺ - K ⁺);	
efecto de la somatostatina.....	83

2.1.4. Efecto de la incubación "in vitro" con somatostatina sobre la actividad ATPasa total.....	83
2.2. RESULTADOS EN ADENOHIPOFISIS.....	93
2.2.1. Actividad ATPasa total; efecto de la somatostatina.....	93
2.2.2. Actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}); efecto de la somatostatina.....	94
3. ESTUDIO DE OTRAS ACTIVIDADES HIDROLITICAS DE ATP.....	101
3.1. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA CON DI- Y TRIFOSFONUCLEOTIDOS.....	101
3.2. INHIBICION POR TRIFLUOPERAZINA.....	102
3.3. ACTIVIDAD ADENILATO QUINASA.....	103
3.4. ACTIVIDAD ATP Y ADP HIDROLITICA, INHIBICION POR AZIDA.....	104
4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CALMODULINA.....	116
4.1. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD CALMODULINA.....	116
5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc.....	118
5.1. EFECTO DE LA INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA.....	118
5.2. VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA EN CEREBRO Y ADENOHIPOFISIS DE RATA.....	118
5.2.1. Efecto de la somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa.....	119
a. Cerebro.....	119
b. Adenohipófisis.....	120
5.2.2. Efecto de la inyección de salino o somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa.....	120
5.2.3. Efecto de la incubación "in vitro" con somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa.....	121
5.3. VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA EN CELULAS GH_4C_1	121

5,3,1, Efecto de la actividad fosfodiesterasa en células GH_4C_1	121
5,3,2, Efecto de la incubación "in vitro" con somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa.....	122
IV. DISCUSION.....	132
1, EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP.....	135
1,1, CEREBRO.....	135
1,2, ADENHIPOFISIS.....	142
2, EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMP_c	145
2,1, ENSAYO.....	146
2,2, CEREBRO.....	146
2,3, ADENHIPOFISIS.....	149
2,4, CELULAS GH_4C_1	150
V. CONCLUSIONES.....	154
VI. BIBLIOGRAFIA.....	156

ABREVIATURAS

AC.....	adenilato ciclasa
ACTH.....	hormona adrenocorticotrópica
ADP.....	5' difosfato de adenosina
AMP.....	5' monofosfato de adenosina
AMPc.....	3'5'-fosfato cíclico de adenosina = ácido adenosin-3',5'-fosfórico cíclico
Ap5'A.....	diadenosilpentafosfato
ATP.....	5' trifosfato de adenosina
AtT-20.....	células tumorales hipofisarias de ratón
BSA.....	albúmina sérica bovina
(Bu) ₂ AMPc.....	dibutiril AMPc
[Ca ²⁺] _i	concentración de calcio intracelular
CaM.....	calmodulina
Ci.....	curio (= 37 Bequerelios)
cpm.....	cuentas por minuto
CRF.....	factor liberador de ACTH = factor liberador de corticotropina
DG.....	diglicéridos
D.O.....	densidad óptica
EDTA.....	tetra-acetato de etilendiamina
EGTA.....	ácido etilenglicol-bis-(aminoetil éter)N'
FI.....	fracción I
FII.....	fracción II
FIII.....	fracción III
fig.....	figura
Flipasa C.....	fosfolipasa C
FSH.....	hormona estimulante de folículo
GH.....	hormona del crecimiento
GH, células.....	líneas celulares derivadas de tumores hipofisarios de rata
GH ₄ C ₁ , células.....	sublínea celular de células GH de tumor de hipófisis de rata
GLUDH.....	glutamato deshidrogenasa
GMPc.....	3'5'-fosfato cíclico de guanosina = ácido guanosin-3',5'-fosfórico cíclico
GRF.....	factor liberador de la hormona del crecimiento

GTP.....	guanosin trifosfato
IBMX.....	isobutil metil xantina
IP ₃	inositol trifosfato
K _m	constante de Michaelis
LDH.....	lactato deshidrogenasa
LH.....	hormona luteinizante o luteotrópica
N.....	proteína transdutora (proteína que enlaza guanil- nucleótidos)
N _i	proteína transdutora inhibidora
PDE.....	fosfodiesterasa
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PIP ₂	fosfatidil inositol bifosfato
PK.....	proteína quinasa
PRL.....	prolactina
RE.....	retículo endoplasmático
RIA.....	radioinmunoanálisis
rpm.....	revoluciones por minuto
SDS.....	dodecilsulfato sódico
SNC.....	sistema nervioso central
SRIF.....	somatostatina
TFP.....	trifluoperazina
TP.....	toxina de <u>Bordetella pertussis</u>
TRH.....	hormona liberadora de TSH
TRIS.....	trihidroxietilaminometano
TSH.....	hormona estimuladora del tiroides (hormona tirotrópica)
VIP.....	péptido vasointestinal

I . INTRODUCCION

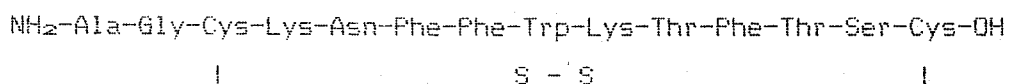
1. SOMATOSTATINA

La somatostatina (SRIF) es una hormona producida en el hipotálamo por neuronas denominadas peptidérgicas. Estas neuronas, sintetizan las distintas hormonas hipotalámicas existentes, segregándolas después en el plexo portal primario de la eminencia media. Dichas hormonas alcanzan las células adenohipofisarias a través de los senos del sistema circulatorio hipofisario, controlando de este modo la función celular (McCann, 1980).

La síntesis y secreción de las hormonas hipotalámicas está regulada por gran cantidad de hormonas y neurotransmisores, habiéndose establecido la participación de determinadas zonas del cerebro (septum, amígdala, hipocampo, tálamo y mesencéfalo) en el control de la secreción de dichas hormonas (Folkers, 1971; Halasz y cols., 1975).

1.1. DESCUBRIMIENTO, RELACION ESTRUCTURA-ACTIVIDAD

En 1968, Krulich y cols., demostraron por primera vez la existencia en extractos hipotalámicos de un factor, con actividad inhibitoria de la secreción de GH. Cinco años después, se caracterizó la molécula responsable de esta actividad inhibitoria, Brazeau y cols. (1973) y Burgus y cols. (1973), a partir de extractos hipotalámicos de oveja, aislaron y secuenciaron un tetradecapéptido con propiedades inhibitorias de la secreción de GH "in vitro". Este péptido que se denominó Somatostatina (SRIF) presenta la siguiente estructura:



Mediante métodos clásicos de condensación y técnicas de síntesis en fase-sólida (Coy y cols., 1973; Rivier y cols., 1973; Sarantakis y McKinley, 1973) se sintetizó la forma lineal reducida y la cíclica oxidada del tetradecapéptido. El péptido natural y el sintético

se comportaron de forma idéntica cuando se compararon en varios sistemas entre los que se incluían la cromatografía en capa fina y la electroforesis, y ambos fueron igualmente activos en la inhibición de la secreción de GH, tanto en la rata (Brazeau y cols., 1974ayb) como en el hombre (Siler y cols., 1973).

A partir del péptido sintético se obtuvieron y ensayaron diversos análogos, que se han utilizado para estudiar la relación estructura-actividad de la somatostatina. La observación planteada por Brazeau y cols. (1973) y por Rivier y cols. (1973) de que tanto la forma lineal reducida de la somatostatina como la cíclica oxidada, exhibían la misma potencia biológica, planteó la cuestión sobre la importancia del puente disulfuro entre las dos cisteínas, en las posiciones 3 y 14. Para resolver esta cuestión, se estudió la actividad de dos análogos, (CH₃S-Cys^{3,14})-somatostatina y (Ala^{3,14})-somatostatina, en los cuales no existía ciclación de la molécula (Rivier y cols., 1975). Se encontró que ambos análogos presentaban actividad biológica, aunque significativamente menor que el péptido natural. Estos resultados condujeron a concluir que el puente disulfuro era importante para la actividad del compuesto. Para explicar la alta actividad de la somatostatina reducida, Rivier y cols. (1975) postularon que ésta era rápidamente oxidada a la forma cíclica bajo las condiciones de los bioensayos. También se estudiaron análogos en los que los restos N-terminales Ala¹-Gly² eran eliminados (Brazeau y cols., 1974b; Rivier y cols., 1975), y se comprobó que poseían una alta actividad biológica, tanto "in vivo" como "in vitro", indicando que este dipéptido N-terminal no era probablemente importante en la acción de la hormona. Todo esto llevó a la conclusión de que el dodecapéptido C-terminal, con el puente disulfuro entre las dos cisteínas, contenía probablemente la información necesaria para el reconocimiento por los receptores hipofisarios y para su actividad biológica.

Posteriormente, diversos autores utilizando análogos para estudiar la unión de dicha hormona a receptores de membranas hipofisarias (Vale y cols., 1978; Veber y cols., 1979; Enjalbert y cols., 1982a), llegaron a la conclusión de que las fenilalaninas 6 y 11

son importantes para estabilizar la conformación peptídica nativa a través de la formación de un enlace hidrofóbico, mientras que la secuencia 7-9 explicaría la actividad biológica total de la somatostatina con la condición de que esté mantenida su conformación bioactiva (Veber y cols., 1979).

Esto ha sido confirmado recientemente con estudios llevados a cabo empleando la técnica del RIA, utilizando anticuerpos contra regiones específicas de la hormona (Patel, 1975; Ruggere y Patel, 1985a).

1.2 LOCALIZACION

El estudio de la localización de péptidos hipotalámicos se ha realizado por tres tipos de técnicas principalmente: inmunohistoquímica, bioensayo y radioinmunoanálisis (RIA).

En 1974a, Vale y cols. mediante técnicas de bioensayo, ofrecían las primeras indicaciones sobre la localización cerebral de SRIF, tanto en zonas hipotalámicas como extrahipotalámicas. En 1975a, Arimura y cols. obtuvieron anticuerpos contra la SRIF, tras la inyección de este péptido conjugado con α -globulina humana en conejos. Otros investigadores han utilizado el péptido conjugado con albúmina humana (Vale y cols., 1976); o con tiroglobulina bovina (Patel y Reichlin, 1978). Estos anticuerpos se han utilizado para la localización de dicha hormona por técnicas inmunohistoquímicas y por RIA. En la técnica del RIA, se utiliza un análogo (Tyr¹ - ¹²⁵I)-SRIF, para la radiiodación, ya que la hormona nativa no puede ser satisfactoriamente iodada.

Mediante estas técnicas, se ha demostrado la presencia de SRIF, en hipotálamo, cerebro extrahipotalámico, estómago y páncreas de rata.

Con respecto a la localización de la SRIF en el cerebro, se ha visto que es en el hipotálamo donde se encuentra la concentración más

alta. Aunque no está confinada sólo a esta zona, hay también altas concentraciones de ella en otras estructuras extrahipotalámicas, como son el septum, área preóptica, diencéfalo, tronco encefálico, tálamo y corteza. En la amígdala y médula espinal también se han encontrado cantidades apreciables. (Brownstein y cols., 1975; Palkovits y cols., 1976; Patel y Reichlin, 1978).

En el hipotálamo, la mayor concentración de SRIF se detecta en la eminencia media, siguiendo en orden decreciente, los núcleos arcuado, ventromedial y premamilar ventral. (Brownstein y cols., 1975; Palkovits y cols., 1976).

A pesar de esta mayor concentración caudal de SRIF, las neuronas productoras de este péptido, están localizadas más rostralmente, en el hipotálamo preóptico y periventricular anterior. (Pelletier y cols., 1974; Alpert y cols., 1976; Finley y cols., 1981). Estas células somatostatinérgicas periventriculares, se localizan cerca del tercer ventrículo en tres o cuatro capas paralelas a la pared ventricular, en un área ovoide que se extiende desde el núcleo preóptico hasta el margen rostral del núcleo ventromedial. Son células de tamaño pequeño o mediano (12-16 μm de diámetro), y por microscopía electrónica se ha llegado a precisar que la SRIF se encuentra, en gránulos secretores, en el pericario de dichas células (Pelletier y cols., 1977). Los axones de estas células se proyectan caudalmente a través del hipotálamo y penetran a nivel del núcleo ventromedial en la eminencia media, concentrándose los terminales nerviosos en la capa externa de dicha eminencia media. (Alpert y cols., 1976; Brownstein y cols., 1977; Epelbaum y cols., 1977; Pelletier y cols., 1977; Finley y cols., 1981).

Estas aferencias al hipotálamo, desde la zona anterior, han quedado claramente demostradas por experimentos que involucran lesión o estimulación de dicha zona. Así, las lesiones del área preóptica media o la interrupción quirúrgica de las conexiones entre ésta y la eminencia media, provocan disminución de la concentración de SRIF en la eminencia media (Epelbaum y cols., 1977). Chihara y cols., (1979a)

aportaron un dato más concluyente al demostrar que la estimulación del área preóptica anterior, incrementaba la secreción de SRIF a sangre portal hipofisiaria. También se ha visto que lesiones selectivas del área periventricular, provocan una disminución de los niveles de SRIF inmunoreactiva en la eminencia media (Nordstedt y cols., 1983). Todos estos hallazgos apoyan el hecho de que esta área sea precisamente donde se ejerce el mayor control inhibitorio sobre la secreción de GH desde la adenohipófisis.

Además de los axones que llegan a la eminencia media, los de estas neuronas periventriculares se proyectan hacia otros núcleos hipotalámicos, como son el preóptico, supraquiasmático, ventromedial, arcuado y ventral premamilar, y hacia estructuras extrahipotalámicas como son el septum, la habénula, el hipocampo y, fundamentalmente, hacia el sistema límbico, el cual a su vez posee una amplia red de células somatostatinérgicas (Krisch, 1979).

Otros núcleos hipotalámicos, que se sabe contienen neuronas somatostatinérgicas, no parecen que contribuyan significativamente a la concentración de SRIF en la eminencia media. Tal es el caso del núcleo ventromedial, el cual posee neuronas somatostatinérgicas cuyos axones se proyectan hacia la eminencia media y amígdala (Renaud, 1976). Hechos como el que lesiones en este núcleo no afecten significativamente al contenido de SRIF en la eminencia media (Epelbaum y cols., 1977; Chihara y cols., 1979a) y que las lesiones antes mencionadas en la zona periventricular no afecten al contenido de SRIF en la amígdala y otras estructuras cerebrales extrahipotalámicas, como es la corteza (Epelbaum y cols., 1977), han llevado a la hipótesis de que la SRIF cerebral tenga otras funciones, además de las directamente relacionadas con la regulación hipofisiaria de la secreción de GH. Se ha sugerido, basándose en su acción depresora sobre la actividad de las neuronas del sistema nervioso central (Renaud y cols., 1975), y en otros efectos farmacológicos y sobre el comportamiento (Plotnikoff y cols., 1974), que la SRIF puede servir como neurotransmisor o modulador de la actividad neuronal en el cerebro.

Con respecto a la localización de SRIF en otros órganos, se ha demostrado su presencia en páncreas, estómago, intestino, retina y tiroides. En el páncreas, se demostró mediante RIA en 1975 (Arimura y cols., 1975b; Patel y cols., 1975), y se ha visto que se localiza en células endocrinas (D) concentradas cerca de la periferia de los islotes. Su concentración en este órgano es elevada, del mismo orden a la encontrada en el hipotálamo (Arimura y cols., 1975b). El tracto gastrointestinal es uno de los lugares de mayor síntesis de somatostatina. Las células endocrinas somatostatinérgicas (D), se encuentran distribuidas a todo lo largo de dicho tracto, principalmente en la mucosa (Larsson, 1981). En el estómago existen extensiones citoplasmáticas largas y delgadas de células somatostatinérgicas, que terminan en células parietales y en otros tipos de células epiteliales (Alumets y cols., 1979). La mayor frecuencia de estas células somatostatinérgicas se observa en el recto, siguiéndole en orden decreciente el intestino delgado (Tabata y cols., 1980). La hormona también ha sido localizada en un pequeño número de células en el tiroides, principalmente en la parte caudal de la glándula (Hökfelt y cols., 1975). Recientemente, se ha localizado en la retina de distintos vertebrados (Rorstad y cols., 1979; Eriksen y Larsson, 1981), en subpoblaciones específicas de células amacrinas.

1.3. HETEROGENEIDAD MOLECULAR

El tetradecapéptido somatostatina (SRIF-14), no es la única especie química con actividad inhibidora de la secreción de GH. Con el paso de los años se han aislado nuevas formas de somatostatina con un número mayor de aminoácidos. En 1980 se aislaron la somatostatina-28 (SRIF-28) y la pro-somatostatina (pro-SRIF). La primera, aislada del intestino de cerdo (Pradayrol y cols., 1980) y del hipotálamo ovino (Esch y cols., 1980) y porcino (Schally y cols., 1980), y la segunda, un péptido de 92 aminoácidos, aislada del hipotálamo porcino (Schally y cols., 1980). Ambas formas representan extensiones N-terminales del péptido original, SRIF-14, el cual corresponde al C-terminal de la

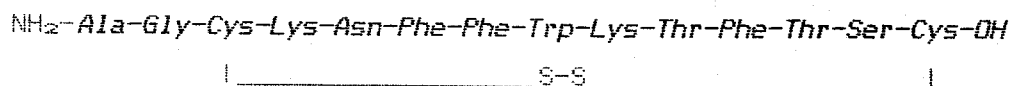
SRIF-28, y éste a su vez al C-terminal de la pro-somatostatina (fig. 1). Posteriormente, en 1982b, Benoit y cols., identificaron y analizaron una nueva forma, obtenida a partir de hipotálamo de rata, el dodecapéptido somatostatina-28-(1-12), el cual corresponde al N-terminal de la SRIF-28.

Hoy día, en mamíferos, todas las evidencias apuntan a que estos cuatro péptidos provengan de un único péptido pre-pro-somatostatina, producto de un único gen de somatostatina (Patel y cols., 1985).

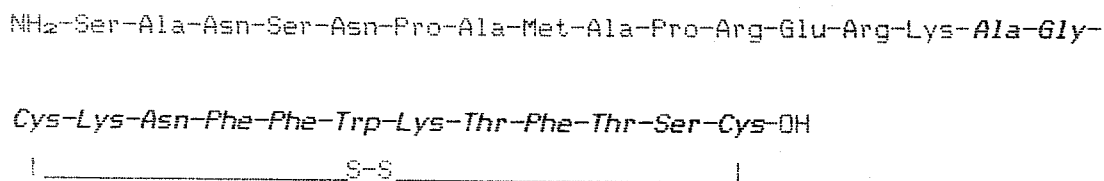
La SRIF-14 y la SRIF-28 son las dos principales formas con actividad biológica. Sus acciones son cualitativamente similares y cuantitativamente diferentes. Brazeau y cols. (1981) en estudios "in vitro", demostraron que la SRIF-28 tiene mayor potencia que la SRIF-14 para inhibir la secreción de GH en cultivos de células hipofisarias. Estos mismos autores también mostraron que, "in vivo", el péptido de 28 aminoácidos era más efectivo que el de 14 en bloquear la estimulación de GH inducida por morfina. Estas diferencias de actividad entre ambos péptidos, se explicarían por la mayor afinidad de la SRIF-28 por los receptores, que es, aproximadamente, tres veces mayor que la de la SRIF-14 (Srikant y Patel, 1981b), y por la vida media mayor de la SRIF-28 (Patel y Wheatley, 1983). La pro-somatostatina presenta una baja actividad biológica. Estas tres formas moleculares de la somatostatina se han encontrado en extractos de hipotálamo y en eminencia media, en una razón molar aproximada de 15:4:1 (Patel y cols., 1981; Charpenet y Patel, 1985), y están presentes tanto en los cuerpos celulares como en las terminaciones nerviosas (Kewley y cols., 1981); se liberan desde la eminencia media (Kewley y cols., 1981; Charpenet y Patel, 1985) y también han sido identificadas en la circulación portal hipofisaria (Chihara y cols., 1979b; Charpenet y Patel, 1985).

Poco se sabe de las funciones biológicas de la SRIF-28-(1-12). Se ha encontrado en páncreas e hipotálamo (Benoit y cols., 1982a; Benoit y cols., 1982b; Patel, 1983). Es liberada desde la eminencia

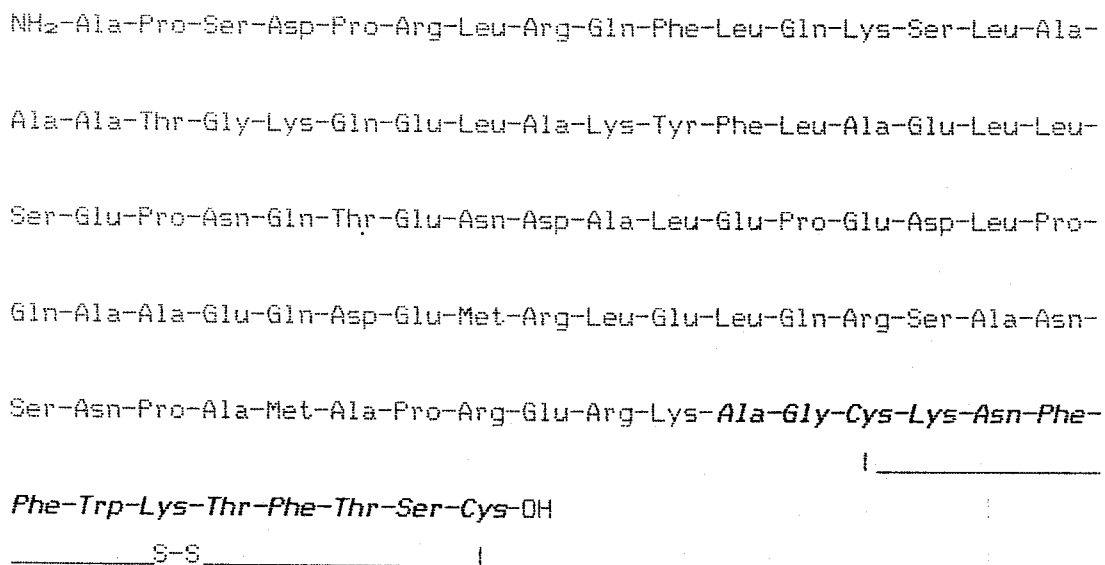
FIGURA 1



Estructura primaria de la SOMATOSTATINA-14



Estructura primaria de la SOMATOSTATINA-28



Estructura primaria de la pro-SOMATOSTATINA

media (Charpenet y Patel, 1985) y su localización principal radica en las terminaciones nerviosas más que en los cuerpos celulares, sugiriéndose para ella, una función como neurotransmisor (Bakhit y cols., 1983).

1.4 CATABOLISMO

La degradación de la somatostatina tiene lugar en el plasma, hígado, riñón, páncreas y pulmón.

Las dos principales formas moleculares de la somatostatina, SRIF-14 y SRIF-28, son rápidamente degradadas en el plasma "in vivo". Este proceso es, sin embargo, cuatro veces más rápido para la SRIF-14 que para la SRIF-28. Este rápido metabolismo plasmático, comparado a la relativa estabilidad de ambas formas moleculares en plasma "in vitro", sugiere, sin embargo, que la degradación plasmática no es un proceso fisiológico cuantitativamente importante (Patel y Wheatley, 1983).

La extracción pancreática de hormona administrada exógenamente ha sido demostrada en el perro (Tarbosky y Ensinnck, 1983). El hallazgo experimental de gradientes arteriovenosos negativos de somatostatina a través del hígado, sugirió un importante papel para este órgano en el metabolismo de dicha hormona (Berelowitz y cols., 1978), lo cual ha sido ampliamente demostrado (Ruggere y Patel, 1985a). Este gradiente arteriovenoso de la hormona, fué también encontrado en el riñón (Shapiro y cols., 1978) aunque en bastante menor proporción, y por último, ha quedado demostrado recientemente (Ruggere y Patel, 1985b) que la degradación metabólica de la somatostatina también tiene lugar en el pulmón.

En el metabolismo de la SRIF-14, intervienen dos actividades enzimáticas: una rápida, mediante aminopeptidasas que hidrolizan el enlace peptídico N-terminal, produciendo el péptido des-Ala¹-SRIF-14, que es biológicamente activo, y otra más lenta, llevada a cabo por

endopeptidasas que producen hidrólisis de los enlaces peptídicos en la región cíclica central de la molécula (unión Trp^a-Lys^a), produciéndose péptidos sin actividad biológica (Patel y Wheatley, 1983; Ruggere y Patel, 1985a; Ruggere y Patel, 1985b). En el metabolismo de la SRIF-28, además de estos dos procesos, ocurre un tercero debido a enzimas con actividad tripsínica, que rompen la molécula por los residuos básicos Arg¹³ y Lys¹⁴, generando SRIF-14.

Mediante estudios con antisuero dirigidos contra el N-terminal y análogos marcados también en el N-terminal, se ha podido comprobar que el producto de la acción de la aminopeptidasa en el caso de la SRIF-14 es la des-Ala¹-SRIF-14 (SRIF-13) como decíamos anteriormente, y en la SRIF-28 la des-Ser¹-SRIF-28, o fragmentos fuertemente relacionados con éste (des-Ser¹-Ala²-SRIF-28 ó SRIF-25) (Ruggere y Patel, 1985a). Esta aminopeptidasa no parece ser específica, puesto que presenta valores cinéticos similares para ambas SRIFs. Sin embargo, la acción de la endopeptidasa sobre el segmento ciclado de la hormona sí parece ser específica, y es afectada por la extensión del segmento N-terminal. La mayor longitud de este brazo en el caso de la SRIF-28 es un importante determinante de la menor hidrólisis de la parte ciclada de dicha hormona (Ruggere y Patel, 1985a). Esta observación está además apoyada por la escasa hidrólisis que sufre la pro-SRIF, cuya extensión N-terminal es de 78aa (Patel y cols., 1981; Patel y Wheatley, 1983).

La degradación más lenta por endopeptidasa de la SRIF-28, que ya hemos indicado, que la transforma en un péptido no activo biológicamente, junto a la lenta conversión que sufre a SRIF-14 en plasma "in vivo", en contraste con la significativa conversión que sufre durante incubaciones plasmáticas "in vitro" (Patel y Wheatley, 1983), podría ser de considerable importancia en la interpretación de su mayor potencia en comparación a la de la SRIF-14 en sistemas "in vitro", en los que se realizan incubaciones de larga duración con medio que contiene suero.

El hígado, a través del drenaje portal del páncreas e intestino, los cuales son el origen de casi toda la somatostatina inmunoreactiva circulante, parece ser el principal órgano de degradación de la hormona. El riñón y el pulmón, situados más distalmente, podrían actuar como órganos reserva del catabolismo de la hormona (Ruggere y Patel, 1985b).

1.5. EFECTOS ENDOCRINOS

La somatostatina, como ya hemos indicado, se descubrió e identificó originalmente por su capacidad de inhibir la liberación basal de la hormona del crecimiento (GH), en cultivos de células hipofisarias (Brazeau y cols., 1973; Burgus y cols., 1973). Su administración, además de afectar a la secreción basal de GH, afecta a la respuesta secretora de dicha hormona hipofisaria a todos los estímulos conocidos de su secreción en gran número de especies (hombre, perro, gorila, rata, etc.). De este modo, la secreción de GH estimulada por ejercicio, sueño, hipoglucemia inducida por insulina, infusión de arginina, L-DOPA e inyección intrahipotalámica de norepinefrina, es abolida por un tratamiento con somatostatina (Brazeau y cols., 1973; Hall y cols., 1973; Hansen y cols., 1973; Siler y cols., 1973). En la rata, la somatostatina también bloquea la respuesta secretora de GH al pentobarbital, morfina y estimulación eléctrica del núcleo hipotalámico ventromedial (Martin, 1974; Gerich y cols., 1975; Martin y cols., 1975).

La somatostatina, igualmente, reduce los niveles plasmáticos de GH en pacientes con hipersecreción de la hormona debida a hiperplasia o adenomas hipofisarios (Besser y cols., 1974). La relación de disminución de GH durante la infusión de somatostatina es rápida, siendo el tiempo medio de 24-34 min. (Yen, 1974), lo que implica que la hormona hipotalámica produce, casi inmediatamente, la inhibición de la liberación de GH.

En los últimos años, se han venido utilizando poblaciones enriquecidas de células somatotropas -células hipofisarias productoras de GH- obtenidas a partir de hipófisis con un alto grado de pureza (90%) (Sheppard y cols., 1979), para estudiar el efecto y mecanismo de acción de la hormona hipotalámica sobre la secreción de GH en la hipófisis. En ellas se ha visto, que la somatostatina además de reducir los niveles basales de GH, inhibe el aumento de liberación inducido por diferentes secretagogos: $(\text{Bu})_2\text{AMPc}$, IBMX, PGE_2 , alta concentración de K^+ y el ionóforo de calcio A23187 (Sheppard y cols., 1979; Kraicer y Chow, 1982). Del mismo modo se ha comprobado que la secreción de GH estimulada por GRF (factor liberador de GH) es completamente bloqueada por la somatostatina (Sheppard y cols., 1985). Otros sistemas celulares muy empleados para estudiar los efectos y acciones hipofisarias de la somatostatina, son las líneas celulares (GH) derivadas de tumores hipofisarios de rata, que sintetizan y secretan GH y PRL (Tashjian, 1979). En estos sistemas se ha visto también, la inhibición por somatostatina de la secreción basal y estimulada de GH (Dorflinger y Schombrunn, 1983a).

La somatostatina además de sus efectos sobre la secreción de GH, inhibe la secreción de otras hormonas hipofisarias. Cabe destacar entre ellas la TSH cuya secreción basal y estimulada por TRH, tanto "in vivo" como "in vitro", es fuertemente inhibida por la hormona hipotalámica (Vale y cols., 1974b; Siler y cols., 1974; Vale y cols., 1977). Esta misma inhibición se observa al estimular la secreción de TSH en hipófisis incubadas con distintos secretagogos, como teofilina y concentraciones altas de K^+ (Vale y cols., 1974b). La somatostatina es capaz de inhibir la secreción de TSH por una acción directa sobre las tirotropas (células hipofisarias productoras de TSH) e indirectamente por inhibición de la liberación de TRH a nivel hipotalámico (Hirooka y cols., 1978). Las células tirotropas son sin embargo menos sensibles a la inhibición por somatostatina que las somatotropas (Skamene y Patel, 1984).

Otra hormona hipofisaria afectada por la somatostatina es la ACTH. La secreción de esta hormona en células tumorales hipofisarias de

ratón (AtT-20) en respuesta a la estimulación por una serie de secretagogos, entre los que se incluyen el factor liberador de ACTH (CRF), péptido vasointestinal (VIP), KCl, isoproterenol y forskolina, es fuertemente inhibida por la somatostatina (Richardson y Schombrunn, 1981; Heisler y cols., 1982), aunque no afecta a su secreción basal (Heisler y cols., 1982; Heisler y Reisine, 1984). La somatostatina, igualmente, tiene un marcado efecto inhibitor sobre los elevados niveles de ACTH en pacientes con síndrome de Nelson (Tyrrel y cols., 1975), enfermedad de Addison (Fehm y cols., 1976) o después de una adrenalectomía bilateral (Gaspar y cols., 1981). En estados no patológicos, sin embargo, la somatostatina no parece afectar la secreción basal de ACTH (Hall y cols., 1973).

Por otro lado, el efecto de la somatostatina sobre la PRL, otra hormona hipofisaria, es controvertido. Se ha demostrado que "in vivo" ni la secreción basal ni la estimulada es afectada por la somatostatina (Hall y cols., 1973; Siler y cols., 1973; Vale y cols., 1974b). Sin embargo, en sistemas de cultivos celulares, la liberación basal y la estimulada por secretagogos es fuertemente inhibida (Drouin y cols., 1974; Vale y cols., 1974b; Enjalbert y cols., 1982b). Un ejemplo de estos sistemas celulares son las células GH_4C_1 , donde la somatostatina además de inhibir la secreción basal de PRL (Schombrunn y Tashjian, 1978), inhibe la estimulada por VIP y bombesina (Westendorf y Schombrunn, 1982; Dorflinger y Schombrunn, 1983b). Por otro lado, en sistemas "in vivo", la somatostatina deprime los niveles plasmáticos de PRL en pacientes acromegálicos (Yen y cols., 1974), hombres normales tratados con aminoácidos (Bratusch-Marrain y Waldhäusl, 1979) y en ratas tratadas con 17β -estradiol (E_2) (Cooper y Shin, 1981).

Otras hormonas hipofisarias como la LH y FSH, no parecen ser afectadas por la somatostatina.

Además de estos efectos inhibidores sobre las hormonas hipofisarias, la somatostatina presenta otras acciones de carácter extrahipofisario, principalmente a nivel pancreático y gastrointestinal. En el páncreas, la hormona afecta tanto a la

secreción endocrina como a la exocrina. Con respecto a la primera hay que señalar que es un potente inhibidor de la secreción de insulina y glucagón. En el hombre, perro y rata, desciende los niveles basales de ambos péptidos pancreáticos (Alberti y cols., 1973; Koerker y cols., 1974), suprimiendo también su secreción estimulada por diferentes secretagogos. Así, en el hombre, la secreción de insulina inducida por glucosa, arginina, glucagón y tolbutamida es bloqueada por la hormona hipotalámica (Gerich y cols., 1974a; Gerich y cols., 1974b); y en páncreas de rata y perro disminuye la respuesta de glucagón y/o insulina a la glucosa, arginina, teofilina, isoproterenol y epinefrina (Alberti y cols., 1973; Gerich y cols., 1975). Las células α son aparentemente más sensibles a los efectos de la somatostatina que las β . Como demuestran Gerich y cols. (1975), la secreción de glucagón es 20 veces más sensible a la inhibición por somatostatina que la secreción de insulina; además, como el glucagón es capaz de estimular por sí mismo la secreción de insulina, es probable que la somatostatina disminuya la liberación de insulina por inhibición parcial de la liberación de glucagón.

La secreción pancreática exocrina también se ve afectada por la hormona, ya que ésta inhibe parcialmente la secreción basal y estimulada por ácido clorhídrico, de agua, bicarbonato y proteínas (Boden y cols., 1975) y estimula la liberación de hidrolasas (Robberecht y cols., 1975).

El tracto gastrointestinal, como ya hemos indicado, es el otro gran locus de acción extrahipofisaria de la somatostatina, donde actúa como un importante regulador fisiológico. Una de sus acciones a este nivel, es la de inhibir determinadas secreciones endocrinas. Entre ellas se encuentra la hormona gastrina, a la que inhibe fuertemente en su liberación, tanto en sujetos normales como en pacientes con acromegalia y síndrome de Zollinger-Ellison, donde un tumor pancreático eleva su secreción (Bloom y cols., 1974). También inhibe la secreción de ácido gástrico estimulada por pentagastrina (Brown y cols., 1978). Esta inhibición ocurre tanto por una inhibición sobre la secreción de gastrina (LeRoith y cols., 1985) como por una acción directa que no

involucra a la gastrina (Gómez-Pan y cols., 1975). Y, por último, en relación con las secreciones exocrinas, se ha visto que también inhibe la secreción de pepsina (Gómez-Pan y cols., 1975) y secretina estimulada por ácido clorhídrico (Boden y cols., 1975).

Otras acciones de la hormona a este nivel son: la inhibición del crecimiento y diferenciación de la mucosa intestinal (Stange y cols., 1984) y la regulación de la absorción de determinados nutrientes a través de dicha mucosa. En relación con este último punto se ha visto que incrementa la absorción de agua, cloruro y sodio a través del colon de rata y conejo (Dharmasathaphorn y cols., 1980; Guandalini y cols., 1980).

Por último, cabría señalar una acción extrahipofisaria de la somatostatina a nivel de la cápsula adrenal, donde Aguilera y cols. (1981) han encontrado un marcado efecto inhibitor de dicha hormona en la producción de aldosterona estimulada por angiotensina II, en las células de la zona glomerulosa.

1.6. EFECTOS NO ENDOCRINOS

No se conoce totalmente la función de la somatostatina en el SNC. Sin embargo, existen bastantes datos que apoyan el hecho de que la hormona, como otros péptidos, se comporte como un neurotransmisor o neuromodulador. El hallazgo de que la hormona está ampliamente distribuida en áreas extrahipotalámicas del SNC (Krisch, 1978; Patel y Reichlin, 1978) hizo que pronto se estudiaran sus efectos sobre la actividad eléctrica neuronal, comprobándose que éstos eran inhibidores (Renaud y cols., 1975). Posteriormente, también se han descrito efectos excitadores (Renaud, 1979; Dichter y Delfs, 1981). Junto a esto se ha observado que la administración de dosis altas de somatostatina inducen cambios en la locomoción, llegando a la catatonía, y potenciación con el pentobarbital (Segal y Mendal, 1974). Este último efecto ha hecho que en algunos casos se utilice como analgésico. Estos efectos están

mediados por la presencia de receptores específicos de somatostatina en el SNC (Srikant y Patel, 1981a). Algunos de los efectos que se han visto pueden estar mediados directamente por la hormona, o pueden deberse a la modulación que ésta ejerce sobre la liberación y metabolismo de neurotransmisores (Reichlin, 1982).

1.7. MECANISMO DE ACCION

1.7.1. Receptores

Hoy día está bien establecido que las acciones biológicas del tetradecapéptido somatostatina (SRIF-14) están mediadas por receptores. Los cuales fueron identificados y caracterizados, inicialmente, en células tumorales hipofisarias GH₄C₁ (Schombrunn y Tashjian, 1978), utilizando el análogo [¹²⁵I-Tyr¹]-SRIF-14 como ligando radioactivo. Posteriormente, se encontraron en cerebro (Srikant y Patel, 1981a), hipófisis (Enjalbert y cols., 1982a; Srikant y Patel, 1984), páncreas exocrino (Sakamoto y cols., 1984) y corteza adrenal de rata (Aguilera y cols., 1982; Srikant y Patel, 1985a). Estos receptores, asociados a membranas, representan una única clase de lugares de unión de alta afinidad, son específicos, no estando influida su unión al ligando por otros péptidos más que por somatostatina o sus análogos. La unión es saturable, y es dependiente del tiempo, temperatura y pH.

En el cerebro, la mayor concentración de receptores se encuentra en la corteza cerebral, seguida del tálamo, hipotálamo, amígdala e hipocampo, mientras que en el cerebelo y en la médula espinal se encuentran en poca cantidad (Srikant y Patel, 1981a). Esta distribución regional de los receptores del cerebro no es paralela con respecto al contenido de somatostatina endógena, ya que la máxima cantidad de receptores se encuentra en la corteza, mientras que la mayor concentración de somatostatina endógena está en el hipotálamo.

Utilizando una amplia variedad de análogos sintéticos de la somatostatina-14, los cuales presentan mayor potencia y/o selectividad de acciones en los diferentes tejidos, se han investigado los requerimientos estructurales del ligando para la unión óptima al receptor, habiéndose demostrado que la estructura cíclica de la molécula es esencial y que los residuos de aminoácidos 7-11 (Phe-Trp-Lys-Thr-Phe) constituyen el lugar de reconocimiento del ligando para unirse a los receptores de somatostatina. Esta misma región estructural constituye el lugar activo para su acción biológica (Vale y cols., 1978).

Se han encontrado diferencias en las afinidades y potencias biológicas de diversos análogos por los receptores de somatostatina en los distintos tejidos antes mencionados. Se ha visto una notable disociación en la potencia del análogo [oligo D-Trp⁶]-SRIF-14, el cual presenta una afinidad por los receptores 2,5 veces menor que la somatostatina-14 en la corteza adrenal, mientras que en cerebro y en adenohipófisis es más potente que la somatostatina-14. La afinidad del análogo [D-Trp⁶]-SRIF-14 sobre los receptores en la corteza adrenal es 2-5 veces menor que en la hipófisis y en cerebro. El análogo [L-Br₅-Trp⁶]-SRIF-14 presenta 3 veces más afinidad por los receptores en la corteza adrenal que en cerebro e hipófisis (Srikant y Patel, 1985b). Estos datos indican que existen diferencias básicas entre los receptores de somatostatina en los diferentes tejidos. Es probable que alteraciones en el metabolismo de los análogos puedan explicar, al menos en parte, sus potencias variables "in vivo". Esto podría aplicarse al análogo [D-Trp⁶]-SRIF-14, del cual se sabe que es más resistente a la degradación enzimática que la somatostatina-14. Para la mayor potencia "in vivo" del análogo [oligo D-Trp⁶]-SRIF-14 se ha sugerido una penetración y distribución incrementada en el cerebro, favorecida por ser más lipofílico y de menor tamaño (Brown y cols., 1979). Sin embargo, los aspectos metabólicos, exclusivamente, no pueden explicar la gran diferencia en la afinidad del [L-Br₅-Trp⁶]-SRIF-14 a la corteza adrenal, comparada al cerebro e hipófisis, o a las notables diferencias en la potencia "in vivo" en cerebro del [oligo D-Trp⁶]-SRIF-14, comparada a su unión a receptores "in vitro" en cerebro e

hipófisis, sugiriéndose que tales diferencias podrían deberse, al menos en parte, a diferentes requerimientos específicos de ligando de los receptores de somatostatina en esos tejidos (Srikant y Patel, 1985b).

La somatostatina-28 (SRIF-28) se une a los receptores de la somatostatina-14 en todos estos tejidos con afinidades significativamente diferentes. Su afinidad es mayor que la que presenta la somatostatina-14, en adenohipófisis, pero no en cerebro ni en páncreas exocrino (Srikant y Patel, 1981b; Sakamoto y cols., 1984), mientras que en la corteza adrenal ambas formas presentan afinidades comparables (Srikant y Patel, 1985a). En la cuantificación de receptores en estos tejidos, utilizando análogos de la somatostatina-28 ($[^{125}\text{I}, \text{Tyr}^{25}]\text{-SRIF-28}$), se encontró que presentaban parámetros de unión comparables a los que se encontraron cuando se cuantificó con $[^{125}\text{I-Tyr}^{11}]\text{-SRIF-14}$. Esto, junto a que ambas formas moleculares inhiben la unión a los receptores de ambos radioligandos con la misma potencia relativa, llevó a concluir el que ambas formas moleculares interactuaban con el mismo tipo de receptor (Srikant y Patel, 1985b). Por otro lado, hechos como los anteriormente mencionados de diferentes afinidades entre ambas formas y, estudios radioautográficos "in vivo", que indicaron que el análogo $[^{125}\text{I-Tyr}^{25}]\text{-SRIF-28}$ se unía preferentemente a receptores de la eminencia media de la rata, en los cuales interactuaba pobremente el análogo $[^{125}\text{I-Tyr}^{11}]\text{-SRIF-14}$, llevaron a Srikant y Patel (1985b) a proponer la existencia, al menos en áreas pequeñas del cerebro de rata, de receptores distintos para la SRIF-14 y la SRIF-28.

Los receptores de somatostatina están regulados por cambios en la concentración del ligando. Así, Reisine y Axelrod (1983) demostraron que un tratamiento prolongado con SRIF-14 en células tumorales hipofisarias de ratón, productoras de ACTH (AtT-20), conduce a un aumento en la respuesta biológica de las células a la estimulación por forskolina, sugiriéndose la existencia de regulación negativa para los receptores de somatostatina-14. Más recientemente, Heisler y Srikant (1985) observaron que la preexposición de células AtT-20 a somatostatina-14 y/o somatostatina-28, producía una regulación negativa

de los receptores de somatostatina. Esta regulación negativa en tejidos normales podría también ocurrir en determinadas situaciones como el stress y diabetes, en las cuales se ha encontrado una elevación significativa de los niveles de somatostatina en plasma y tejido (Berlowitz y cols., 1978). Por el contrario, se ha encontrado regulación positiva de los receptores, que da como resultado un aumento en la capacidad de unión, cuando disminuye la concentración de somatostatina, como ocurre tras la administración de cisteamina (Srikant y Patel, 1984). Schonbrunn y Tashjian demostraron una regulación heteróloga de los receptores, por TRH (Schonbrunn y Tashjian, 1980) y glucocorticoides (Schonbrunn, 1982) en células $6H_4C_1$, aunque ésta no se ha observado en hipófisis normales de rata (Srikant y Patel, 1982).

Además de estos receptores encontrados en membranas de cerebro, hipófisis, páncreas exocrinos y corteza adrenal, se han encontrado otros de localización intracelular en las fracciones citosólicas del páncreas de rata (Reyl-Desmars y Lewin, 1982a), mucosa gástrica de rata (Reyl-Desmars y Lewin, 1982b) y de conejo (Arilla y cols., 1985), mucosa intestinal de rata (Arilla y cols., 1984) y de conejo (López-Ruiz y cols., 1985), y en la retina de cerdo (Colas y cols., 1986). Estos receptores presentan las mismas características, en cuanto a saturación, tiempo, pH y temperatura, que los anteriormente mencionados, así como un alto grado de especificidad. El análisis de la cinética de unión a estos receptores, ha demostrado que existen dos tipos distintos de centros de unión, unos de alta afinidad y otros de baja afinidad. Los receptores de la mucosa gástrica se han encontrado tanto en la porción fúndica como en la antral, y en la primera se ha llegado a precisar que se localizan principalmente en la fracción citosólica de las células no-parietales (Arilla y cols., 1985). La significación biológica de estos receptores no se conoce, pero el hecho de que en dicha mucosa fúndica existan células somatostatinérgicas y terminaciones nerviosas en cerrada vecindad con las células epiteliales (Alumets y cols., 1979), sugiere un posible papel fisiológico de la somatostatina como hormona local. En la mucosa intestinal se han encontrado en fracciones citosólicas de duodeno, yeyuno, ileon, ciego,

colon y recto. La afinidad de estos receptores es semejante a todo lo largo de la mucosa, y su capacidad de unión varía según el segmento (recto > duodeno = yeyuno > ileon, ciego y colon), existiendo una buena correlación con la distribución de células somatostatinérgicas a través de dicho segmento intestinal (Tabata y cols., 1980). El papel biológico de estos receptores es desconocido, pero se asocia al amplio espectro de efectos de la somatostatina sobre las funciones intestinales. Recientemente, se han encontrado también receptores en la fracción citosólica de la retina de cerdo (Colas y cols., 1986).

Obviamente, la localización intracelular de estos receptores implica que el péptido deba atravesar la membrana plasmática. En este sentido, la posibilidad de que la somatostatina pueda atravesar la membrana plasmática mediante una internalización dependiente de Na^+ y ATP ha sido comunicada (Reyl-Desmars y Lewin, 1982a). Sin embargo, se requieren más datos para demostrar si estos receptores citosólicos representan el lugar fisiológico de la acción de la somatostatina a estos niveles, o si bien, corresponden a receptores internalizados en procesos de tráfico intracelular. Con respecto a esto último, hay que indicar que la internalización del complejo receptor-somatostatina ha sido identificada por Draznin y cols. (1985) en cultivos primarios de células adenohipofisarias.

1.7.2 Acciones post-receptor

Los resultados de los estudios sobre el mecanismo de acción de la somatostatina son complejos y a veces contradictorios. Está bien establecido, que el primer paso para la expresión de sus acciones biológicas es la unión, a nivel de membrana, con sus receptores. Pero no se conocen exactamente los hechos bioquímicos que ocurren tras esta unión, y que mediarían las acciones inhibitoras de la somatostatina. Se ha propuesto la participación e interacción de diferentes mecanismos de acción que incluyen la acción de dos mensajeros intracelulares conocidos de regular los procesos secretores: el AMPc y el calcio.

Estos mecanismos incluyen inhibición de la acumulación de AMPc, e inhibición de la concentración de calcio intracelular.

Con respecto al efecto inhibitorio de la somatostatina sobre la acumulación de AMPc, los resultados son diversos y complejos. Hay una serie de hechos que apoyan que la inhibición producida por somatostatina sobre la liberación hormonal, resulta de su efecto depresor sobre los niveles de AMPc. Por un lado está el hecho de que análogos del AMPc e inhibidores de la fosfodiesterasa de nucleótido cíclicos (enzima que degrada al nucleótido) producen una liberación estimulada de GH, TSH y PRL en cultivos primarios de células hipofisarias (Reichlin, 1983) y que en estas mismas circunstancias, la somatostatina inhibe su secreción (Brazeau y cols., 1973; Drouin y cols., 1974; Vale y cols., 1974b; Reichlin, 1983). Además, existen dos claros efectos inhibitorios de la hormona sobre los niveles estimulados del nucleótido cíclico, y sobre la actividad estimulada de la adenilato ciclasa (enzima encargada de generar AMPc). Así, se ha visto que en cultivos primarios de células hipofisarias, la acumulación de AMPc y liberación de GH, estimuladas por GRF, es inhibida tras la adición de somatostatina (Cronin y cols., 1984), y que la actividad adenilato ciclasa, también estimulada por GRF, es parcialmente inhibida por la hormona (Peake y Smoake, 1985). En células AtT-20, la somatostatina inhibe la secreción de ACTH y la acumulación de AMPc estimuladas por CRF, isoproterenol, VIP, forskolina y TC (tóxina colérica), agentes por otro lado, estimuladores de la actividad adenilato ciclasa, en dichas células (Heisler y cols., 1982). Pero cuando se emplean agentes como la melitina y el ionóforo de calcio A23187, que estimulan la secreción de ACTH pero no la acumulación de AMPc, la somatostatina no inhibe dicha secreción de ACTH. En estas mismas células (Reisine, 1985) sí inhibe la liberación de ACTH y activación de proteínas quinasas (tipo I y II) dependientes de AMPc, estimuladas por 8-Br-AMPc; en adenomas hipofisarios humanos secretores de GH, inhibe la actividad adenilato ciclasa y acumulación de AMPc (Spada y cols., 1984); y en membranas hipofisarias inhibe la actividad adenilato ciclasa estimulada por prostaglandinas (Borgeat y cols., 1974). Por último, se ha visto en cultivos celulares de cerebro, que la acumulación de AMPc estimulada

por isoproterenol, secretina y VIP, es inhibida por la hormona hipotalámica, la cual también inhibe la actividad adenilato ciclasa de dichas membranas (Calker y cols., 1980).

Por el contrario, hay otra serie de hechos que indican que, al menos en parte, la acción de la somatostatina ocurre independientemente de los niveles existentes de AMPc, ya que no se ha observado efecto, ni sobre los niveles basales de AMPc ni sobre la actividad basal de adenilato ciclasa, en circunstancias en que la secreción hormonal sí es inhibida por la somatostatina. Así, en las células AtT-20, donde hay inhibición de la acumulación estimulada de AMPc, no se ha encontrado efecto de la hormona sobre los niveles basales de dicho nucleótido (Heisler y cols., 1982). En cultivos celulares hipofisarios, la somatostatina no afecta para nada a los niveles basales de AMPc y sí inhibe totalmente la liberación basal de GH (Bilezikjian y Vale, 1983). En poblaciones celulares enriquecidas en células somatotropas, la hormona tampoco altera los niveles basales de AMPc, pero sí inhibe la secreción basal de GH, y más aún, la secreción de GH estimulada por PGE₂ e IBMX (estimulador de la adenilato ciclasa e inhibidor de la fosfodiesterasa, respectivamente) es fuertemente inhibida por la somatostatina, existiendo sólo una ligera disminución de la acumulación de AMPc (Sheppard y cols., 1979). Por otro lado, la actividad basal adenilato ciclasa, en membranas hipofisarias no se inhibe por la somatostatina (Labrie y cols., 1978; Rouleau y Bardem, 1981) aunque conflictivamente, sí inhibe la basal en células GH₁ (Heindel y cols., 1978).

La posibilidad de que haya acciones de la somatostatina dependientes y otras independientes del AMPc, ha quedado claramente demostrada en las células GH₄C₁. En estas células, la liberación estimulada de hormonas (GH y PRL) está mediada por cambios en los niveles de AMPc, mientras que la liberación basal ocurre independientemente de la concentración de dicho nucleótido (Dorflinger y Schombrunn, 1983a). Ambas acciones, están mediadas por el mismo receptor (Schombrunn y cols., 1983), el cual se encuentra acoplado a la adenilato ciclasa mediante una proteína que une nucleótidos de guanina

(N_1 , G_1), y que media la actividad inhibitora de dicha enzima inducida por somatostatina. Las alteraciones provocadas en los niveles de AMPc, en la inhibición estimulada de la secreción hormonal (GH y PRL), se debe a una modulación inhibitora sobre dicha actividad adenilato ciclasa (Dorflinger y Schombrunn, 1983a). Y más interesante aún, las acciones de la somatostatina independientes de la concentración de AMPc (secreción hormonal basal), que provocan disminución de la concentración de calcio intracelular, también precisan de un funcional N_1 para la expresión de sus efectos (Koch y cols., 1985).

La proteína N_1 , anteriormente mencionada, forma parte del sistema enzimático de la adenilato ciclasa (Bokoch y cols., 1984), y es una proteína reguladora que acopla la señal inhibitora (SRIF) que llega a los receptores inhibitoros de la célula con la unidad catalítica de la enzima, provocando una inhibición de la actividad de dicha enzima. Esta proteína está regulada por nucleótidos guanina y es un heterotrímero compuesto de tres subunidades: α , β y γ (Hildebrandt y cols., 1984). La subunidad α une GTP y tiene actividad GTPasa, y es la que se acopla con el receptor ocupado por la hormona (Katada y cols., 1984). Esta subunidad es sustrato de la exotoxina producida por Bordetella pertussis (TP), la cual cataliza su ADPribosilación, previniendo su interacción con el receptor, e impidiendo de este modo su efecto inhibitor sobre la unidad catalítica (Hsia y cols., 1984; Sullivan y cols., 1986). El bloqueo, por un tratamiento previo con TP, de la acción inhibitora de la somatostatina, indica pues la participación de dicha proteína N_1 en la acción de la hormona. Este hecho ha permitido comprobar el requerimiento de un funcional N_1 para la somatostatina, tanto en las acciones independientes como en las dependientes de AMPc, en las células GH_4C_1 (Koch y Schombrunn, 1984), y en células hipofisarias (Cronin y cols., 1983).

Existen, por otro lado, bastantes evidencias que apuntan al movimiento del ión calcio como segundo mensajero de las acciones de la somatostatina. Así la hormona, en condiciones basales, inhibe la entrada de calcio ($^{45}Ca^{2+}$) en células hipofisarias (Maruyama e Ishikawa, 1977), y bloquea la despolarización de sus membranas (Duffy y

Barker, 1984). En células GH_4C_1 y en GH_3 , reduce la concentración de calcio intracelular (Koch y cols., 1985; Schlegel y cols., 1985), y en poblaciones celulares enriquecidas en células somatotropas inhibe el flujo de calcio provocado por GRF (Login y Judd, 1986). Por otro lado, el tratamiento de las células hipofisarias con alta concentración de K^+ , que produce despolarización de las membranas e incrementa la entrada de calcio a las células, provoca una gran liberación de GH, y bloquea el efecto inhibitorio de la somatostatina sobre la secreción de GH estimulada por prostaglandinas E_1 y DBAMPc (estimulador de la adenilato ciclasa y análogo de AMPc, respectivamente) (Hayasaki-Kimura y Takahashi, 1979), mientras que sólo provoca una disminución, pero no inhibición, de la secreción estimulada de GH por alta concentración de K^+ (Hayasaki-Kimura y Takahashi, 1979; Kraicer y Chow, 1982).

El efecto pues, de la somatostatina sobre el flujo de calcio podría venir provocado por una acción directa sobre el transporte de calcio y/o sistemas intracelulares de calcio, o bien, por una acción indirecta sobre el flujo de potasio. En relación con esto último, se ha demostrado, en células pancreáticas, que la acción de la somatostatina viene dada por una hiperpolarización de las membranas, por incremento de la permeabilidad al potasio y reducción consecuente en la entrada de calcio a través de los canales sensibles a voltaje, produciéndose una disminución de la concentración de calcio intracelular y posterior inhibición de la liberación de insulina (Pace y Tarvin, 1981).

Es de gran interés la proposición que Schlegel y cols. (1985) hacen sobre una relación existente entre las acciones dependientes de la concentración de calcio intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) y las dependientes de AMPc, en la acción de la somatostatina. Ellos han observado en células GH_3 que la somatostatina y el carbacol (compuesto que actúa a través de receptores inhibitorios, como la somatostatina), además de inhibir la actividad adenilato ciclasa, producen disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y por el contrario, el VIP, estimulador de la adenilato ciclasa, aumenta esta $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Además, el tratamiento con TP bloquea su acción inhibitoria sobre la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, y no se observa ningún efecto, ya sea de estimuladores o inhibidores de la adenilato ciclasa, sobre dicha

[Ca²⁺]_i, en ausencia de calcio extracelular. Esto, junto a las sustanciales evidencias obtenidas recientemente por Reunter (1983) de que las fosforilaciones dependientes de AMPc afectan a los canales de calcio, les lleva a postular que la somatostatina reduce la entrada de calcio en las células GH₃, a través de una modulación por AMPc de los canales de calcio que involucran a una proteína dependiente de nucleótido guanina y sustrato de TP.

Estos hechos, junto a la citada participación de la proteína N_i de la adenilato ciclasa en la reducción inducida por somatostatina de la concentración de calcio intracelular en células GH₄C₁, y los recientes descubrimientos que indican la participación de esta proteína N_i o de una muy semejante (N) también sustrato de TP, en la regulación de los canales de calcio (Gomperts, 1983; Holz y cols., 1986; Fitzpatrick y cols., 1986), plantea la posibilidad de que la proteína N_i acoplada a los receptores de somatostatina, regule tanto la actividad adenilato ciclasa como el pool intracelular de calcio.

Recientemente, Yatani y cols. (1987) han demostrado que los canales muscarínicos de potasio de aurícula de mamíferos, están regulados por una proteína (G_w), del tipo de las proteínas N comentadas. Estos mismo autores han comprobado que la interacción del receptor de somatostatina con una proteína de este tipo, abre los canales de K⁺ en células hipofisarias (GH₃), con la consiguiente hiperpolarización y cierre de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Birnbaumer, 1987).

Por último, habría que señalar la presencia en gran cantidad, en el cerebro de una proteína N_o de función desconocida, sustrato de TP; así como otra proteína de la misma familia, llamada transducina 1, sustrato de TP que es la mediadora de la estimulación por rodopsina de la fosfodiesterasa de GMPc en los bastones de la retina (Miller y cols., 1986).

El papel del metabolismo de fosfoinosítidos en el mecanismo de acción hormonal, y de los inositoles-fosfatos como segundos mensajeros

en esta acción, ha cobrado una gran importancia durante los últimos años.

La acción básica de las hormonas que actúan mediante este sistema consiste en estimular una fosfolipasa C (fosfodiesterasa) que hidroliza el fosfatidil inositol bisfosfato (PIP₂) a diglicéridos (DG) e inositol trisfosfato (IP₃). El diglicérido estimula la proteína quinasa C, acción que se ve reforzada por la salida de calcio desde el retículo endoplasmático (RE), promovida por el IP₃ (Berridge, 1986; Majerus y cols., 1986; Michell, 1986).

Recientemente se ha demostrado que los receptores que estimulan la fosfolipasa C lo hacen a través de una proteína N (G) (Katada, 1986; Kikuchi y cols., 1986; Smith y cols., 1986).

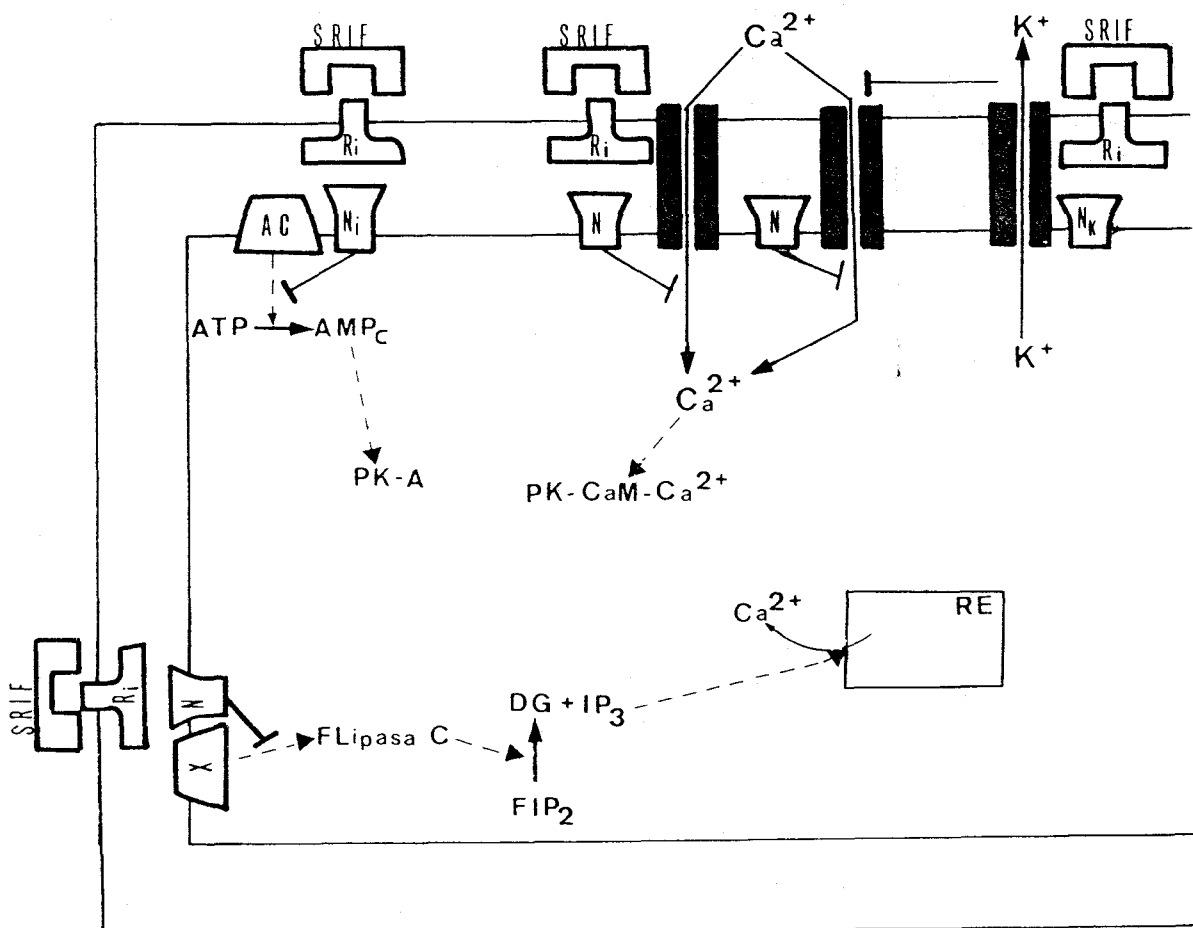
Puesto que algunas hormonas hipotalámicas hipofisiotrópicas, como el TRH, actúan a través de este mecanismo (Aub y cols., 1986; Gershengorn, 1986; Martín y cols., 1986), y sus efectos son inhibidos por somatostatina, es muy posible que esta hormona interaccione también a través de una proteína N con la fosfolipasa C (Yajima y cols., 1986) inhibiéndola.

En resumen, la somatostatina, interaccionando con un receptor de membrana acoplado a una proteína N, inhibe los sistemas de transducción de adenilato ciclasa, metabolismo de fosfoinosítidos y apertura de canales de calcio (fig. 2).

Otros sistemas de transducción mencionados anteriormente, como la interacción con un receptor citosólico, no parecen existir en células hipofisarias y derivadas.

FIGURA 2

RESUMEN ACCIONES DE LA SOMATOSTATINA MEDIADAS POR SU RECEPTOR



SRIF	Somatostatina
R _i	Receptor inhibidor
N _i	Proteína transductora inhibidora
N	Proteína transductora
N _k	Proteína transductora K
ATP	5' trifosfato de adenosina
AMP _c	3'5' fosfato cíclico de adenosina
PK-A	Proteína quinasa A
PK-CaM-Ca ²⁺	Proteína quinasa dep. de Calcio y Calmodulina
FLipasa C	Fosfolipasa C
FIP ₂	Fosfoinositol bisfosfato
DG	Diglicérido
IP ₃	Inositol trifosfato
RE	Retículo endoplasmático

2. CALCIO Y NUCLEOTIDOS CICLICOS: ATPasas y PDE

El reconocimiento del Ca^{2+} , junto al AMPc y GMPc como mediadores de muchos procesos fisiológicos (Berridge, 1975; Rasmussen y cols., 1975) refleja la compleja naturaleza de la regulación biológica. Quizás por la multitud y diversidad de los procesos celulares, es necesario más de un único regulador. La coordinación e interacción entre Ca^{2+} y otros segundos mensajeros, mantiene un sutil balance de los estados fisiológicos en respuesta a los estímulos externos (Lin y Cheung, 1983).

Con respecto a la hormona hipotalámica somatostatina, ya hemos indicado anteriormente que, al menos en parte, sus acciones biológicas vienen reguladas por el Ca^{2+} y el AMPc, los cuales actuarían como importantes reguladores de los procesos intracelulares desencadenados por dicha hormona, y las alteraciones de sus respectivas concentraciones intracelulares mediarían su actividad.

2.1. CALCIO; ACTIVIDAD ATPásica

Fué por primera vez en 1928, cuando Houslay y Molinelli, sugirieron la importancia del calcio en la secreción hormonal. Sin embargo, hasta 1968 (W. W. Douglas) no se introdujo el concepto de acoplamiento estímulo-secreción referido a los procesos secretores en general, por analogía con el concepto excitación-contracción del músculo, donde ya se había revelado la importancia del calcio.

2.1.1. Regulación de la concentración intracelular de calcio

El calcio tiende a entrar en la célula por difusión pasiva, a favor de un gradiente de concentración y de un gradiente eléctrico. Los canales de calcio de las células secretoras se han clasificado en dos

tipos: 1) dependientes de voltaje, tal sería el caso del canal de Ca^{2+} que se abre por aumento del K^+ , y 2) dependientes u operados por agonistas, que están modulados por la interacción.

La concentración de calcio intracelular es, por otro lado, el resultado del equilibrio en la distribución de este ion entre diferentes compartimentos delimitados por la membrana plasmática, la membrana mitocondrial y el retículo endoplasmático. De hecho, se han descrito mecanismos de transporte de calcio a estos tres niveles. Un cuarto sistema para regular la concentración intracelular de calcio, de manera rápida y reversible, se basa en su unión a proteínas.

A nivel de membrana plasmática, se conocen dos mecanismos para la expulsión del calcio de la célula: un intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (Blaunstein y Nelson, 1981), que utiliza la energía procedente del gradiente de sodio creado por la bomba Na^+-K^+ , y una bomba de calcio (Schatzmann, 1981). Ambos sistemas operan en paralelo con distinta eficiencia relativa y poseen características diferentes entre las que cabe destacar: 1) el intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ que tiene baja afinidad pero alta capacidad para transportar calcio, mientras que la bomba de calcio tiene mayor afinidad pero menor capacidad, 2) el intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ que no está acoplado directamente a la hidrólisis del ATP y la bomba de calcio sí, 3) la estequiometría para el intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ que es de 3 ó 4 moléculas por mol de Ca^{2+} , y para la bomba de calcio es de 1 ó 2 moles de Ca^{2+} transportado por mol de ATP hidrolizado, y 4) la bomba de calcio opera sólo en el sentido de sacar calcio de la célula, que el intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ puede operar en ambos sentidos.

En aquellas membranas plasmáticas en las que existen ambos sistemas (bomba de Ca^{2+} e intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$) parece ser que la salida de calcio dependiente de ATP es el sistema dominante para la restauración fisiológica de la concentración de calcio, mientras que el cambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ es efectivo a mayores concentraciones de calcio, tal como ocurre durante la estimulación (DiPolo y Beaugé, 1979).

Estos dos sistemas existen tanto en cerebro (Sobue y cols., 1979; Gill y cols., 1981) como en hipófisis (Barros y Kaczorowski, 1984; Kaczorowski y cols., 1984).

La expresión bioquímica de esta bomba de calcio, que transporta calcio hacia el exterior de la membrana plasmática, es una ATPasa-(Ca²⁺+Mg²⁺). Además, en las membranas plasmáticas existen ATPasas que son activas con sólo Mg²⁺. De éstas hay al menos dos tipos. La que se encuentra presente en eritrocitos humanos, presenta una relativa baja actividad y no responde al calcio sólo. En membranas plasmáticas de otros tipos celulares, existen ATPasa-Mg²⁺ ó -Ca²⁺, con una baja afinidad por el catión divalente requerido para la actividad de la enzima. Este último tipo de ATPasa, generalmente, tiene una relativa alta actividad específica y puede interferir con el análisis de la ATPasa bomba de Ca²⁺, si se utilizan altas concentraciones de Mg²⁺ en el ensayo (Verma y Penniston, 1981). La función de estas ATPasas -Mg²⁺ ó -Ca²⁺ es desconocida. En el eritrocito, la ATPasa-Mg²⁺ se asocia con la contractilidad.

Los otros dos sistemas encargados de la regulación del calcio intracelular, son a nivel de mitocondria y de retículo endoplasmático. A nivel de mitocondria, es un hecho bien conocido que éstas acumulan calcio en contra de un gradiente de concentración y que este proceso está acoplado a la oxidación de sustratos o a la hidrólisis del ATP (Carafoli y Crompton, 1978). En un estado normal de la célula, el proceso que ocurre en la mitocondria es el de fosforilación del ADP a ATP en lugar del de acumular calcio (la K_m para el transporte de calcio en las mitocondrias es 10 ó 100 veces mayor que la concentración de calcio presente en el citoplasma, y la capacidad que tienen de acumular calcio "in vivo" -cuando la concentración de este ion es de 0,1 µM- es muy pequeña o nula) ya que ambos procesos son alternativos a la concentración de calcio presente en el citoplasma. Sin embargo, cuando la concentración citoplasmática de calcio aumenta, sí son efectivas acumulando calcio. En estas condiciones no hay duda de que las mitocondrias constituyen un sistema importante para transportar el calcio en las células (Becker y cols., 1980).

El calcio penetra en la mitocondria gracias al potencial (negativo en el interior) generado por la bomba de protones. Además, en la mitocondria, existe también un sistema de intercambio $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$. El calcio, a su vez, activa tres deshidrogenasas intramitocondriales (Piruvato -DH, Isocitrato -DH y 2-Oxoglutarato -DH), directa o indirectamente, por lo que la entrada del catión está directamente acoplada al metabolismo oxidativo de la célula (McCormack y Denton, 1986).

El transporte de calcio, a nivel de retículo endoplasmático, también está acoplado directamente a la hidrólisis del ATP. La información es escasa para este sistema de transporte de calcio en los distintos tejidos estudiados, a excepción del retículo sarcoplásmico del músculo estriado (Becker y cols., 1980), ya que, en general, la actividad del transporte en muchas preparaciones microsomales es muy baja y a veces es difícil identificar con certeza el tipo de membrana que transporta calcio.

2.1.2. Regulación de la ATPasa cálcica por calmodulina

a. Calmodulina

La calmodulina es una proteína que une calcio, descubierta independientemente por Kakiuchi y Yamazaki (1970), y Cheung (1970ayb), como una proteína termoestable que activaba a una fosfodiesterasa de cerebro. Representa el principal receptor intracelular de calcio y constituye entre el 0,1% al 1% de las proteínas totales de la célula de animales y plantas superiores e inferiores (Means y Dedman, 1980). Es una proteína filogenéticamente muy conservada de manera que, en todos los organismos de donde se ha aislado, la calmodulina presenta similares propiedades físicas, químicas y biológicas. Tiene un peso molecular de 17000, contiene cuatro sitios de unión al calcio y de los 148 aa que posee, no más de siete son diferentes en las distintas especies (Vanaman, T.C., 1980).

Esta proteína regula intracelularmente muchos sistemas enzimáticos dependientes de calcio, así por ejemplo, regula la biosíntesis de neurotransmisores (quinasas que activan la tirosina hidroxilasa y triptófano monooxigenasa), el metabolismo del glucógeno (fosforilasa quinasa), la contracción muscular (quinasa de la cadena ligera de miosina), el metabolismo de los nucleótidos cíclicos (adenilato ciclasa y fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos), los niveles intracelulares de calcio (ATPasa cálcica), etc.

La interacción del Ca^{2+} con la calmodulina da como resultado la formación de un complejo activo Ca^{2+} -calmodulina el cual puede actuar al menos por tres mecanismos diferentes; 1) a través de la interacción directa con la enzima a regular, como es el caso de la PDE de nucleótidos cíclicos y de la ATPasa cálcica (Cox y cols., 1981; Scharff y cols., 1982), 2) a través de la fosforilación por quinasas dependientes de Ca^{2+} -calmodulina, como es el caso de la quinasa de la cadena ligera de miosina (Dabrowska y cols., 1978), y 3) como una subunidad integral de la enzima, como es el caso de la fosforilasa quinasa (Cohen y cols., 1978).

b. Transporte de calcio - calmodulina

El primer sistema de transporte de calcio identificado como una actividad sensible a la calmodulina fué la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) en membrana plasmática de eritrocitos (Jarret y Penniston, 1977). Tanto la actividad ATPasa como el transporte de calcio son activados por calcio en presencia de calmodulina. Esta proteína incrementa la V_{max} de la ATPasa y también incrementa su afinidad aparente por el Ca^{2+} (Mullen y Karlsh, 1981). Posteriormente, se ha comprobado que la calmodulina activa también la ATPasa cálcica de otras células. Así, por ejemplo, se ha visto que estimula la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) de membranas plasmáticas de adipocitos en rata (Pershad Singh y McDonald, 1981).

La calmodulina influye además de en la salida a través de la membrana plasmática, en la traslocación de calcio en el interior de la

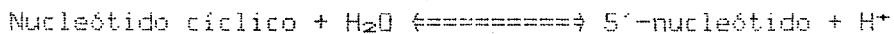
célula. Así, se ha observado que la captación de calcio por vesículas preparadas a partir de membranas de retículo sarcoplásmico cardíaco y la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) presente en dichas membranas, son activadas por calmodulina (Kranias y cols., 1980).

2.2. NUCLEOTIDOS CICLICOS; FOSFODIESTERASAS

La concentración intracelular de los nucleótidos cíclicos AMPc y GMPc resulta del balance entre sus síntesis por los sistemas adenilato y guanilato ciclasa, respectivamente, y su catabolismo por el sistema de las fosfodiesterasas.

Este sistema de fosfodiesterasas está constituido por múltiples formas solubles y particuladas, las cuales difieren en tamaños, especificidad de sustrato y en su habilidad de ser moduladas por efectores tales como el AMPc, GMPc, calmodulina/ Ca^{2+} o ciertos inhibidores. La actividad de estas enzimas está regulada en algunos casos por hormonas (insulina, TSH, acetilcolina, dependiendo de la célula efectora), y es clara la participación de proteínas tipo N (G) en la regulación de la fosfodiesterasa de GMPc de los bastones de la retina, como veremos más adelante.

PDE



La enzima, descubierta por Sutherland y Rall en 1958, está ampliamente distribuida. Tanto el citosol como las partículas membranosas contienen fosfodiesterasa y su distribución varía con el tipo de célula y especie animal (Cheung 1970b). La fosfodiesterasa es la única enzima que cataboliza AMPc y GMPc, regulando de este modo (junto a la adenilato y guanilato ciclasa) los niveles en tejido de estos nucleótidos (Robinson y cols., 1971)

Las múltiples formas de fosfodiesterasa, en preparaciones parcialmente purificadas o crudas, son muy sensibles a la proteólisis

enzimática. Una determinada forma de la enzima puede sufrir pronunciados cambios en sus propiedades físicas o cinéticas después de un limitado tratamiento con tripsina (Sakai y cols., 1977). Sin embargo, tales modificaciones de ninguna manera prueban la existencia de una subunidad catalítica básica. Por el contrario, las fosfodiesterasas, está ahora demostrado, no son enzimas interconvertibles (Erneux y cols., 1985).

Las diversas formas celulares existentes de la enzima han sido clasificadas en tres categorías generales (Thompson y Appleman, 1971ayb; Nagasaka y cols., 1983; Mullaney y Clegg, 1984):

- 1) fosfodiesterasa sensible o activada por calmodulina
- 2) fosfodiesterasa activada (o sensible) por GMPc
- 3) fosfodiesterasa de AMPc, de alta afinidad

Las dos primeras formas degradan tanto AMPc como GMPc, pero con una menor K_m para el GMPc. La tercera forma, no es estimulada ni por calmodulina ni por GMPc y específicamente hidroliza AMPc.

En el cerebro (mamíferos), la actividad fosfodiesterasa predominante es la debida a la especie estimulada por calmodulina. La presencia de la enzima viene indicada por el incremento de actividad enzimática cuando se ensaya en presencia de Ca^{2+} y calmodulina, comparado con la actividad basal obtenida en presencia de EGTA. La actividad dependiente de calmodulina es la diferencia entre la actividad total y la basal. En ausencia de calmodulina, la enzima tiene una alta K_m para el AMPc (aprox. 200 μM) y una baja K_m para el GMPc (aprox. 10 μM). En ausencia de calcio, la calmodulina no se une a la enzima y no la activa; la estimulación en presencia de calcio y calmodulina parece resultar de un incremento en la V_{max} (Klee y cols., 1979). Actualmente se le denomina también fosfodiesterasa de GMPc sensible a calmodulina, ya que su sustrato a concentraciones fisiológicas es dicho nucleótido, aunque durante mucho tiempo se le denominó fosfodiesterasa de AMPc de "alta K_m ", basándose en que su V_{max} se obtiene con el AMPc. Esta forma puede llegar a ser, sin

embargo, dominante en la hidrólisis del AMPc cuando la concentración de este último nucleótido es marcadamente elevada como resultado de una estimulación del tejido (Lin y Cheung, 1983).

La enzima es de localización citosólica, requiere Mg^{2+} para su actividad y la activación por calmodulina (en presencia de calcio) es inmediata y reversible (Cheung, 1971; Lin y cols., 1975).

La denominada fosfodiesterasa sensible o activada por GMPc, presenta una K_m comparable para el AMPc y GMPc, y bajas concentraciones de GMPc (micromolar) estimulan la hidrólisis del AMPc (Hidaka y cols., 1977). Esta forma de la enzima es predominante en la médula adrenal (Couchie y cols., 1983) aunque también ha sido purificada de otros tejidos, incluyendo hígado y corazón de rata (Mullaney y Clegg, 1984).

La fosfodiesterasa de "baja K_m " para el AMPc, con una alta afinidad por dicho nucleótido, como ya hemos indicado anteriormente, no es sensible ni al calcio ni a la calmodulina. Esta enzima se asocia a membranas (Thompson y Appleman, 1971a) y está ampliamente distribuido en los tejidos de mamíferos.

Además de los tres tipos de fosfodiesterasas generales mencionados existe una fosfodiesterasa de GMPc activada por luz en los bastones de la retina de los vertebrados (Takemoto y cols., 1982; Miller y cols., 1986). Esta forma no se ha encontrado en otras células, y ha sido aislada en distintas especies (Miller y cols., 1986). Esta enzima está modulado por nucleótidos guanina: existe una proteína llamada transducina 1 (que pertenece a la familia de proteínas N que unen nucleótidos guanina (GTP) ya mencionadas al hablar de la adenilato ciclasa en el apartado "mecanismo de acción de la somatostatina") que media la estimulación por rodopsina (pigmento visual) de dicha fosfodiesterasa de GMPc. La rodopsina se estimula por la luz, y una vez activada cataliza el cambio de GTP por el GDP previamente unido a la transducina 1. Esta proteína (transducina 1), la cual posee actividad GTPasa, es entonces capaz de activar a la fosfodiesterasa de GMPc (Miller y cols., 1986).

II. MATERIALES Y METODOS

I. PLANTEAMIENTO EXPERIMENTAL

En el presente trabajo hemos pretendido abordar el estudio del efecto de la somatostatina sobre actividades enzimáticas (PDE y ATPasas) que están involucradas en el mecanismo de acción de otras hormonas, en tejidos diana de esta hormona (Sistema Nervioso Central e hipófisis).

Para ello hemos realizado el siguiente planteamiento:

a. Estudios en rata: hemos valorado distintas actividades ATPasicas, caracterizando su acción, sensibilidad a inhibidores, etc., en tres fracciones subcelulares del cerebro y de la adenohipófisis. Además, en la fracción soluble de ambos órganos, se ha estudiado la PDE (GMPc K_m baja) sensible a calcio y calmodulina, y su modulación por estos agentes.

b. Para comprobar si alguno de los efectos vistos (activación de PDE por somatostatina) son directos o pudieran estar mediados por la liberación o inhibición de otras hormonas o factores, hemos estudiado la acción de esta hormona sobre la PDE de células GH₄C₁.

2. ESTUDIOS EN ANIMALES

2.1. ANIMALES

2.1.1. Condiciones ambientales

Se han utilizado ratas hembras de la raza Sprague-Dawley. Los animales se obtuvieron del criadero perteneciente al Departamento de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Sevilla, y en el momento de recibir las contaban con unos 25 días de edad y pesaban entre 50 y 75 grs.

Estos animales fueron estabulados en nuestro Departamento, colocándolos en jaulas colectivas, en grupos no superiores a 8 individuos por jaula.

Los animales fueron alimentados "ad libitum" con pienso tipo rata-ratón (Panlab).

Durante la duración del estudio, los animales permanecieron en condiciones ambientales constantes, reguladas automáticamente. La temperatura se mantuvo entre 21 y 24°C, y la ventilación quedó asegurada por ciclos de renovación de aire de 15 min. cada hora. Los animales estuvieron sometidos a un ritmo diario de 12 horas de luz artificial y 12 horas de oscuridad; empezando a las 9,00 horas.

2.1.2. Preparación de somatostatina

Para preparar la solución de somatostatina se pesaron 3 mg. de esta hormona (Serono) y se llevaron a 15 ml. con solución salina (ClNa al 0,9%), repartiéndose en alícuotas de 2 ml. que se congelaron a -80°C.

Una vez descongeladas estas alicuotas, fueron empleadas en el mismo día.

2.1.3. Sacrificio de animales

Los animales objeto de este estudio fueron utilizados al alcanzar aproximadamente los 250 gs. de peso corporal.

El día del experimento, fueron inyectados subcutáneamente con 20 μ l/100 g. de peso corporal (20 μ g), de la solución de somatostatina y sacrificados mediante decapitación con guillotina a los 5, 10 y 15 min. de la inyección. A los controles (tiempo "0") se les inyectó una cantidad igual de salino (0,9% NaCl).

En un experimento para descartar la influencia de factores no mediados por la hormona, tales como stress, los animales fueron inyectados con somatostatina o salino, a la misma dosis, y sacrificados a los 10 min.

En todos los casos el sacrificio se realizó entre las 10:00 y las 12:00 horas, con el fin de evitar interferencias que pudieran provocar la existencia de ritmos circadianos en alguno de los parámetros estudiados.

2.2. OBTENCION Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR

Tras el sacrificio se procedió inmediatamente a la extracción de cerebro e hipófisis.

2.2.1. Hipófisis

Se extrajo la hipófisis y se desechó la neurohipófisis. Se utilizaron dos adenohipófisis por punto, para obtener la cantidad de tejido suficiente que permitiera hacer fraccionamiento subcelular. A cada dos adenohipófisis se les añadió 1 ml de tampón que contenía: Tris 50 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1 mM y Sacarosa 0,5 M (pH 7,4) (TKMC-0,5 M Sacarosa) recién preparado. Se homogeneizaron en un homogeneizador Dounce, mediante cinco pasadas con émbolo A y diez con émbolo B. A continuación se siguió el procedimiento de centrifugación diferencial que se resume en la figura 3.

Para todas las centrifugaciones se utilizó una centrifuga Beckman modelo J2-21. Así se obtuvieron las fracciones subcelulares que se indican en la figura 2. Los precipitados (FV, FII Y FIV) fueron resuspendidos en 500 µl de tampón que contenía Tris 50 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 2 mM y CaCl₂ 1 mM a pH 7,4 (TKMC-"stock").

Todo el proceso de homogeneización se realizó en frío, sumergiendo los tubos que contenían las muestras en un baño de hielo, para evitar el calentamiento del tejido y la consiguiente pérdida de actividad. Las fracciones obtenidas se guardaron congeladas a -80°C.

2.2.2. Cerebro

Se utilizó un sólo cerebro por punto, descartando el cerebelo, que fue homogeneizado en 5 ml de tampón que contenía Tris 10 mM y Sacarosa 0,32 M (pH 7,4), recién preparado, con un homogeneizador vidrio-teflón, mediante 10 emboladas utilizando un motor eléctrico. A continuación, se siguió el procedimiento de centrifugación diferencial que se resume en la figura 4.

Para todas las centrifugaciones se utilizó la misma centrifuga Beckman J2-21, empleada para la adenohipófisis. Así se obtuvieron las fracciones subcelulares que se indican en la figura 4. Los precipitados

FIGURA 3

ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE ADENOHIPOFISIS.

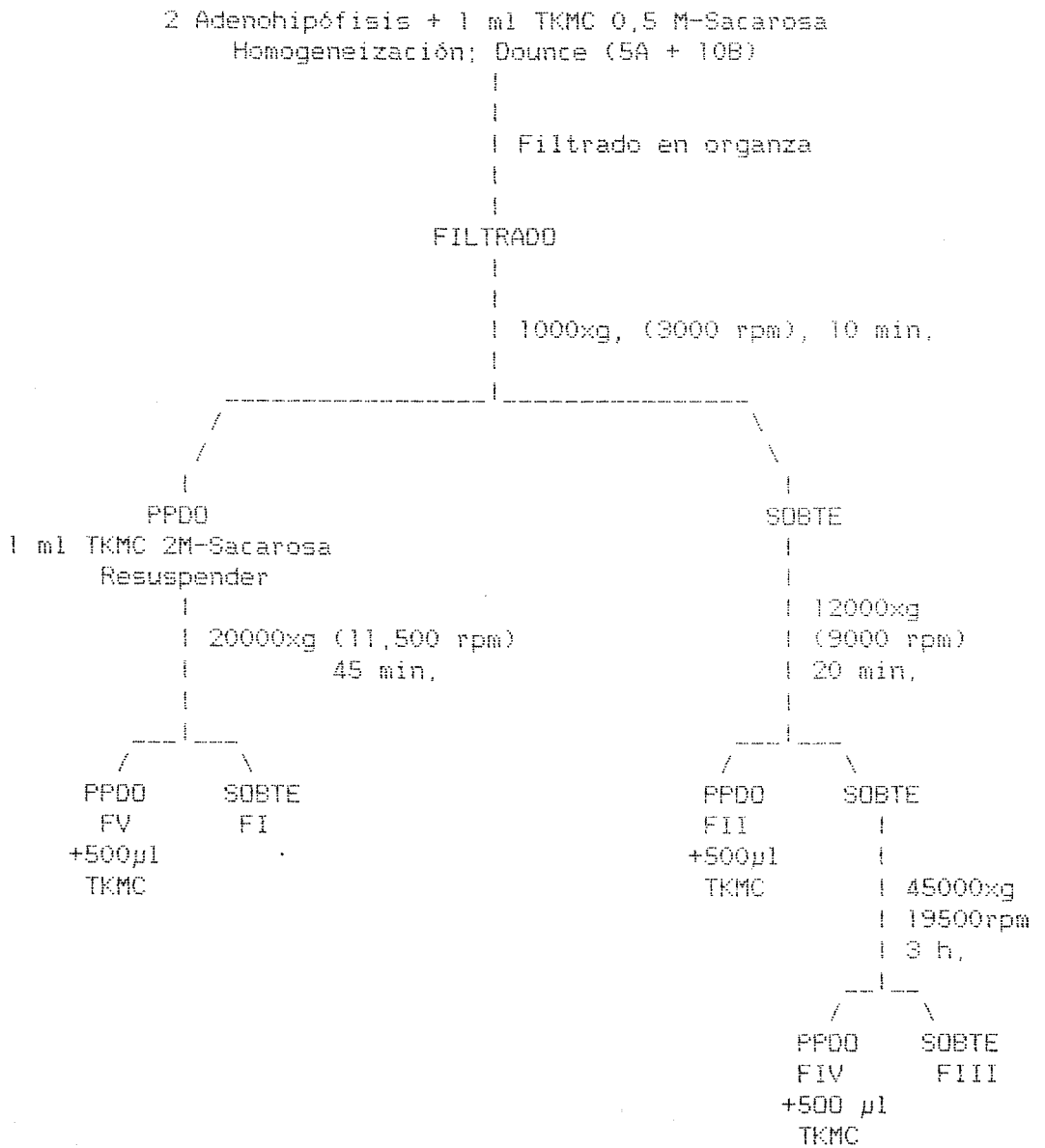
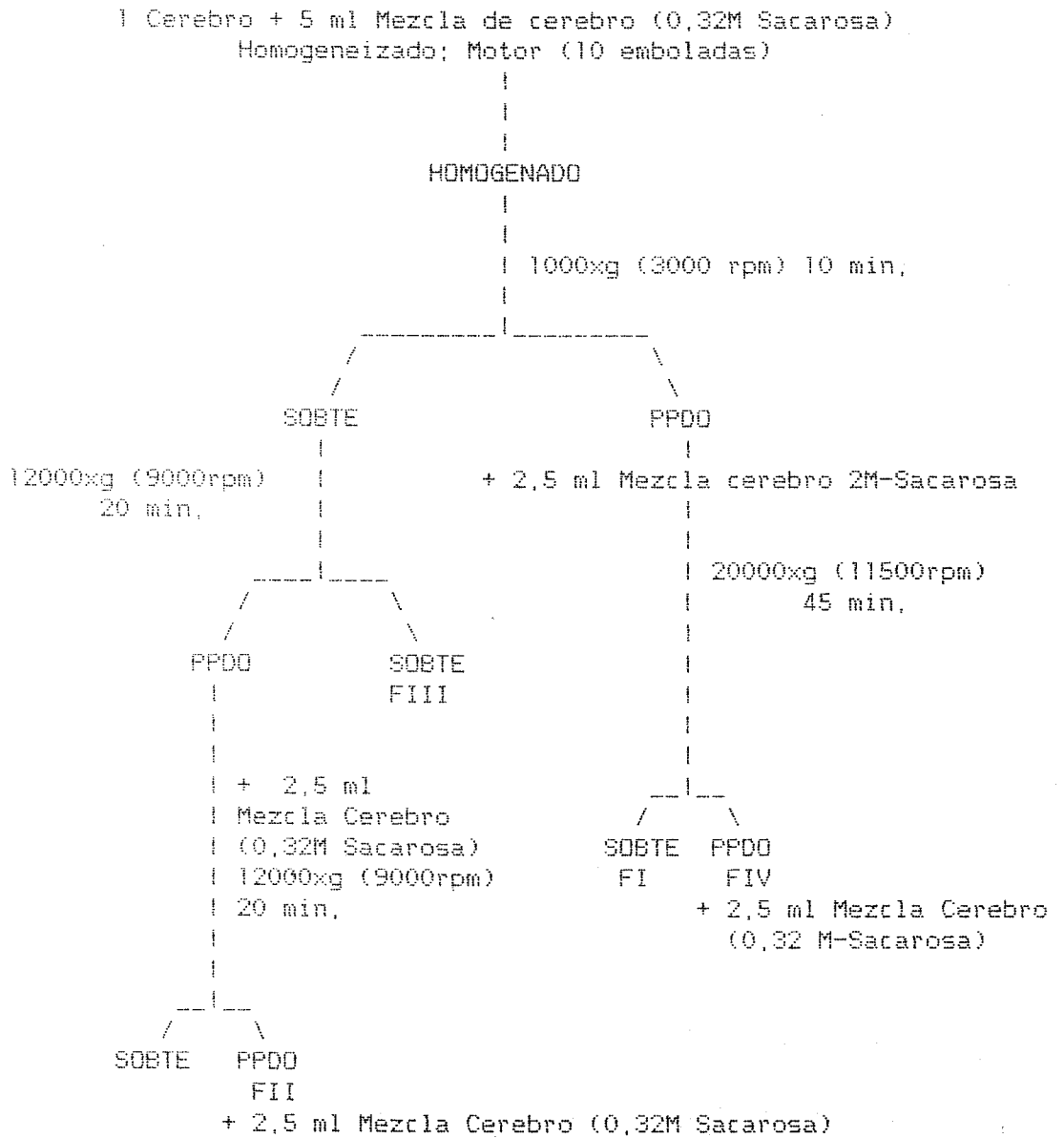


FIGURA 4

ESQUEMA DEL FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE CEREBRO



fueron resuspendidos en 2,5 ml de tampón igual al empleado en la homogeneización inicial de los cerebros. Al igual que para la adenohipófisis, todo el proceso de homogeneización se realizó en frío, y las fracciones se guardaron, igualmente, a -80°C , hasta su posterior utilización.

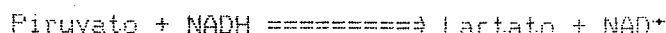
2.3. CARACTERIZACION ENZIMATICA DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE CEREBRO E HIPOFISIS

2.3.1. Actividad Láctico deshidrogenasa

a. Fundamento

La actividad láctico deshidrogenasa se determinó espectrofotométricamente midiendo la velocidad de oxidación del NADH a 340 nm (Bergmeyer y Bent, 1970). El método se basa en la desaparición del máximo de absorción que presenta el NADH a 340 nm, al ser oxidado a NAD^+ , de acuerdo con la siguiente reacción;

LDH



Esta desaparición se emplea para seguir el curso de la reacción.

b. Reactivos

- Tampón fosfato potásico 500 mM pH 7,5
- Solución de piruvato 6 mM
- Solución de NADH 18 mM

c. Metodología

La mezcla de reacción contenía en un volumen final de 1 ml: fosfato potásico 50 mM, pH 7.5, piruvato 0.6 mM, NADH 0.18 mM y 10 μ l de la fracción subcelular correspondiente.

La reacción se inició por adición de la muestra y se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 min., Pasado este tiempo se midió la absorbancia a 340 nm, en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo MPS-2000.

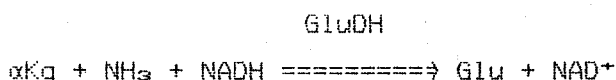
El valor del coeficiente de extinción molar empleado para el NADH a 340 nm fue de $6200 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de NADH por minuto.

2.3.2. Actividad glutamato deshidrogenasa

a. Fundamento

La actividad glutamato deshidrogenasa se determinó espectrofotométricamente midiendo la velocidad de oxidación del NADH a 340 nm (Bergmeyer, 1963). La reacción se basa, al igual que la valoración explicada anteriormente, en la desaparición del máximo de absorción que presenta el NADH a 340 nm, al ser oxidado a NAD^+ , según la siguiente reacción:



b. Reactivos

- Tampón trietanolamina 500 mM pH 7,0
- Solución de α -cetoglutarato 2,5 mM
- Solución de acetato de amonio 1000 mM
- Solución de ácido etilendiamino tetracético (EDTA) 25 mM
- Solución de NADH 0,1 mM

c. Metodología

La mezcla de reacción, con un volumen final de 1 ml, se preparó pipeteando 100 μ l de cada reactivo, a excepción de la solución de NADH de la que se pipeteó 10 μ l, y se añadió 50 μ l de la fracción subcelular correspondiente en el caso de la hipófisis, y 20 μ l en el de cerebro.

La reacción se inició por la adición del α -cetoglutarato y se llevó a cabo a temperatura ambiente durante 5 min., pasados los cuales se midió la absorbancia a 340 nm en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo MPS-2000.

El valor del coeficiente de extinción molar empleado para el NADH a 340 nm fué de $6,200 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

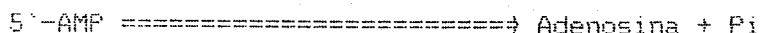
Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que transforma 1 μ mol de NADH por minuto.

2.3.3. Actividad 5'-mononucleotidasa

a. Fundamento

La actividad 5'-mononucleotidasa se determinó colorimétricamente midiendo la cantidad de ortofosfato liberado enzimáticamente del 5'-AMP (Serrano, 1978), de acuerdo con la siguiente reacción:

5'-Nucleotidasa



b. Reactivos

- Mezcla de reacción:

- Tampón Tris-ClH 300 mM pH 7,5
- Solución de KCl 50 mM
- Solución de MgCl₂ 50 mM
- Solución de 5'-AMP 50 mM, Diluida ½ con Tris 1 M para conseguir pH 7,5

- Mezcla de parada:

- Dodecilsulfato sódico (SDS) al 1%
- Molibdato amónico al 0,5%
- Ac. sulfúrico al 2%

- Ac. Ascórbico al 8%

- Solución patrón de K₂HPO₄ 8 mM

c. Metodología

La mezcla de reacción, con un volumen final de 100 µl, se preparó pipeteando 10 µl de cada reactivo y 40-60 µg de la fracción subcelular correspondiente.

La reacción se inició en el minuto cero, por la adición del 5'-AMP y tras 30 min. de incubación a 37°C, se detuvo añadiendo 2 ml de una solución que contenía: H₂SO₄ 2%, (NH₄)₂MoO₄ 0,5% y SDS 1%. Una vez parada la reacción, se añadió a cada tubo 50 µl de ac. ascórbico al 8%, y se esperó 30 min. a temperatura ambiente para que se desarrollara el color. Pasado este tiempo, se midieron las absorbancias a 750 nm.

En todos los ensayos se usaron blancos sin proteína o sin 5'-AMP, para valorar el fosfato contaminante de las preparaciones enzimáticas y del 5'-AMP hidrolizado.

Los valores de absorbancias se interpolaron en una recta de calibrado construida con KH_2PO_4 , entre 1,56 y 400 nmoles.

Una unidad de actividad enzimática se definió como la cantidad de enzima que hidroliza 1 μmol de 5'-AMP por minuto, en las condiciones óptimas de ensayo.

2.4. VALORACION DE PROTEINAS

Se ha empleado el método colorimétrico de Lowry y cols. (1951).

a. Fundamento

Este método está basado en una reacción colorimétrica que se realiza en dos etapas sucesivas; en la primera de ellas, se produce la reacción biuret de las proteínas en solución con el ión cobre, en un medio alcalino; y en la segunda etapa, este complejo formado, se hace reaccionar con el reactivo Folin-Cicalteau, quedando reducido este último por una transformación del fosfomolibdato a molibdeno, debido a la presencia de tirosina y triptófano, produciéndose una coloración azul.

b. Reactivos

- Solución concentrada de proteínas: Seroalbúmina bovina (BSA) al 5% en agua destilada.
- Solución "A": Dodecilsulfato sódico (SDS) al 20% 250 μl
Hidróxido Sódico (NaOH) 1N 5 ml
- Solución "B": Carbonato Sódico (CO_3Na_2) anhidro al 20% 5 ml
Tartrato Sódico Potásico anhidro al 2% 0,5 ml
Sulfato Cúprico (SO_4Cu) anhidro al 1% 0,5 ml
Agua destilada

- Solución "C": Reactivo Folin-Cicalteau 2N 3 ml
- Agua destilada 6 ml

c. Metodología

La valoración se realizó de la siguiente manera; la solución concentrada de albúmina sérica bovina (BSA) preparada al 5%, se diluyó 1:50 con agua destilada quedando a una concentración final de 1 mg/ml. A partir de esta solución diluida se preparó la siguiente curva estandar:

solución de BSA	(μ l)	100	75	50	40	25	10	5	0
concentración de proteínas	(μ g)	100	75	50	40	25	10	5	0

Todos los puntos de la estandar se llevaron a un volumen final de 100 μ l (con agua destilada) y se analizaron por duplicado.

Las muestras también se valoraron por duplicado e igualmente se llevaron a un volumen final de 100 μ l (previamente, habíamos determinado cual era el volumen óptimo a ensayar, para cada fracción, frente a una curva estándar).

Tanto a los patrones como a las muestras se les añadió en primer lugar 100 μ l de la solución "A" y se agitaron (con esta solución se consigue solubilizar a las proteínas y establecer un medio alcalino). A continuación, se añadió a cada tubo 900 μ l de la solución "B". De nuevo se agitaron los tubos y, pasados 10 min., se les añadió 100 μ l de la solución "C".

Una vez añadida esta última solución, se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 min, para que desarrollaran el color. Pasado este tiempo, se realizó la lectura de la absorbancia en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo MPS-2000, a una longitud de onda de 750 nm.

La representación gráfica de las densidades ópticas frente a las distintas concentraciones conocidas de la solución BSA utilizada, dio siempre una línea recta que pasa por el origen y cuyo coeficiente de regresión lineal fué, en todos los casos, de 0.99. Sobre esta recta se llevaron los valores de absorbancia de las muestras problemas, y se obtuvieron los valores correspondientes de μg de proteína que contenían las muestras del tejido a valorar (fig. 5).

2.5. VALORACION DE LA ACTIVIDAD ATPasa

2.5.1. Cerebro

a. Fundamento

Hemos utilizado el método descrito por Serrano (1979) que se basa en la valoración de fosfato inorgánico descrito por Fiske Subbarow (1925), aunque es más sensible que éste. Se fundamenta en la reducción del complejo fosfomolibdato por el ácido ascórbico. Dicho complejo se forma al reaccionar el fosfato liberado de la hidrólisis del ATP, por la ATPasa, con el molibdato amónico.

b. Reactivos

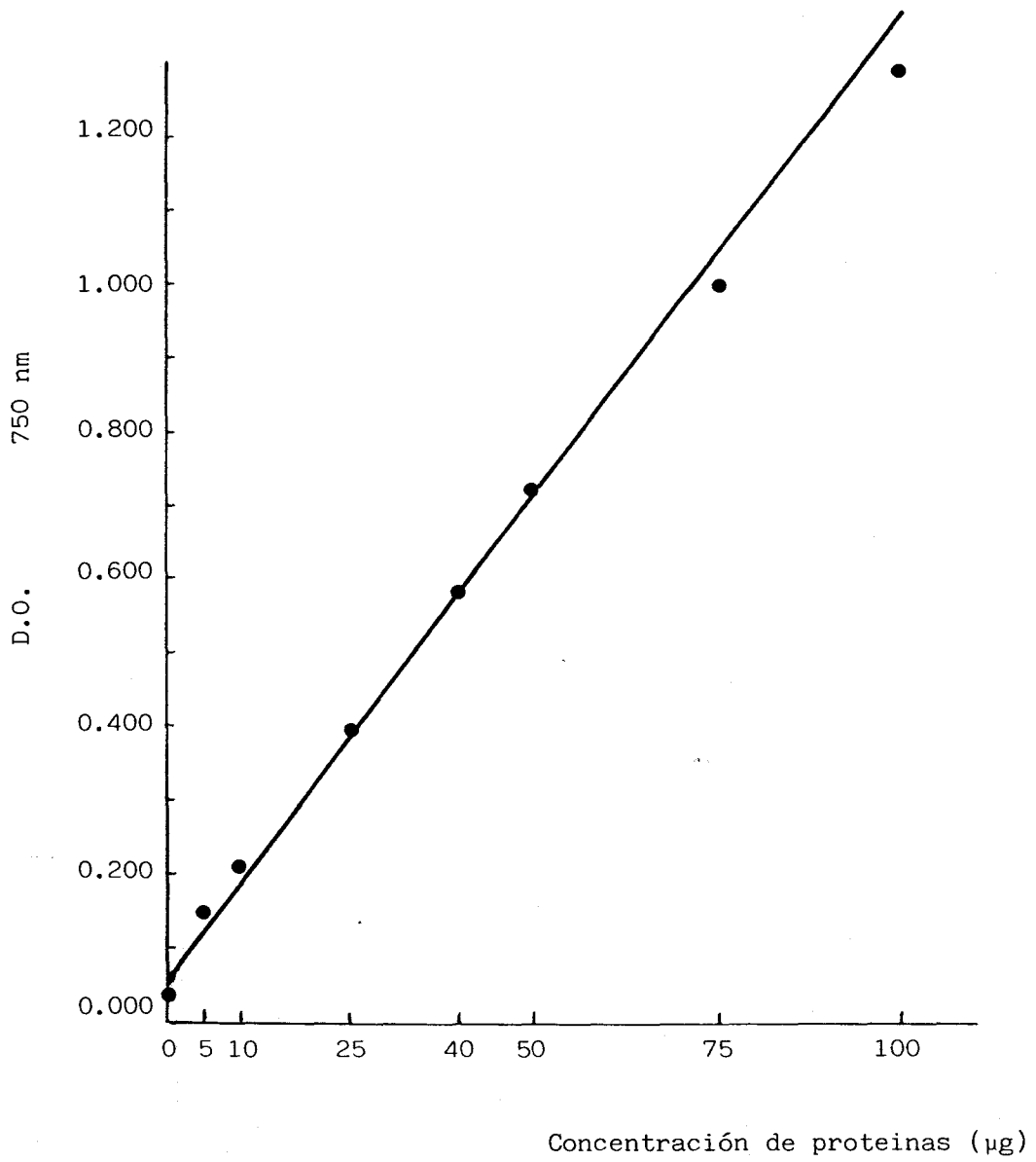
- Mezcla para parar la reacción:

- SDS 1%
- Molibdato Amónico 0.5%
- Ac. Sulfúrico 2%

Se preparó en agua destilada y se mantuvo a temperatura ambiente.

- Ac. Ascórbico 8%
- Solución patrón de K_2HPO_4 9 mM

FIGURA 5
EJEMPLO DE CURVA PATRON EN LA VALORACION
DE PROTEINAS



- Mezcla de reacción:

- Tampón Tris-ClH pH 7,5 500 mM
- Solución de $MgCl_2$ 60 mM
- Solución de $CaCl_2$ 10 mM
- Solución de KCl 1M
- Solución de NaCl/KCl 500mM/50mM
- Solución de ATP (Sigma) 100 mM, Diluida $\frac{1}{2}$ con Tris 1M para conseguir pH 7,5
- Solución de Ouabaina 5 mM
- Solución de Azida sódica 100mM
- Solución de EGTA 10 mM

Todos los reactivos se guardaron en cámara fría y se renovaron cada 15 días, excepto la solución de $CaCl_2$ que se preparó el mismo día del ensayo.

c. Metodología

Se valoró una ATPasa total, la ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) y la ATPasa (Na^+ - K^+).

Las tres ATPasa se valoraron en las siguientes fracciones de cerebro: Fracción I, Fracción II y Fracción III. En todos los casos el volumen de muestra fué de 10 μ l, aunque según la fracción y la ATPasa a valorar se emplearon distintas diluciones de las muestras, previamente determinadas.

En el esquema adjunto se resume los reactivos e inhibidores empleados en la valoración de estas tres ATPasas. Como puede observarse, la ATPasa total fué la medida en ausencia de azida, EGTA y ouabaina (mezcla A). La ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) se midió como la diferencia de actividad en presencia de Ca^{2+} (mezcla B) y en ausencia de este catión (mezcla C). Por último, la ATPasa (Na^+ - K^+) se midió como la diferencia de actividad en ausencia de ouabaina (mezcla B) y en presencia de éste glucósido (mezcla D).

Esquema para la determinación de las actividades ATPasa:

Mezcla de reacción	A	B	C	D
Tris	+	+	+	+
MgCl ₂	+	+	+	+
CaCl ₂	+	+	-	+
KCl	+	+	+	+
Na/K	+	+	+	+
ATP	+	+	+	+
Azida	-	+	+	+
EGTA	-	+	+	+
ouabaina	-	+	+	-

A, representa la actividad ATPasa total,

(B-C), representa la actividad ATPasa (Ca²⁺-Mg²⁺)

(D-B), representa la actividad ATPasa (Na⁺-K⁺)

En todos los casos la mezcla de reacción (10 µl de cada reactivo) junto con la muestra a analizar tuvo un volumen final de 100 µl (en los casos necesarios se completó el volumen con agua destilada). El pH de esta mezcla fué de 7,5.

Aunque como hemos visto, la mezcla de reacción varió según la ATPasa que se valorara, el ensayo en sí mismo, fue similar en los tres casos:

La reacción se comenzó en el minuto cero añadiendo a cada tubo 10 µl de la solución de ATP. Estos tubos, previamente agitados, se introdujeron en un baño de incubación a 37°C, durante 30 min. Transcurrido este tiempo, la reacción se paró añadiendo a cada tubo 2 ml de la mezcla de parada y 50 µl de ac. ascórbico. Los tubos se agitaron y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 min para que se desarrollara el color.

Los tubos "blancos" cuya actividad se restó de la de las muestras se prepararon pipeteando 10 μ l de la muestra (a la dilución óptima) por duplicado, a los que se añadieron 80 μ l de la mezcla de reacción correspondiente al ensayo que se realizara, y se mantuvieron en frío hasta el momento de añadirles ATP, mezcla de parada y ac. ascórbico, de un modo consecutivo.

La curva patrón de fosfato se preparó a partir de una solución de K_2HPO_4 8 mM. De ésta, se hizo una dilución 1:2 y a partir de la misma diluciones seriadas de las que se tomaron 100 μ l de modo que las concentraciones de fosfato de la curva en nmoles fueran: 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 3,125 y 1,5625. Al igual que al resto de los tubos se les añadió 2 ml de la mezcla de parada y 50 μ l de ac. ascórbico. La curva patrón se realizó por duplicado.

Después de desarrollarse el color, se midieron las absorbancias a una longitud de onda de 750 nm, en un espectrofotómetro modelo Shimadzu, modelo MPS-2000.

La representación gráfica de las densidades ópticas frente a las distintas concentraciones conocidas de la solución de K_2HPO_4 utilizada, dió una línea recta que pasa por el origen y cuyo coeficiente de regresión lineal fué en todos los casos de 0,99. Sobre esta recta se llevaron los valores de densidad óptica de las muestras problemas y se obtuvieron los valores correspondientes de nmol de ATP hidrolizado (fig. 6).

Los valores reales de nmol de ATP hidrolizado se obtuvieron finalmente, en el caso de la actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}), al sustraer de los valores obtenidos con la mezcla de reacción "B" (que contiene $CaCl_2$) los obtenidos con la mezcla de reacción "C" (sin $CaCl_2$). Igualmente para el caso de la actividad ATPasa (Na^+ - K^+), se sustrajeron de los valores obtenidos con la mezcla de reacción "D" (sin ouabaina), los obtenidos con la mezcla de reacción "B" (con ouabaina).

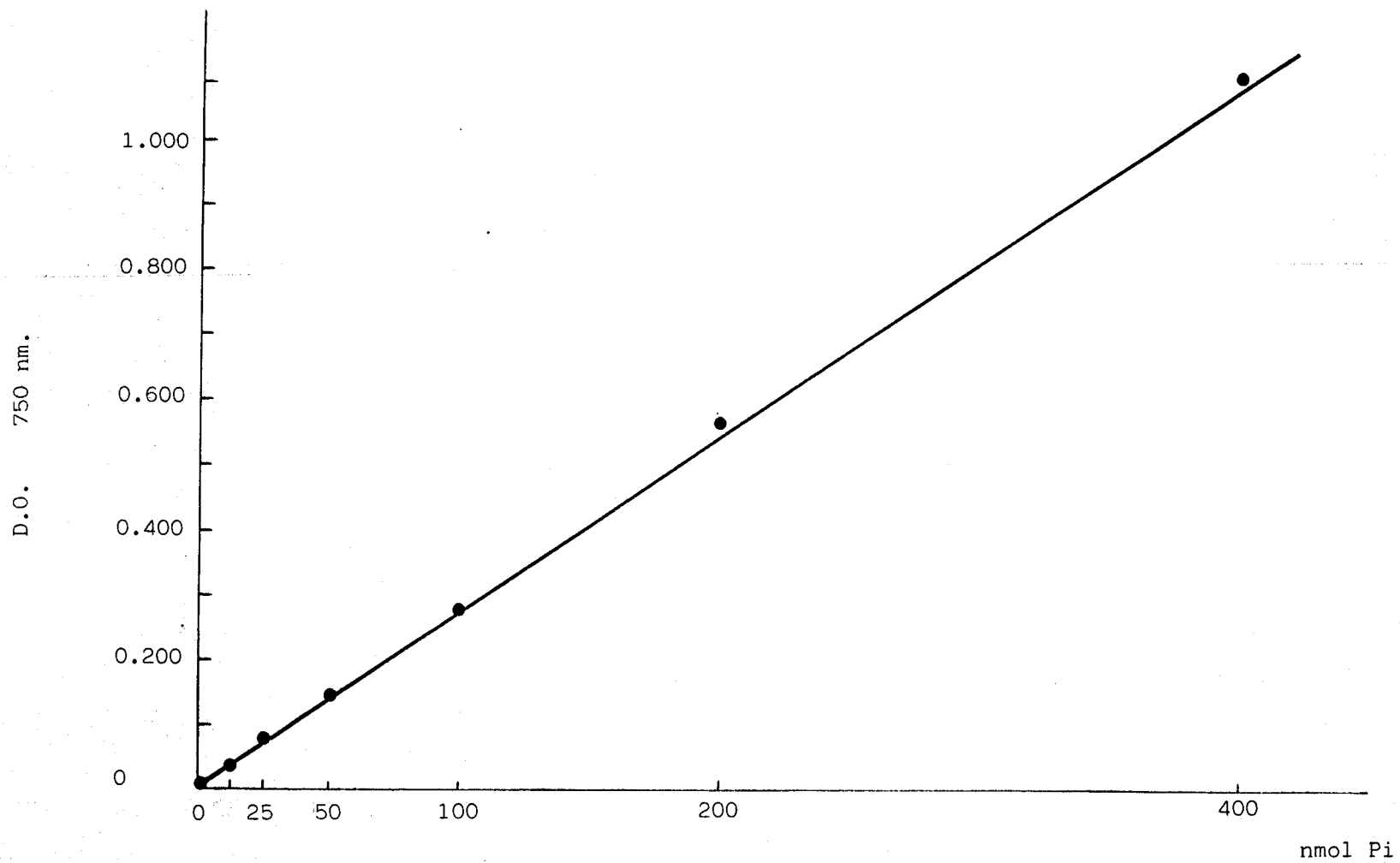


FIGURA 6

EJEMPLO DE CURVA PATRON EN LA VALORACION DE Pi

2.5.2. Adenohipófisis

a. Fundamento

El método se basa en la valoración de ^{32}P i liberado enzimáticamente de $\gamma\text{-}^{32}\text{P}\text{-ATP}$ mediante la formación de un complejo de fosfomolibdato que se extrae con butanol-toluol (Kemmler y Loffler, 1977).

b. Reactivos

- Tampón Tris-ClH, pH 7,5, 800 mM
- Solución de KCl, 1,9 M
- Solución de MgCl_2 , 56 mM
- Solución de CaCl_2 , 8 mM
- Solución de NaCl, 500 mM
- Solución de azida, 100 mM
- Solución de EGTA, 10 mM
- Solución de ouabaina, 5 mM
- Mezcla de parada "A": H_2SO_4 , 0,5 N/ $(\text{NH}_4)\text{MoO}_4$, 1,25% (P/V)
- Mezcla de parada "B": Butanol/Toluol 1:1 V/V
- Solución de ATP(SIGMA): 20 mM, diluida $\frac{1}{2}$ con Tris 1 M para conseguir un pH 7,5, concentración final 10 mM. A partir de esta dilución se prepararon tres concentraciones diferentes: 1 mM, 0,5 mM y 0,25 mM.
- $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ (New England Nuclear) actividad específica 3000 Ci/mmol

c. Metodología

Las valoraciones se realizaron en las fracciones subcelulares de hipófisis, y se midieron dos actividades ATPasicas: la total y la ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$).

Aunque el método difiere del colorimétrico empleado en las valoraciones de las ATPasas de cerebro, la base de las dos valoraciones fue la misma, es decir, para la ATPasa total se empleó un sólo grupo con las muestras por duplicado, y para la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} + \text{Mg}^{2+}$) se hicieron dos grupos, cuya única diferencia consistió en la composición de la mezcla de reacción a añadir, una de las cuales contenía CaCl_2 y la otra no.

La mezcla de reacción para la ATPasa total tenía el mismo medio descrito anteriormente, 10 ó 20 μl de muestra y las concentraciones de ATP y ATP- ^{32}P que a continuación se indican en un volumen final de 100 μl . La concentración de ATP fue 0,1 mM, 0,05 mM y 0,025 mM para el análisis de FI, FII y FIV respectivamente. La concentración de $[\text{Y-}^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ fue en todos los casos de 0,074 μCi /por tubo.

Los tubos, previamente agitados, se introdujeron en un baño de incubación a 37°C, durante 30 min., pasados los cuales, la reacción se detuvo añadiendo a cada uno 0,1 ml de una disolución que contenía: H_2SO_4 0,5 N, $(\text{NH}_4)_2\text{MoO}_4$ 1,25% (V/V) y 1 ml de la mezcla butanol-toluol (1:1, V/V).

El complejo fosfomolibdato amónico formado, se extrajo en la fase orgánica manteniendo los tubos en agitación continua durante 1 hora. Las fases orgánica y acuosa se separaron por centrifugación durante 1 min, a 3000 rpm. A continuación se tomaron alícuotas de 0,4 ml de la fase orgánica que se transfirieron a viales de centelleo líquido, a los que se añadió 1,1 ml de líquido de centelleo. Después de agitados, se midió la radioactividad en un contador de centelleo líquido LS 1800 Beckman.

Los tubos "blancos" cuya actividad se restó de los problemas, se prepararon pipeteando la muestra junto a la mezcla correspondiente a cada valoración, y se mantuvieron en baño de hielo hasta el momento de añadirles de un modo consecutivo la disolución ATP/ $[\text{Y-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ y la mezcla de parada. Una vez hecho esto, siguieron el mismo curso que las muestras problemas.

La radioactividad total añadida a los tubos de la reacción se midió para poder establecer una referencia con las muestras. Estos estándares se prepararon pipeteando, únicamente 10 μ l, de la mezcla de ATP frío y ATP radioactivo, a los que se añadió 1,1 ml del líquido de centelleo, midiéndose de igual modo que el resto de los tubos.

La actividad enzimática se expresó en nmoles de Pi hidrolizado por min y por mg de tejido.

2.6. VALORACION DE ACTIVIDADES HIDROLIZANTES DE ATP Y ADP

En este apartado, utilizando los métodos ya descritos de valoración de actividad ATPasa, colorimétrico e isotópico, hemos valorado las posibles actividades ADPasa y/o Apirasa (ATPdifosfohidrolasa) existentes en las fracciones subcelulares de cerebro.

Tanto el método colorimétrico (Serrano, 1978), como el isotópico (Kemmler y Loffler, 1977) están suficientemente explicados con anterioridad, por lo que no vamos a volver sobre ellos ni en el fundamento ni en la metodología, simplemente señalaremos las particularidades y características de las valoraciones realizadas.

Vamos a dividir dichas valoraciones en cuatro apartados:

2.6.1. Actividad con trifosfo- y difosfonucleótidos.

En primer lugar, y para comprobar si además de actividad ATPasa, existía una actividad ADPasa, realizamos una serie de experimentos en los que se midió la actividad existente con tri- y difosfonucleótido. Se realizaron en las tres fracciones de cerebro y se siguió la base del método colorimétrico ya explicado. El medio de incubación contenía: Tris-ClH 50 mM (pH 7.5), CaCl₂ 5 mM cuando el

sustrato fué ATP o 2,5 mM cuando el sustrato fué ADP. La concentración de sustrato en ambos casos fué de 5 mM.

2.6.2. Inhibición por trifluoperazina.

La dependencia de calmodulina de estas actividades enzimáticas se estudió en fracciones de cerebro de ratas controles, incubando como se ha descrito en el apartado anterior, en presencia de distintas concentraciones de trifluoperazina, un inhibidor de la calmodulina. Las concentraciones de trifluoperazina empleadas fueron: 0,125, 0,25, 0,5 y 1 mM.

2.6.3. Inhibición de la actividad adenilato quinasa.

En tercer lugar, y para excluir la posibilidad de que la hidrólisis del ADP ocurriera por una primera conversión de éste en ATP catalizado por una adenilato quinasa, y posterior hidrólisis de este ATP formado, realizamos experimentos iguales a los del segundo grupo, pero incluyendo en el medio de incubación el inhibidor específico de la adenilato quinasa: diadenosilpentafosfato (Ap₅'A). La concentración empleada de dicho inhibidor fué de 20 μ M.

2.6.4. Actividad apirasa.

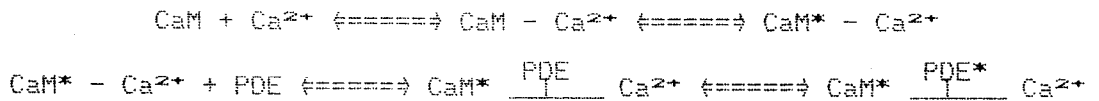
En cuarto lugar, y una vez establecido que existía actividad ADPasa, para comprobar si esta actividad podía ser debida a una ATPdifosfohidrolasa (apirasa) que quedara enmascarada al medir la hidrólisis del ATP por el método colorimétrico, se plantearon unos experimentos en los que se midió, a la vez, la actividad con difosfonucleótidos y trifosfonucleótidos por el método colorimétrico (Serrano, 1978) y la actividad con trifosfonucleótidos por el método isotópico (Kemmler y Loffler, 1977). En el primero de ellos, se mantuvo el medio de incubación descrito en el apartado (2.6.1), es decir: Tris-

ClH 50 mM (pH 7.5), CaCl₂ 5 mM para trifosfonucleótidos, CaCl₂ 2,5 mM para difosfonucleótidos y de ADP o ATP 5 mM. Y para la valoración isotópica el medio fué: Tris-ClH 50 mM (pH 7.5), CaCl₂ 5 mM y 5 mM/0,074 µCi ATP/EY-³²P]ATP. Paralelamente se hicieron experimentos semejantes incluyendo en el medio Azida (10 mM), inhibidor de la actividad ADPásica.

2.7. VALORACION DE LA ACTIVIDAD CALMODULINA

a. Fundamento

La activación de PDE de nucleótidos cíclicos es dependiente de iones calcio (Ca²⁺) y puede describirse con el siguiente esquema:



La activación enzimática se inicia por la unión de Ca²⁺ a la calmodulina (CaM), como resultado se tiene una forma activa de calmodulina (CaM*-Ca²⁺), que a su vez se asocia con la enzima (PDE) para pasarla a un estado activado; CaM* $\frac{\text{PDE}^*}{|}$ Ca²⁺. A concentraciones saturantes de calcio, la activación de la fosfodiesterasa depende de la concentración de calmodulina en la reacción. Así, la calmodulina puede ensayarse en base a la activación de PDE en presencia de cantidades saturantes de calcio (Cheung, 1980).

b. Reactivos

- Tampón "A": Tris-HCl, pH 7.5, 40 mM
- Tampón "D": Tris-HCl, pH 7.45, 40 mM, Cl₂Mg 2 mM
- Solución CaCl₂ 4 mM en tampón "A"

- ($8\text{-}^3\text{H}$) AMPc (New England Nuclear): de una solución original conteniendo 1 mCi/ml y 2.5 $\mu\text{Ci}/\mu\text{mol}$, se tomaron 2.5 μl por ml de mezcla de reacción.
- AMPc (Sigma): se preparó una solución de 3.4 mg del nucleótido en 2 ml de la solución tampón "D". A continuación se hizo una dilución 1:100 con el mismo tampón, y se leyó la absorbancia (D.O.) a 259 nm de longitud de onda. El valor obtenido se sustituyó en la fórmula de Lambert-Beer: $C=D.O./E$, donde E es el coeficiente de extinción molar (para el AMPc 14,65 a pH 7,4) y C el valor de la concentración de la muestra en M. El valor de la concentración que se obtuvo fué aproximadamente 5 mM, ajustándose posteriormente a 4,2 mM con tampón "D".
- 5' nucleotidasa de veneno de serpiente (fracción V, Sigma): (60 unidades/mg de sólido). Se preparó una solución de 1 mg/ml. De esta solución se tomaron 20 μl por ml de mezcla de reacción.
- Adenosina: se preparó una solución de 2,67 mg en 10 ml de ácido HCl 0,05 N, obteniéndose una concentración de 1 mM. Se hizo una dilución 1:10 con tampón 10. La adenosina así preparada se utilizó para calcular el porcentaje de retención de ésta por la resina empleada en el método de valoración enzimática.
- Resina AG1-X8 (200-400) (Bio-rad): antes de ser utilizada se trató con NaOH 1 N hasta pH alcalino, agua destilada hasta pH neutro, HCl 1 N hasta pH ácido, y por último, agua destilada hasta pH neutro. Para obtener la proporción 1:2 (resina-agua) se añadió agua desstilada. El mismo procedimiento se empleó para su regeneración.
- Líquido de centelleo: Ready-solv CP (Beckman), apropiado para muestras acuosas.

c. Metodología

La valoración se realizó en la fracción III de cerebro. A cada muestra se le hizo una dilución 1:100, y se introdujeron en un baño a 100°C durante 3 min (la enzima PDE queda inactivada), al cabo de los

cuales se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm recogiendo el sobrenadante.

De estos sobrenadantes se alicuotaron 20 μ l por duplicado. A todos los tubos se les añadió 10 μ l de la solución de Cl_2Ca . Seguidamente se añadió 20 μ l de PDE libre de calmodulina, en el momento de introducirlos en un baño a 30°C, previa agitación, en el que estuvieron un periodo de preincubación de 20 min, que permite un "acoplamiento" PDE - Ca^{2+} - calmodulina, pasado el cual se les añadió 50 μ l de una mezcla de reacción que contenía los siguientes componentes: (8- ^3H) AMPc (2.5 $\mu\text{Ci/ml}$), AMPc (4.2 mM), 5'nucleotidasa (20 μ l por ml de mezcla de reacción de una solución de 60 unidades/ml). Todo ello en tampón "D", de forma que las concentraciones finales por tubo fueron: 500 μM AMPc y 0.06 unidades de 5'nucleotidasa. Se agitaron de nuevo y se volvieron a introducir en el baño otros 20 min, correspondientes al periodo de incubación. Por último, y para parar la reacción, al cabo de este tiempo se añadió a cada tubo 1 ml de resina (1:2), se agitaron y se dejaron a temperatura ambiente en reposo, durante 30 min.

Los tubos "blancos" de la reacción se prepararon pipeteando 20 μ l de tampón "A" a los que se añadió 10 μ l de la solución de Cl_2Ca y 20 μ l de PDE "hervida". Se siguió con ellos el mismo proceso que con las muestras.

Para separar la resina, una vez transcurridos los 30 min, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm en una centrifuga Beckman TJ6, y se transfirió una alicuota de 400 μ l del sobrenadante a viales de centelleo líquido, a los que se añadió 1.1 ml de líquido de centelleo. Después de agitados, se determinó su radioactividad en un contador de centelleo líquido LS 1800 Beckman.

Se midió la radioactividad total añadida a los tubos de la reacción para poder establecer una referencia con las muestras. Estas estándares se prepararon con 50 μ l de tampón "A", 50 μ l de mezcla de

reacción y 1 ml de agua destilada en lugar de resina, contándose una alícuota de 400 μ l.

La resina, añadida a los tubos con las muestras, retiene los nucleótidos AMPc y 5'-AMP, dejando libre en la solución la mayoría de la adenosina, aunque parte queda retenida. Esta retención, se determinó en cada uno de los ensayos para corregir los valores de actividad fosfodiesterasa. A una serie de tubos que contenían 0,2 ml de la solución de guanosina se les añadió 2 ml de agua destilada o resina (1:2) por duplicado, se agitaron y aquellos que contenían resina se centrifugaron 10 min a 3000 rpm. Las concentraciones de guanosina en agua y guanosina en el sobrenadante de la resina se determinaron espectrofotométricamente midiendo su D.O. a 254 nm en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo MPS-2000 y se calculó el porcentaje de retención de la resina que osciló entre un 30 y un 40 %.

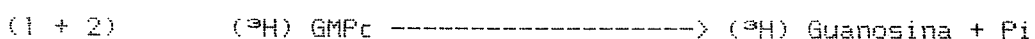
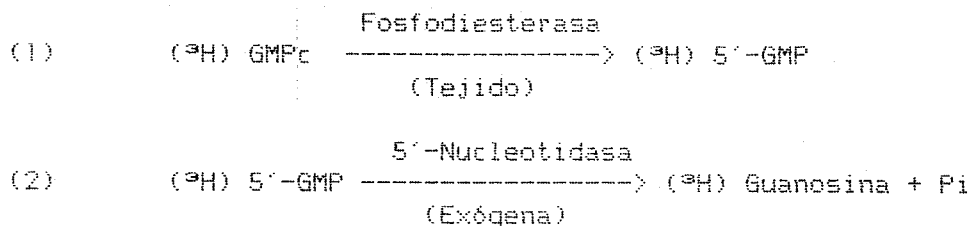
La actividad calmodulina se expresó en unidades de actividad por mg de proteína. Para ello se definió arbitrariamente una unidad como la cantidad de calmodulina que produce una activación mitad de la máxima. La actividad de las muestras se calculó por interpolación de los resultados expresados en cpm, en una curva patrón obtenida con cantidades de calmodulina conocidas (2,5, 5, 10, 15, 20, 30 y 35 ng) por duplicado. Dicha curva fué realizada en las mismas condiciones de tiempo, tampones, etc., que las muestras.

2.8. VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc

a. Fundamento

La actividad fosfodiesterasa se determinó por el método radiométrico descrito por Toro y cols. (1985), basado en los procedimientos de Thompson y Appleman (1971a), con las modificaciones introducidas por Lolley y Farber (1975).

Esquemáticamente este método se basa en las siguientes reacciones:



Es decir, la fosfodiesterasa cataliza la hidrólisis del sustrato $({}^3\text{H}) \text{ GMPC}$ a $({}^3\text{H}) \text{ 5'-GMP}$, que a su vez, por una segunda reacción acoplada llevada a cabo por la 5'-nucleotidasa, se hidroliza a guanosina y ortofosfato.

La guanosina tritiada formada, es entonces separada, mediante una resina de intercambio aniónico, la cual fija los nucleótidos fosforilados, dejando libre la guanosina. Por conteo en un contador de centelleo líquido, se obtiene indirectamente una medida del GMPC hidrolizado.

b. Reactivos

- Tampón "A": Tris-ClH pH 7,5 40 mM
- Tampón "D": Tris-ClH pH 7,45 40 mM, MgCl_2 2 mM
- Solución CaCl_2 2 mM en tampón "A"
- Solución de EGTA 10 mM en tampón "A"
- Calmodulina: 100 ng en tampón "A"/tubo
- Inhibidor de tripsina de soja: 50, 100, 200 y 400 μg en tampón "A" por tubo
- Mercaptoetanol: 1,25, 2,5, 5 y 20 mM en tampón "A" por tubo
- Aprotinina: 20, 50, 100 y 150 μg en tampón "A" por tubo
- $[8-{}^3\text{H}] \text{ GMPC}$ (New England Nuclear): de una solución original conte-

- niendo 1 mCi/ml y 25 μ Ci por μ mol, se tomaron 2,5 μ l por ml de mezcla de reacción.
- GMPc (Sigma): se preparó una solución de 3 mg del nucleótido en 2 ml de la solución tampón "D". A continuación se hizo una dilución 1:100 con el mismo tampón y se leyó la absorbancia (D.O.) a 254 nm de longitud de onda; el valor obtenido se sustituyó en la fórmula de Lambert-Beer: $D.O./E$, donde E es el coeficiente de extinción molar (para el GMPc, 12,95 a pH 7,4), y C el valor de la concentración de la muestra en M. El valor de la concentración que se obtuvo fué aproximadamente de 4 mM, ajustándose posteriormente a 0,42 mM con tampón "D".
 - 5'-nucleotidasa de veneno de serpiente (fracción V, Sigma): (60 unidades/mg de sólido). Se preparó una solución de 1 mg/ml con tampón "D", obteniéndose así 60 unidades/ml. De esta solución se tomaron 20 μ l por ml de mezcla de reacción.
 - Guanosina (Sigma): se preparó una solución de 2,67 mg en 10 ml de ácido HCl 0,05 N, obteniéndose una concentración de 1 mM. Se hizo una dilución 1:10 con tampón "D". La guanosina así preparada se utilizó para calcular el porcentaje de retención de ésta por la resina, empleada en el método de valoración enzimática.
 - Resina AG1-X8 (200-400)(Bio-rad): antes de ser utilizada se trató con NaOH 1 N hasta pH alcalino, agua destilada hasta pH neutro, HCl 1N hasta pH ácido y por último agua destilada hasta pH neutro. Para obtener la proporción 1:2 (resina - agua) se añadió agua destilada. El mismo procedimiento se empleó para su regeneración.
 - Líquido de centelleo: READY-SOLV CP (Beckman), apropiado para muestras acuosas.

c. Metodología

El análisis de fosfodiesterasa se puede realizar en dos pasos consecutivos, incubando en primer lugar el tejido con el sustrato, para que actúe la enzima fosfodiesterasa, y añadiendo en una segunda incubación la 5'-nucleotidasa, que hará posible la formación de la guanosina, medible posteriormente, con un paso intermedio consistente en calentar las muestras al baño maría para inactivar cualquier actividad enzimática; o bien, se puede realizar de una manera simplificada añadiendo conjuntamente el tejido y la 5'-nucleotidasa en una única incubación (Toro y Montoya, 1985). Puesto que en ambos casos los resultados obtenidos son similares, nosotros optamos por utilizar el ensayo simplificado en un sólo paso.

La actividad fosfodiesterasa se valoró en las fracciones citosólicas de cerebro e hipófisis, en tres situaciones de ensayo diferentes;

- (a) en presencia de CaCl_2
- (b) en presencia de CaCl_2 y Calmodulina
- (c) en presencia de EGTA

El volumen de tejido ensayado para la fracción de hipófisis fué en todos los casos de 5 μl , mientras que en cerebro se ensayaron 10 μl de una dilución 1:200, en las situaciones (a) y (b), y 1:100 en el caso (c).

La diferencia entre los tres ensayos fué: en el caso (a), se añadió a cada tubo 10 μl de una solución de CaCl_2 (2 mM); en (b), se añadieron 10 μl de la misma solución de CaCl_2 y 100 ng de Calmodulina; y por último, en (c), se añadió 10 μl de una solución de EGTA (10 mM). Todos los tubos se completaron hasta alcanzar un volumen de 50 μl con tampón "A". En dicho tampón se incluyó 100 μg del inhibidor de tripsina, ya que en experimentos previos pudimos observar que la actividad de la enzima disminuía con el tiempo de incubación, y tras diversos ensayos con distintos inhibidores de la proteólisis llegamos a

la conclusión de que en presencia de dicho inhibidor (100 µg/tubo) se conservaba la actividad de la enzima.

La reacción se comenzó en el minuto "cero" añadiendo a cada tubo 50 µl (volumen final 100 µl) de una mezcla de reacción que contenía los siguientes componentes: [8-³H] GMPc (2,5 µCi por ml), GMPc (0,42 mM), 5'-nucleotidasa (20 µl por ml de mezcla de reacción de una solución de 60 unidades/ml), todo ello en tampón "D", de forma que las concentraciones finales por tubo fueron: 50 µM GMPc y 0,06 unidades de 5'-nucleotidasa. Los tubos fueron agitados inmediatamente y se introdujeron en un baño de incubación a 30°C durante 20 min, transcurridos los cuales la reacción se paró añadiendo a cada tubo 1 ml de resina 1:2 (resina:agua). Se agitaron y se dejaron en reposo a temperatura ambiente durante 30 min.

Así mismo, se tomaron alicuotas de cada una de las muestras (200 µl), que se introdujeron en un baño de agua a 100°C durante tres minutos, al cabo de los cuales se enfriaron rápidamente en un baño de hielo, procesándose igual que el resto de las muestras, sirviendo de "blancos" de la reacción.

Para separar la resina, una vez transcurridos los 30 min, los tubos se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm en una centrifuga Beckman TJ6, y se transfirió una alicuota de 400 µl del sobrenadante a viales de centelleo líquido, a los que se añadió 1,1 ml de líquido de centelleo. Después de agitados, se determinó su radioactividad en un contador de centelleo líquido LS 1800 Beckman.

La radioactividad total añadida a los tubos de la reacción se midió para poder establecer una referencia con las muestras. Estas estándares se prepararon con 50 µl de tampón "A", 50 µl de mezcla de reacción y 1 ml de agua destilada en lugar de resina, contándose una alicuota de 400 µl.

La resina, añadida a los tubos con las muestras, retiene los nucleótidos GMPc y 5'-GMP, dejando libre en la solución la mayoría de

la guanosina, aunque parte queda retenida. Esta retención, se determinó en cada uno de los ensayos para corregir los valores de actividad fosfodiesterasa. A una serie de tubos que contenían 0.2 ml de la solución de guanosina se les añadió 2 ml de agua destilada o resina (1:2) por duplicado, se agitaron y aquellos que contenían resina se centrifugaron 10 min a 3000 rpm. Las concentraciones de guanosina en agua y guanosina en el sobrenadante de la resina se determinaron espectrofotométricamente midiendo su D.O. a 254 nm en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo MPS-2000 y se calculó el porcentaje de retención de la resina que osciló entre un 30 y un 40 %.

La actividad enzimática se expresó en nmoles de GMF_p hidrolizado por min y por mg de tejido.

2.9. VALORACION DEL EFECTO DE SOMATOSTATINA "IN VITRO" SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa Y PDE DE CEREBRO

Con el fin de aclarar si la acción de la somatostatina pudiera deberse a interacción directa con las enzimas estudiadas, o si la hormona tiene actividad "in vitro" en las tres fracciones de cerebro de rata controles (FI, FII y FIII) se valoró la actividad ATPásica total y en la FIII la fosfodiesterasa. Ambas valoraciones se realizaron de un modo análogo a las ya expuestas, con la diferencia de que a los medios de reacción se añadieron diferentes concentraciones de somatostatina.

Se partió de una concentración de somatostatina de 122 μ M en salino. De ésta, se hicieron diluciones seriadas 1:100, añadiéndose 5 μ l por tubo, para obtener las concentraciones finales de 6.1×10^{-6} , 6.1×10^{-7} , 6.1×10^{-8} , 6.1×10^{-9} , 6.1×10^{-10} , 6.1×10^{-11} y 6.1×10^{-12} M. El cero se obtuvo añadiendo 5 μ l de salino.

Como ya hemos dicho, salvo esta excepción, el resto de las valoraciones fueron semejantes a las ya explicadas.

3. ESTUDIOS EN CELULAS

3.1. CULTIVO DE CELULAS GH₄C₁

Las células GH₄C₁ mantenidas en cultivo, son una sublínea celular de las células GH (Tashjian y cols., 1968), procedentes de tumores de hipófisis de rata, que surgieron de un modo espontáneo durante un cultivo masivo de células GH₃ en 1970 (Tashjian y cols., 1970).

3.1.1. Cultivo celular. Condiciones de cultivo y medio

Las células GH₄C₁ utilizadas en nuestros experimentos procedían del Departamento de Biología Celular del Baylor College of Medicine, Houston Texas (USA).

Una vez recibidas en nuestro Departamento se mantuvieron creciendo en un incubador celular, Forma-scientific, a 37°C, en atmósfera de 5% CO₂, 95% aire, y saturación de vapor de agua.

El medio de cultivo empleado fue el Ham F-10 (L-glutamina, bicarbonato sódico) (Sigma), suplementado con:

- Bicarbonato sódico 1,2 g/l
- Mezcla Penicilina-Streptomicina (Sigma)
(50000 µl/ml 15000 µg/ml) 5 ml/l
- Anfotericina B (ER Squibb Sons) 0,5 ml/l
- Suero bovino fetal (BSF) (Sigma) 5%

El pH se ajustó a 7,2

Las células se sembraron en frascos de plástico estériles de 75 cm² (Costar), con 20 ml de medio completo, que se renovó cada 4-5 días.

Los procesos de sembrado y cambio de medio, así como la parte experimental que lo permitía, se realizaron en una cámara de flujo laminar, marca Telstar.

3.2. TRATAMIENTO CON SOMATOSTATINA

Para preparar la solución de somatostatina se pesaron 0.25 mg de esta hormona, y se llevaron a 1.25 ml con medio de cultivo estéril, que no contenía anfotericina ni suero bovino fetal. Se congeló a -80°C para su posterior uso.

En el día del ensayo la solución stock de somatostatina (20 $\mu\text{g}/100 \mu\text{l}$), se descongeló y a partir de ella se prepararon tres concentraciones diferentes: 1 μM , 0.1 μM y 0.01 μM , en el mismo medio.

Las células se mantuvieron creciendo en el incubador, con cambios de medio cada 4-5 días, hasta que se obtuvo una concentración celular confluyente.

En el día del experimento se siguió el siguiente protocolo: cada botella de células se lavó dos veces con medio estéril, sin anfotericina ni suero bovino fetal, para retirar el suero del medio en que estaban creciendo. Se añadió 10 ml del medio que contenía las diferentes concentraciones de somatostatina (1 μM , 0.1 μM , 0.01 μM y 0 μM), se agitaron suavemente y se introdujeron en el incubador durante 30 min. Pasado este tiempo, se sacaron y se retiró el medio. A partir de este momento, el resto del proceso se realizó en baño de hielo. A continuación se lavaron dos veces con 5 ml de un tampón que contenía: Tris 50 mM, KCl 25 mM, MgCl_2 2 mM y CaCl_2 1 mM, pH 7.4 (TKMC-stock). Finalmente, se añadieron 5 ml del mismo tampón y los frascos se agitaron vigorosamente para despegar las células, que se recogieron en tubos de ensayo de 10 ml. Estos se centrifugaron durante 10 min a 3000 rpm, para concentrar las células, y el precipitado se resuspendió en

500 μ l del tampón TKMC-stosk. Por último, se sonicaron y se guardaron congeladas a -80°C , hasta su posterior utilización.

3.3. VALORACION DE PROTEINAS

Se ha empleado el método colorimétrico de Bradford (1976), por considerarlo más sensible que el de Lowry.

a. Fundamento

Es un ensayo de unión a un colorante, que se basa en el cambio de color diferencial de éste en respuesta a distintas concentraciones de proteína. El colorante empleado es el azul brillante de Coomassie G-250 cuya absorbancia máxima, en una solución ácida, varía desde 465 nm hasta 595 nm cuando se une a una proteína.

El coeficiente de extinción del complejo colorante-albúmina es constante en un amplio rango de concentración. Así, la ley de Lambert-Beer puede ser aplicada para la cuantificación precisa de las proteínas.

b. Reactivos

- Solución concentrada de proteínas; albúmina sérica bovina (BSA), al 5% en agua destilada.
- Tritón X-100 (Sigma) al 0.1%
- Solución de Tris 10 mM
- Solución de Azul brillante de Coomassie (Bio-Rad Protein Assay) (Bradford), diluida 1:4 con agua destilada.

c. Metodología

La curva estándar se preparó de la siguiente manera: la solución concentrada de albúmina serica bovina (BSA) preparada al 5% se diluyó 1:50 con agua destilada, quedando a una concentración final de 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, y a partir de ésta se hicieron diluciones seriadas 1:2 en Tris 10 mM de las que se tomaron 50 μl , de modo que las cantidades de proteína de la curva en μgramos fueron: 25, 12.5, 6.25, 3.125 y 1.5625. Todos los puntos de la curva se hicieron por duplicado.

Las muestras problemas, que se valoraron igualmente por duplicado, se prepararon pipeteando 10 μl de la muestra y completando hasta 50 μl con Tris 10 mM.

Tanto a los tubos de la estándar como a los de muestra, se les añadió 50 μl de la solución de Tritón X-100, se agitaron y se les añadió 1 ml del reactivo de Bradford volviéndolos a agitar. Se dejaron en reposo durante 50 min. para que se desarrollara el color, y se realizaron las lecturas correspondientes a las densidades ópticas, en un espectrofotómetro Shimadzu, modelo MPS-2000, a una longitud de onda de 595 nm.

Los tubos "blancos", cuya actividad se restó de las muestras problemas, se prepararon pipeteando 50 μl de Tris 10 mM a los que se añadió 50 μl de Tritón X-100 y 1 ml del reactivo de Bradford, midiéndose igual que el resto de los tubos.

La representación gráfica de las densidades ópticas frente a las distintas concentraciones de la solución de BSA utilizadas, dió siempre una línea recta que pasa por el origen y cuyo coeficiente de regresión lineal fue en todos los casos de 0.99. Sobre esta recta se llevaron los valores de densidad óptica de las muestras problemas, y se obtuvieron los valores correspondientes de μg de proteína que contenían las muestras a valorar.

3.4. VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc

3.4.1. Homogenados

La actividad fosfodiesterasa de GMPc se determinó por el método anteriormente descrito (Materiales y Métodos, 2,8).

De igual modo, las valoraciones se realizaron en tres situaciones:

- a) en presencia de CaCl_2 y Calmodulina
- b) en presencia de CaCl_2
- c) en presencia de EGTA

Los reactivos empleados fueron los mismos y en igual concentración. La actividad enzimática se expresó en nmoles de GMPc hidrolizados por min y por mg de proteína.

3.4.2. Adición en ensayo

De igual modo que en los experimentos con ratas, quisimos comprobar el efecto de la somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa cuando era añadida al homogenado de células.

Se utilizaron células GH_4C_1 controles, es decir, sin tratar con somatostatina, y se valoró en ellas la actividad fosfodiesterasa añadiendo al medio de incubación del ensayo la hormona en las mismas concentraciones que se utilizaron "in vivo", es decir; 1, 0.1 y 0.01 μM .

En este caso se valoró la situación experimental a), con CaCl_2 , y el resto fue semejante al ensayo general.

4. CALCULOS ESTADISTICOS

Para cada serie de valores de un mismo grupo experimental, se calculó el valor de la media y del error estándar:

$$\text{Media} = \bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^{i=n} x_i$$

$$\text{Error estándar (ES)} = \sqrt{\frac{S^2}{n}}$$

siendo; x = valor de cada dato

n = número de datos del grupo

S^2 = varianza

La comparación entre dos grupos se realizó siguiendo el test de significación de Student;

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\text{error estándar de la diferencia}}$$

siendo \bar{x} e \bar{y} las medias de los datos de cada grupo,

$$\text{error estándar de la diferencia} = \sqrt{\frac{1}{n_1} + \frac{1}{n_2}} \sqrt{\frac{\sum (\bar{x} - x)^2 + \sum (\bar{y} - y)^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

siendo $(n_1 + n_2 - 2)$ el número de grados de libertad,

Por medio de unas tablas de doble entrada ("t" y el número de grados de libertad) se llegó al valor de "p" o probabilidad de que los grupos que se estudian pertenezcan a la misma población.

Los datos que aparentemente se alejaban del grupo se comprobaron si pertenecían al mismo mediante un test Chi-cuadrado (Yamane, 1970), hallando el intervalo:

$$\bar{x} \pm \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \chi^2$$

siendo χ^2 el factor que se halla en una tabla de doble entrada (número de datos del grupo y número de datos a eliminar). Si el dato o datos considerados caían fuera de este intervalo se consideró que no pertenecían a la población estudiada. Una vez eliminado el dato se calculó de nuevo la media y el error estándar de la nueva población.

Cuando en el apartado de Resultados representemos en histogramas, gráficas o tablas, valores calculados con estos parámetros estadísticos, aparecerá el signo (*) que corresponde a:

* $p < 0,05$ diferencia significativa respecto al grupo control
 ** $p < 0,01$ " muy " " " " "
 *** $p < 0,001$ " altamente " " " " "

mientras que NS representa $p > 0,05$, no significativa.

Así mismo, los números que aparecen entre paréntesis equivalen al número de animales estudiados en cada caso.

III. RESULTADOS

1. FRACCIONAMIENTO SUBCELULAR DE LOS HOMOGENADOS DE ADENOHIPOFISIS Y CEREBRO DE RATA; ESTUDIO DEL GRADO DE PUREZA DE LAS FRACCIONES SUBCELULARES OBTENIDAS.

Utilizando los dos procedimientos de centrifugación diferencial esquematizados en las figuras 3 y 4 del apartado Materiales y Métodos, se obtuvieron las siguientes fracciones subcelulares de adenohipófisis y cerebro de rata. Adenohipófisis: fracción I (FI, sobte. 20000 x g), fracción II (FII, ppdo. 12000 x g), fracción III (FIII, sobte. 45000 x g), y fracción IV (FIV, ppdo. 45000 x g). Cerebro: fracción I (FI, sobte. 20000 x g), fracción II (FII, ppdo. 12000 x g), y fracción III (FIII, sobte. 12000 x g).

Para comprobar el grado de purificación obtenido en las fracciones subcelulares se determinó la distribución en ellas de distintos marcadores enzimáticos. Como enzima marcadora de membrana plasmática se utilizó la 5' mononucleotidasa, para la fracción mitocondrial se empleó la glutamato deshidrogenasa, y la lactato deshidrogenasa para la fracción citosólica. Las enzimas marcadoras se midieron en todas las fracciones subcelulares.

Los resultados se muestran en las tablas 1 y 2:

a) adenohipófisis (tabla 1): la máxima actividad lactato deshidrogenasa (citosol) se presentó en la fracción III, con una despreciable distribución (< 7%) en las restantes fracciones. La enzima glutamato deshidrogenasa (mitocondrias) presentó, así mismo, su máxima actividad en la fracción II, con poca distribución en las restantes fracciones (< 20%). Por último, respecto a la 5' mononucleotidasa (membrana plasmática), la fracción más pura fué la FI, por lo que debe considerarse formada esencialmente por membranas plasmáticas, aunque la actividad enzimática era mayor en la fracción II, que, por tanto, debe considerarse como una mezcla de membranas y mitocondrias.

b) cerebro (tabla 2); la máxima actividad lactato deshidrogenasa se presentó en la fracción III, con una distribución del 11% en la fracción II, y del 19% en la fracción I. La glutamato deshidrogenasa presentó su máxima actividad en la fracción II, con una presencia del 28% en la fracción I, y del 12% en la fracción III. Y la 5' mononucleotidasa dió su valor máximo en la fracción I, con un 36% de distribución en la fracción II, y un 24% en la fracción III.

TABLA 1

DISTRIBUCION DE ENZIMAS MARCADORAS EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES
DE CEREBRO DE RATA

Fracción	Lactato deshidrogenasa (U/mg)	Glutamato deshidrogenasa (mU/mg)	5' mono- nucleotidasa (mU/mg)
I	0.12	7.7	38.50
II	0.068	27	14.08
III	0.606	3.3	9.16

TABLA 2

DISTRIBUCION DE ENZIMAS MARCADORAS EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES
DE HIPOFISIS DE RATA

Fracción	Lactato deshidrogenasa (U/mg)	Glutamato deshidrogenasa (mU/mg)	5' mono- nucleotidasa (mU/mg)
I	0.044	2.52	10.72
II	0.012	9.67	25.69
III	0.720	1.93	2.60
IV	0.049	1.59	1.78

2. ESTUDIO DE ACTIVIDADES ATPásicas EN CEREBRO Y ADENOHIPOFISIS DE RATA

2.1. RESULTADOS EN CEREBRO

Los resultados que a continuación se exponen se refieren al estudio de tres actividades ATPásicas valoradas en las siguientes fracciones subcelulares de cerebro: fracción I, fracción II y fracción III.

2.1.1. Actividad ATPasa total; efecto de la somatostatina

Esta actividad se determinó en presencia de diversos cationes (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , ...) y ausencia de cualquier tipo de inhibidores de ATPasas, por lo que representa una mezcla de todas las actividades ATPásicas.

En las figuras 7, 8 y 9 se presentan los resultados obtenidos al valorar dicha actividad en las tres fracciones de cerebro y el efecto que sobre ellas produce la somatostatina.

La figura 7 corresponde a la valoración realizada en la fracción I y, como puede observarse, esta actividad se encontraba significativamente inhibida ($p < 0,001$) a los 5 min de la administración de somatostatina, inhibición que no se observó a los 10 y 15 min de inyección.

En la fracción II (fig. 8), el efecto de la somatostatina fué diferente, ya que se inhibió la actividad ATPásica de un modo significativo en los grupos tratados 10 y 15 minutos ($p < 0,001$ y $p < 0,05$, respectivamente), y aunque disminuyó también en el grupo tratado 5 min, ésta disminución no llegó a ser significativa respecto a los controles.

Por el contrario, en la fracción III (fig. 9) la hormona no produjo ningún efecto, permaneciendo los valores de la actividad ATPásica de los tres grupos tratados cercanos a los valores controles.

2.1.2. Actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}): efecto de la somatostatina

Para la valoración de esta actividad, además de los cationes anteriormente mencionados en la ATPasa total se incluyeron dos inhibidores; la azida sódica que inhibe la ATPasa mitocondrial, y la ouabaina inhibidor de la ATPasa (Na^+ - K^+), y el quelante de calcio EGTA.

Esta actividad se determinó sustrayendo a la actividad ATPasa en presencia de Ca^{2+} y Mg^{2+} la actividad en presencia de sólo Mg^{2+} .

Los resultados de la valoración de esta actividad y el efecto que sobre ella produce la somatostatina, se representan en las gráficas 10, 11 y 12.

La actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) presentó los valores más altos en la fracción I, y como puede observarse en la figura 10, la somatostatina inhibió significativamente esta actividad a todos los tiempos. El mayor efecto se produjo en el grupo tratado 5 min ($p < 0,001$), disminuyendo su efecto de un modo progresivo en los otros dos grupos (10 y 15 min), aunque existen diferencias estadísticamente significativas respecto a los controles ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente).

En la fracción II (fig. 11), la actividad ATPásica también fué inhibida por la somatostatina de un modo significativo a todos los tiempos. En los grupos tratados 5 y 10 minutos, fué donde se produjo la mayor inhibición ($p < 0,01$).

La fracción III (fig. 12) fué la que presentó menor actividad ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}), y en ella la somatostatina afectó la actividad

enzimática única y significativamente en el grupo tratado 5 minutos ($p < 0.05$).

2.1.3. Actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$); efecto de la somatostatina

Esta actividad medida en presencia de los mismos cationes e inhibidores que la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) se determinó sustrayendo a los valores obtenidos en ausencia de ouabaina los encontrados en su presencia.

La fracción I (fig. 13), como era de esperar, presentó los valores más altos. La somatostatina no produjo efecto significativo sobre esta actividad enzimática a ninguno de los tiempos de su administración.

En la fracción II (fig. 14) se obtuvo también actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), hecho esperado a raíz de los resultados obtenidos con los marcadores enzimáticos (36% de actividad 5' mononucleotidasa). La somatostatina tampoco afectó la actividad enzimática en esta fracción. Por último, señalar que en la fracción III no se obtuvieron valores medibles de esta actividad.

2.1.4. Efecto de la incubación "in vitro" con somatostatina sobre la actividad ATPasa total.

En las tres fracciones subcelulares del cerebro se ensayó la actividad ATPásica total en un pool de ocho ratas controles para cada fracción, incluyendo distintas concentraciones de somatostatina (6.1×10^{-12} M... 6.1×10^{-6} M) en el medio de ensayo.

Como puede observarse en la figura 15, en ninguna fracción hubo efecto de la hormona administrada "in vitro", a ninguna de las concentraciones empleadas. La actividad se representó en % del valor control, que fué el obtenido en ausencia de somatostatina.

FIGURA 7

EFEECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa TOTAL
EN LA FRACCION I DE CEREBRO

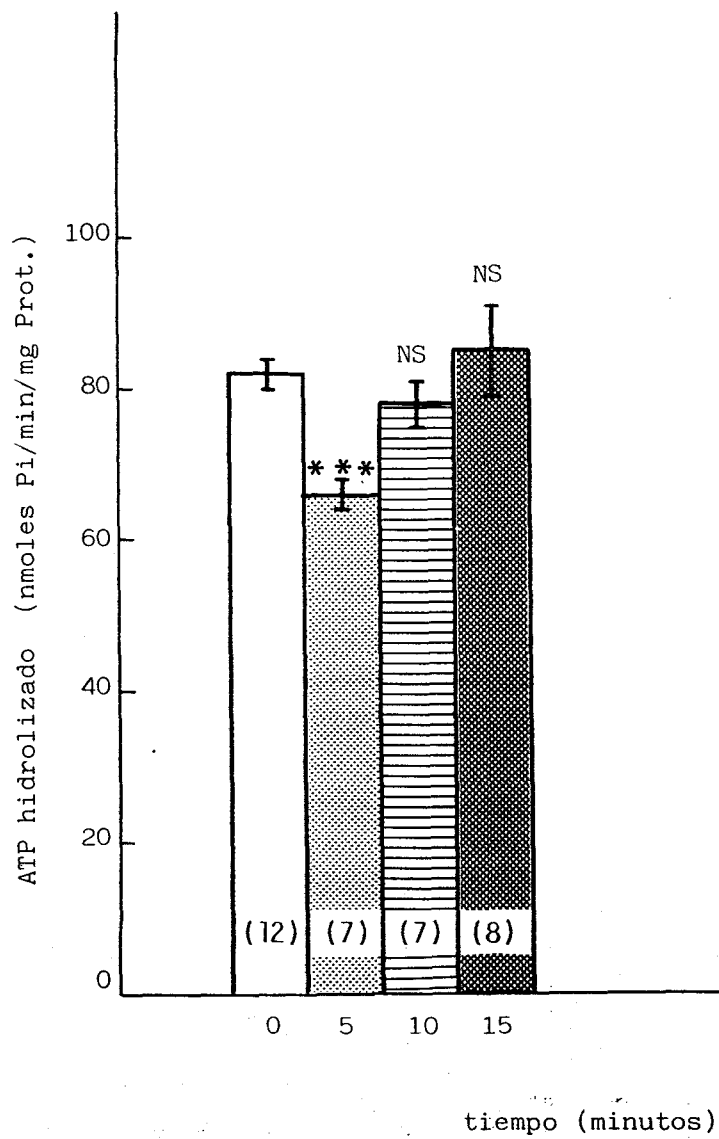


FIGURA 8

EFEECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa TOTAL
EN LA FRACCION II DE CEREBRO

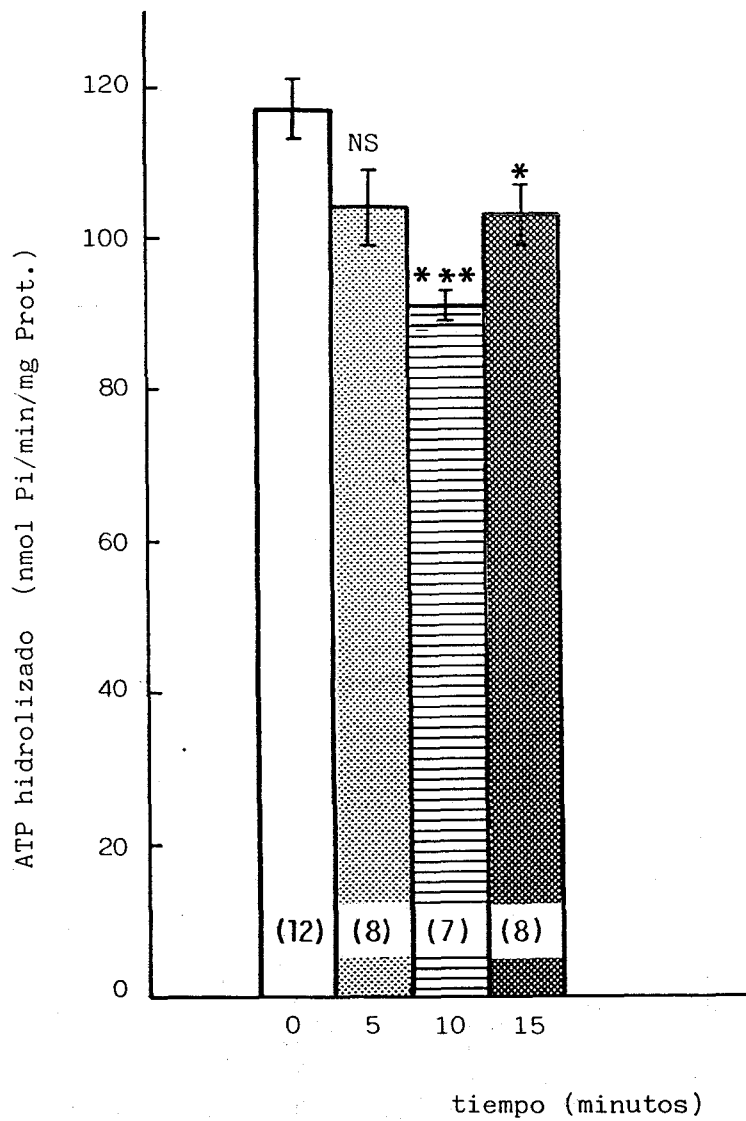


FIGURA 9

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa TOTAL
EN LA FRACCION II DE CEREBRO

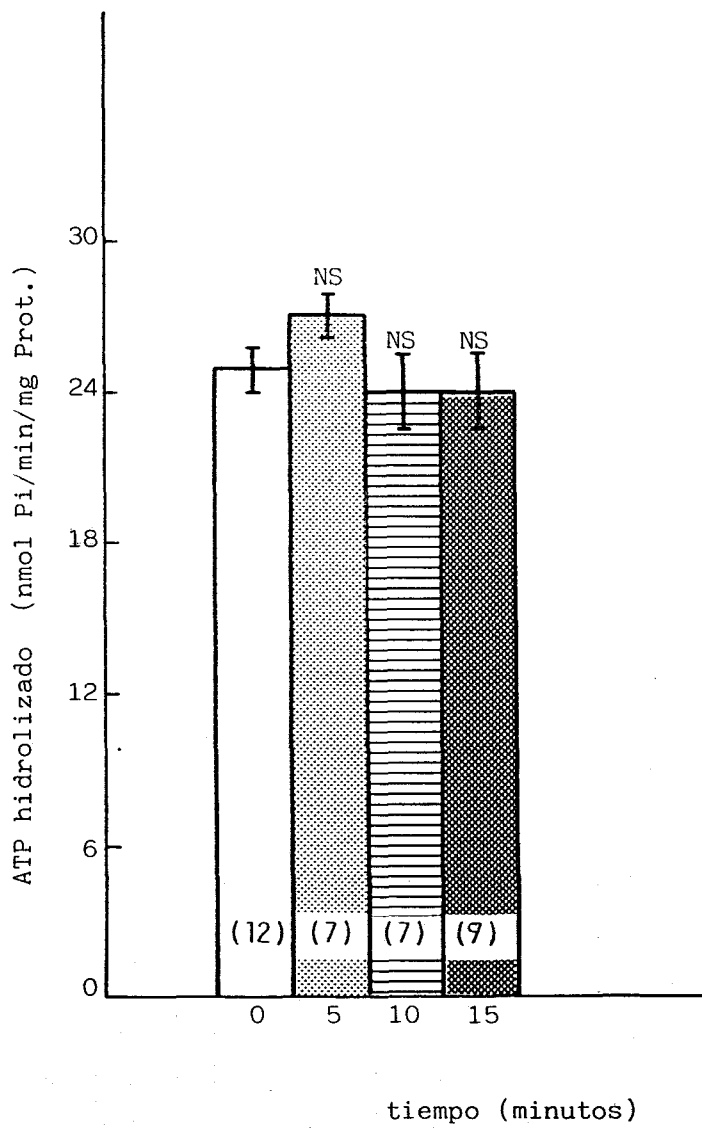


FIGURA 10

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+})
EN LA FRACCION I DE CEREBRO

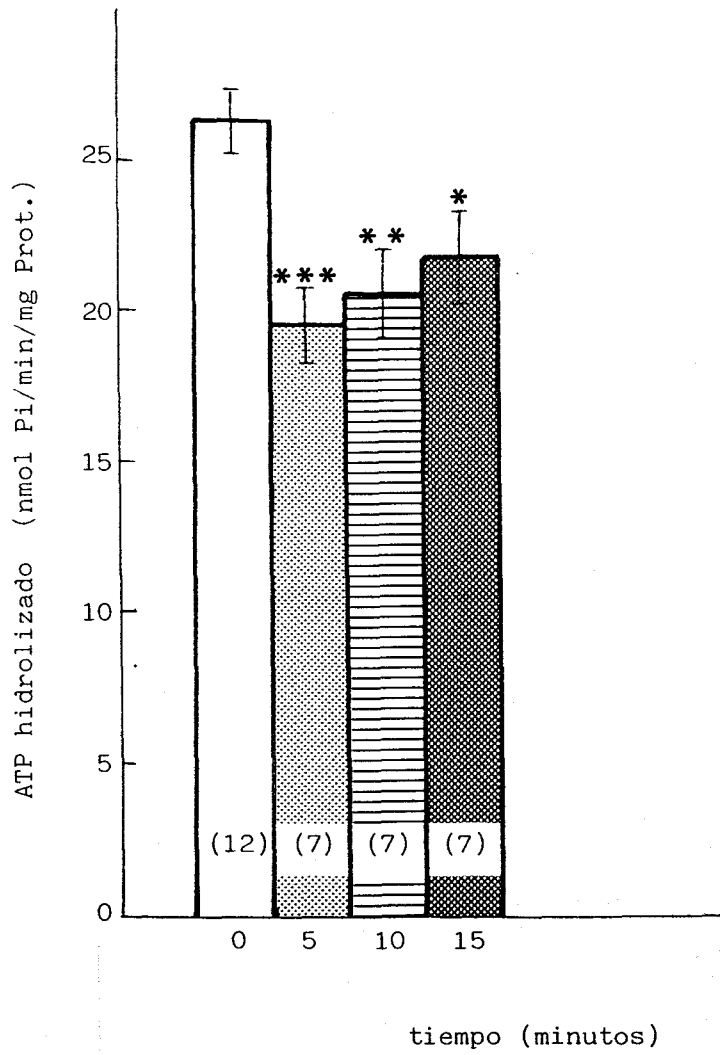


FIGURA 11

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+})
EN LA FRACCION II DE CEREBRO

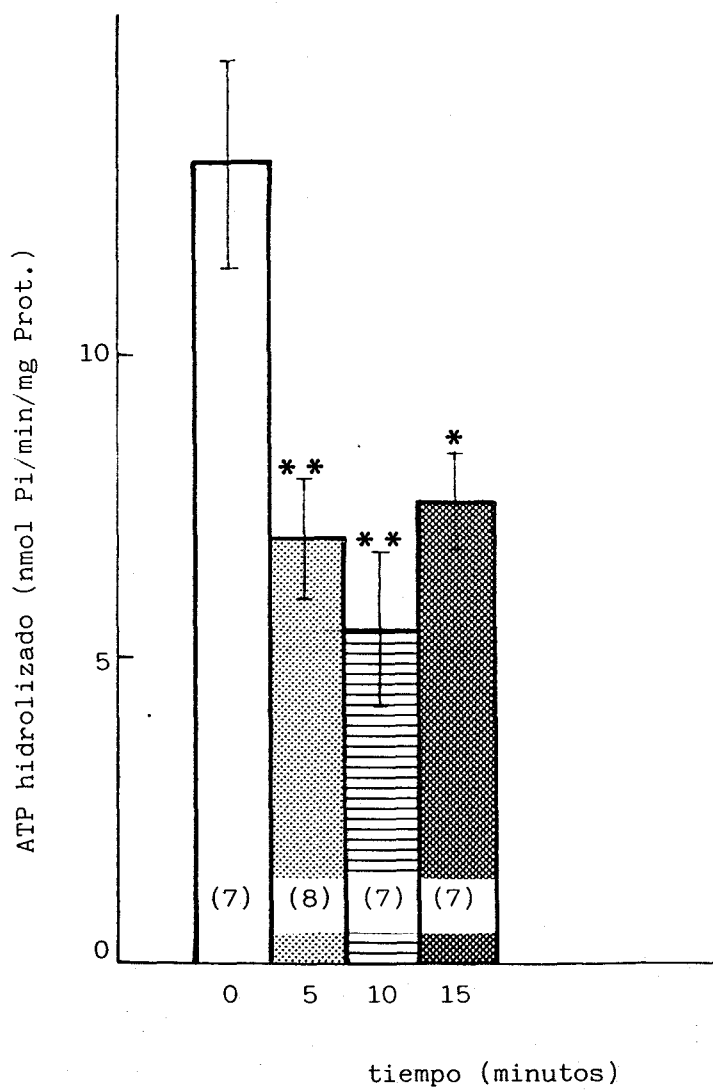


FIGURA 12

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+})
EN LA FRACCION III DE CEREBRO

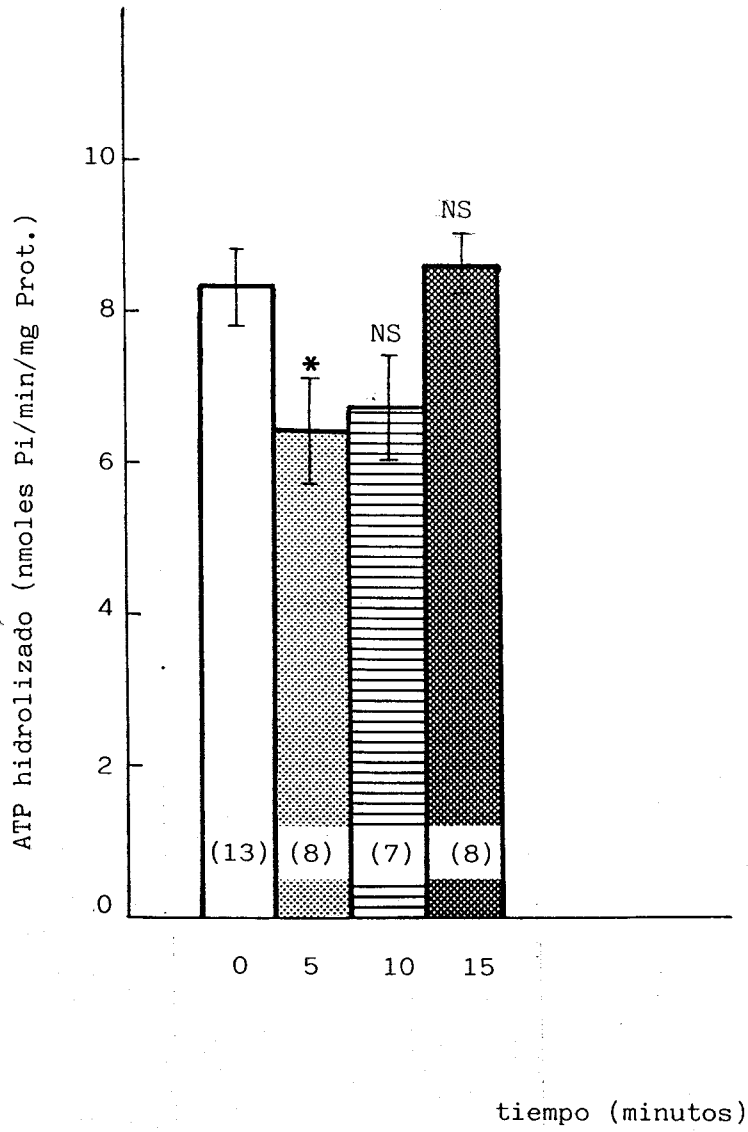


FIGURA 13

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)
EN LA FRACCION I DE CEREBRO

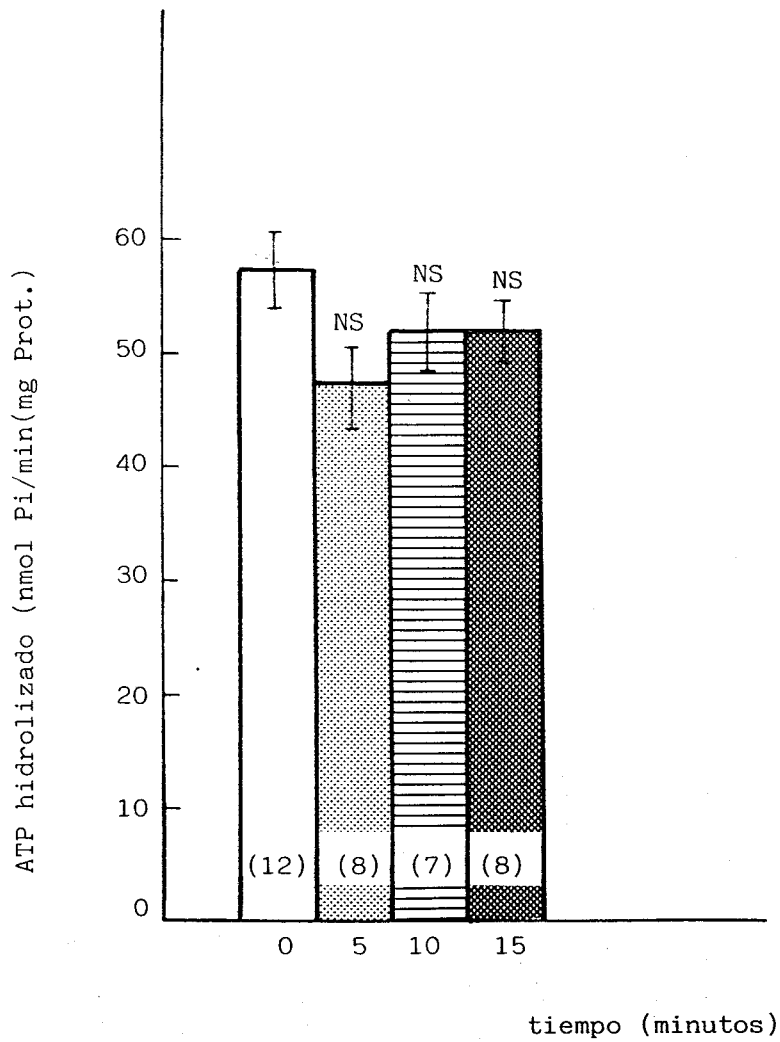


FIGURA 14

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$)
EN LA FRACCION II DE CEREBRO

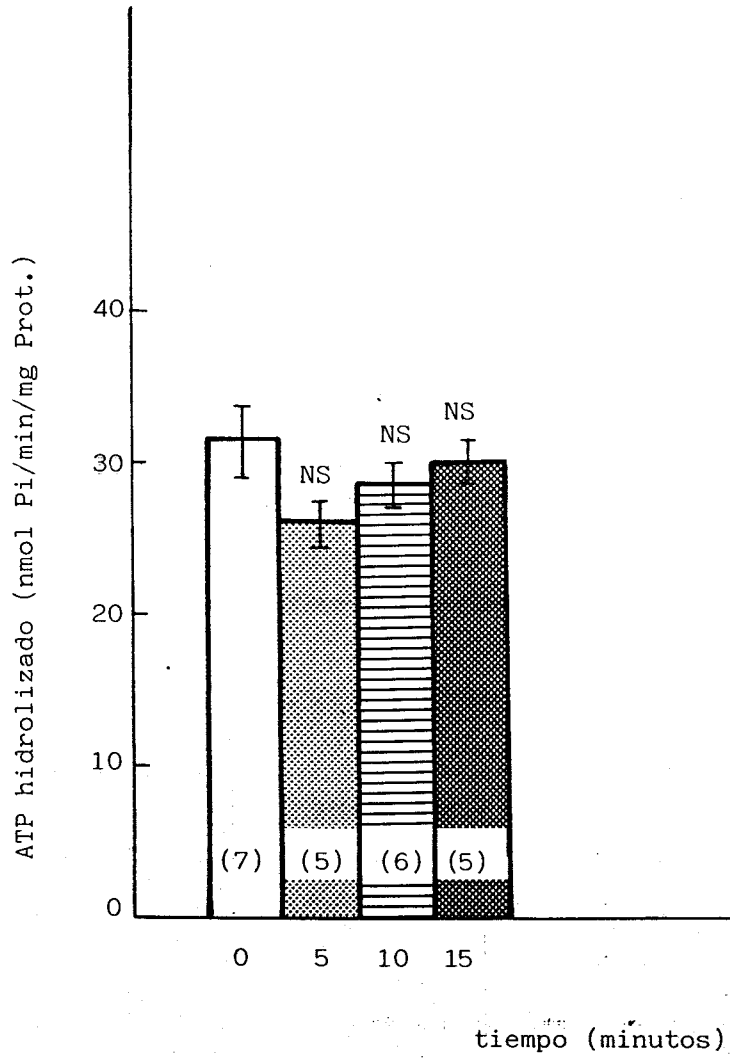
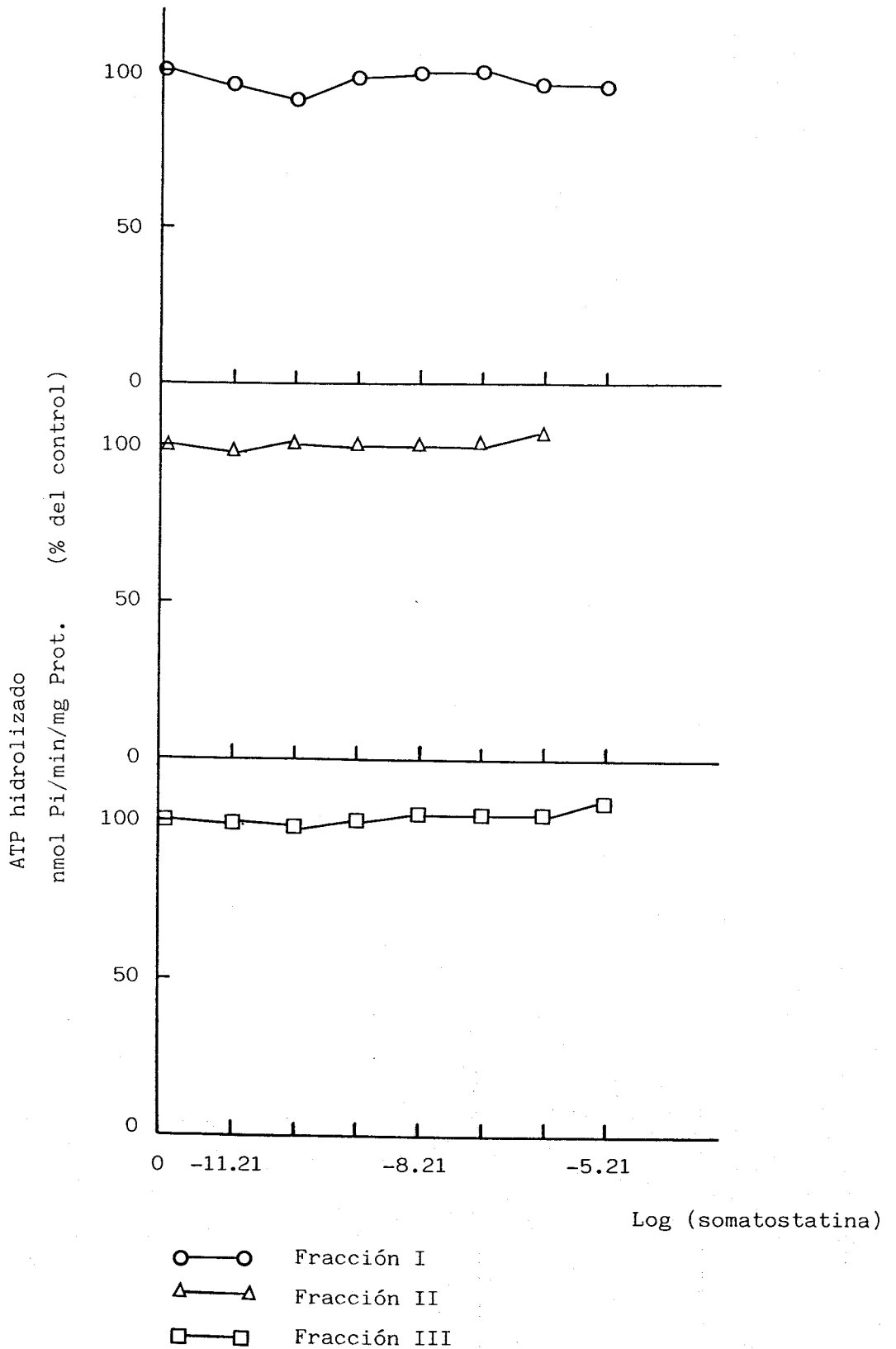


FIGURA 15

EFEECTO DE LA INCUBACION "IN VITRO" CON SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa TOTAL EN LAS FRACCIONES I, II Y III DE CEREBRO



2.2. RESULTADOS EN ADENOHIPOFISIS

En esta glándula hubo que tener en cuenta que el tampón de homogeneizar la adenohipófisis antes de someterla a centrifugación diferencial (TKMC "stock": Tris 50 mM, KCl 25 mM, MgCl₂ 2 mM, CaCl₂ 1 mM en 0,5 M sacarosa) iba a proporcionar una determinada concentración iónica, presente en todas las fracciones subcelulares a ensayar. Con lo cual hubo que ajustar dichas concentraciones para obtener las condiciones finales señaladas en Materiales y Métodos.

Los inhibidores empleados fueron los mismos que para las ATPasas de cerebro (azida sódica y ouabaina). La actividad ATPásica se valoró por el método radiométrico explicado en Materiales y Métodos. Se escogió este método por ser más sensible que el colorimétrico y poder así utilizar menos cantidad de tejido, factor éste, limitante en el caso de la adenohipófisis.

En todos los ensayos la actividad se expresó en nanomoles de γ -³²P por minuto y por mg de proteína.

2.2.1. Actividad ATPasa total; efecto de la somatostatina

Esta actividad se determinó en las fracciones subcelulares; FI, FII y FIV. La fracción que presentó mayor actividad fué la FI, siguiéndole en orden decreciente la FII y la FIV.

El efecto de la hormona en términos generales puede decirse que fué inhibitor para las tres fracciones.

En la fracción I (fig. 16) la somatostatina inhibió significativamente la actividad de la enzima en todos los grupos tratados. La mayor inhibición ($p < 0,001$) se produjo en el grupo tratado 5 min.

En la figura 17, puede observarse que la somatostatina también inhibió la actividad ATPásica a todos los tiempos en la FII, aunque esta actividad no fué significativa en el grupo tratado 5 min.

Por último, el efecto que la somatostatina produjo en la fracción IV (fig. 18) fué de nuevo significativamente inhibitor en todos los grupos tratados, produciéndose como en la fracción I la mayor inhibición en el grupo tratado 5 min ($p < 0,01$).

2.2.2. Actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$): efecto de la somatostatina

Esta actividad enzimática que se determinó, de igual manera que para las fracciones de cerebro, por sustracción de los valores obtenidos en presencia de magnesio y ausencia de calcio a los obtenidos en presencia de calcio y magnesio, se valoró en las mismas tres fracciones que la actividad ATPasa total (FI, FII y FIV).

De nuevo podemos decir en términos generales que el efecto de la somatostatina fué inhibitor en las tres fracciones. En la fracción I que, como era de esperar, presentó los valores más altos de actividad (fig. 19), la inhibición producida por la hormona fué significativa en todos los grupos tratados, permaneciendo en todos ellos constante ($p < 0,05$).

El efecto de la somatostatina sobre la actividad ATPásica en la fracción II (fig. 20) fué significativo en los grupos tratados 10 y 15 min, siendo en este último grupo donde se produjo la mayor inhibición ($p < 0,01$).

Y, por último, en la figura 21, puede observarse el efecto producido por la hormona en la fracción IV que fué como para la fracción anterior (FII), significativo en los grupos tratados 10 y 15 min de un modo similar en ambos grupos ($p < 0,05$).

FIGURA 16

EFEECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa TOTAL
EN LA FRACCION I DE ADENOHIPOFISIS

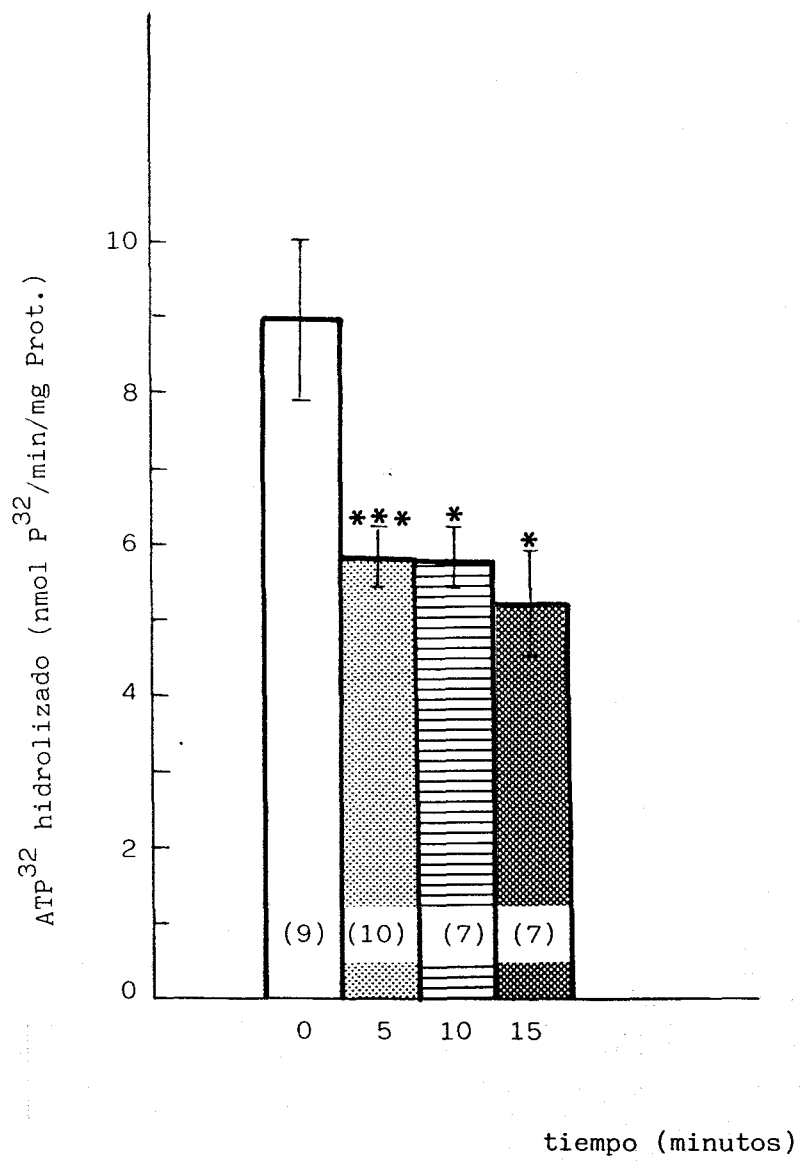


FIGURA 17

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa TOTAL
EN LA FRACCION II DE ADENOHIPOFISIS

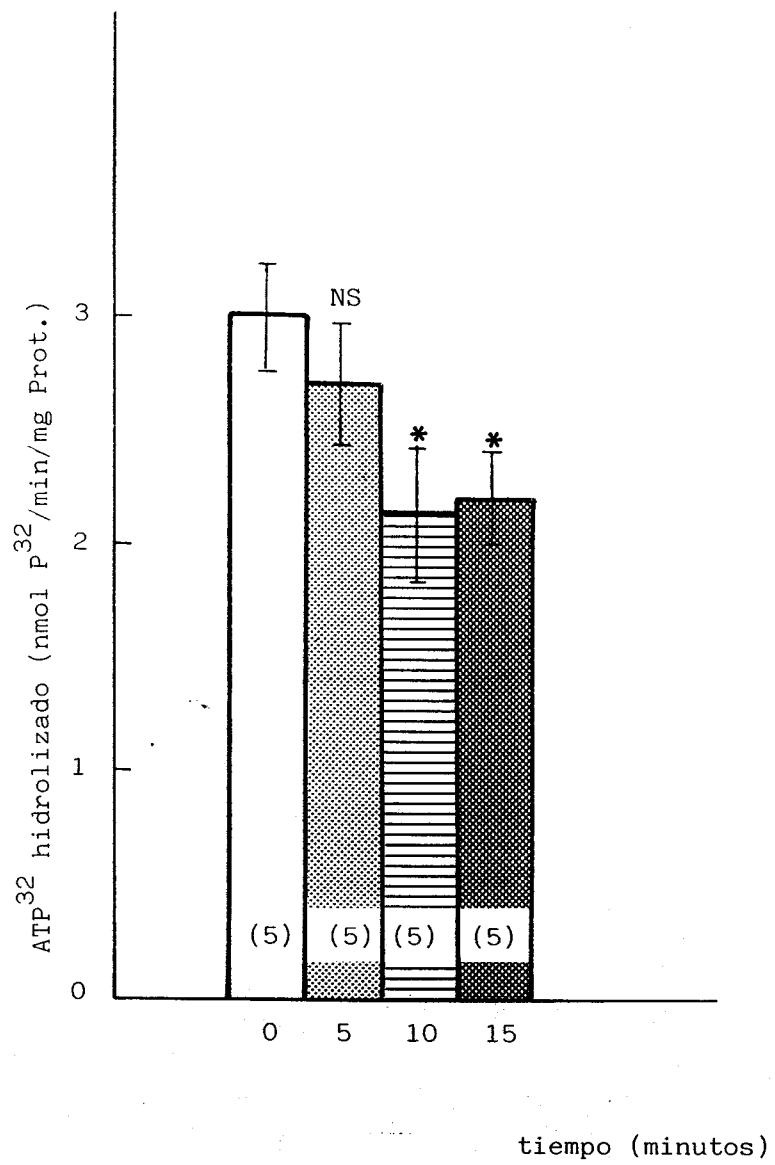


FIGURA 18

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa TOTAL
EN LA FRACCION IV DE ADENOHIPOFISIS

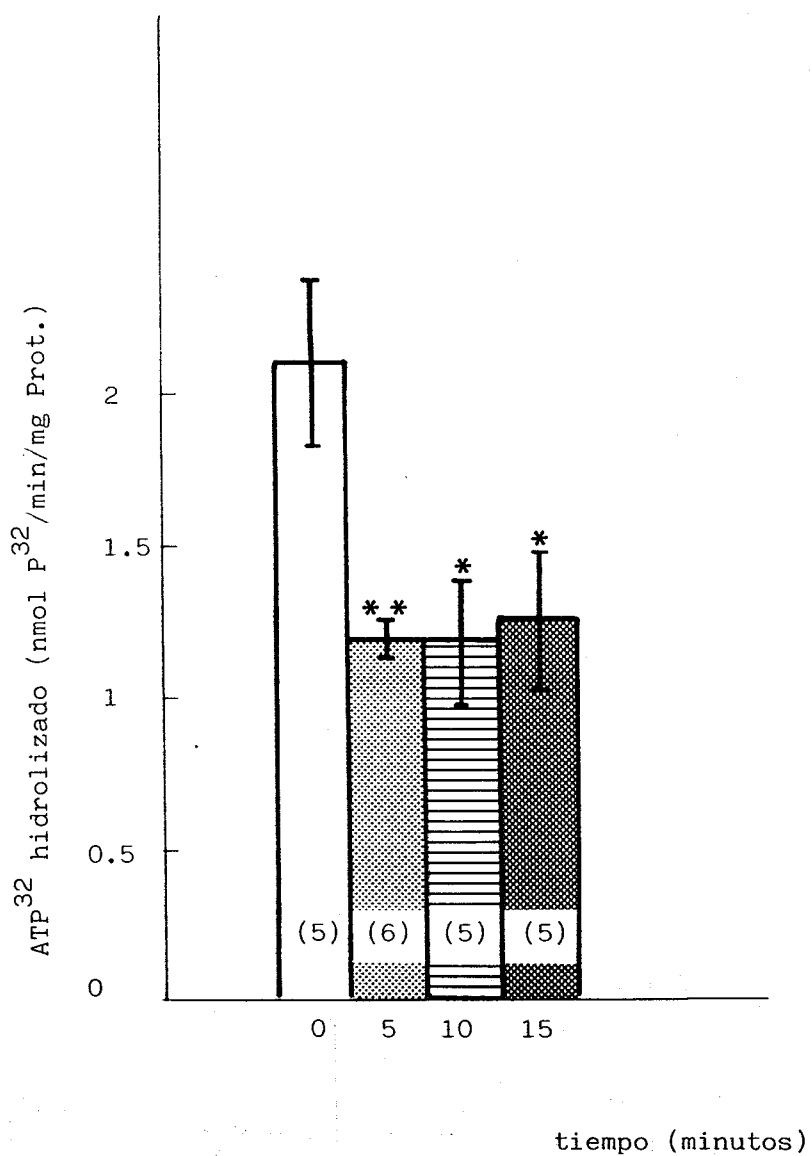


FIGURA 19

EFEECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+})
EN LA FRACCION I DE ADENOHIPOFISIS

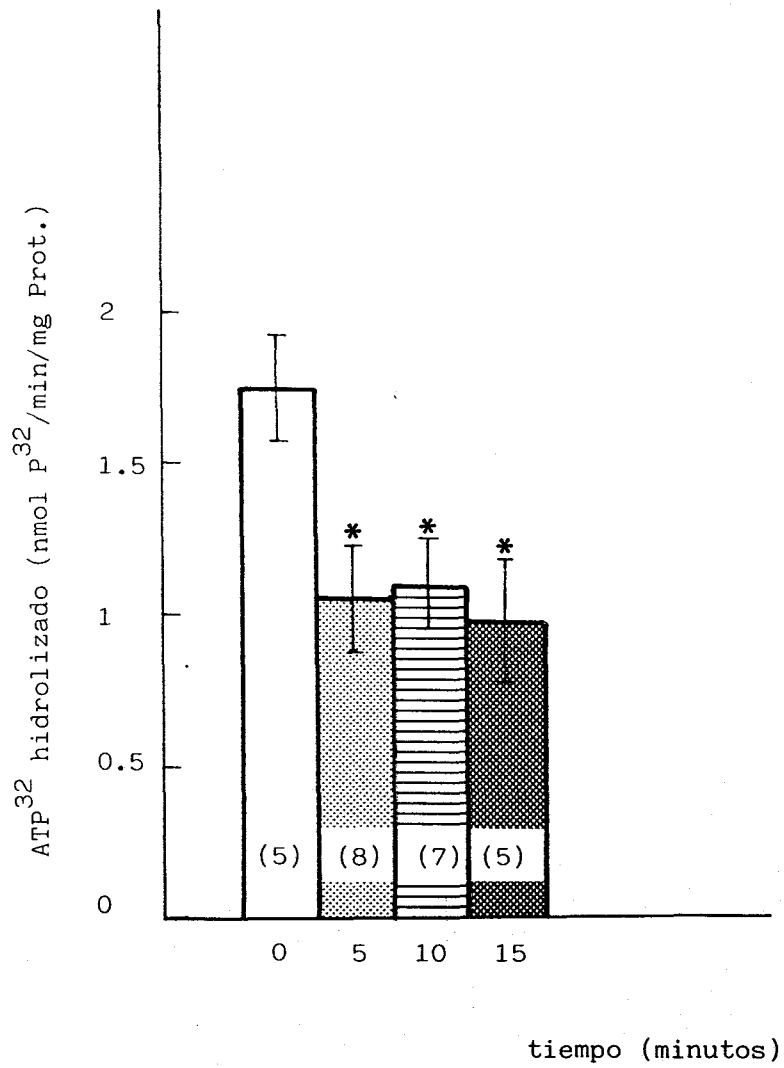


FIGURA 20

EFEECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+})
EN LA FRACCION II DE ADENOHIPOFISIS

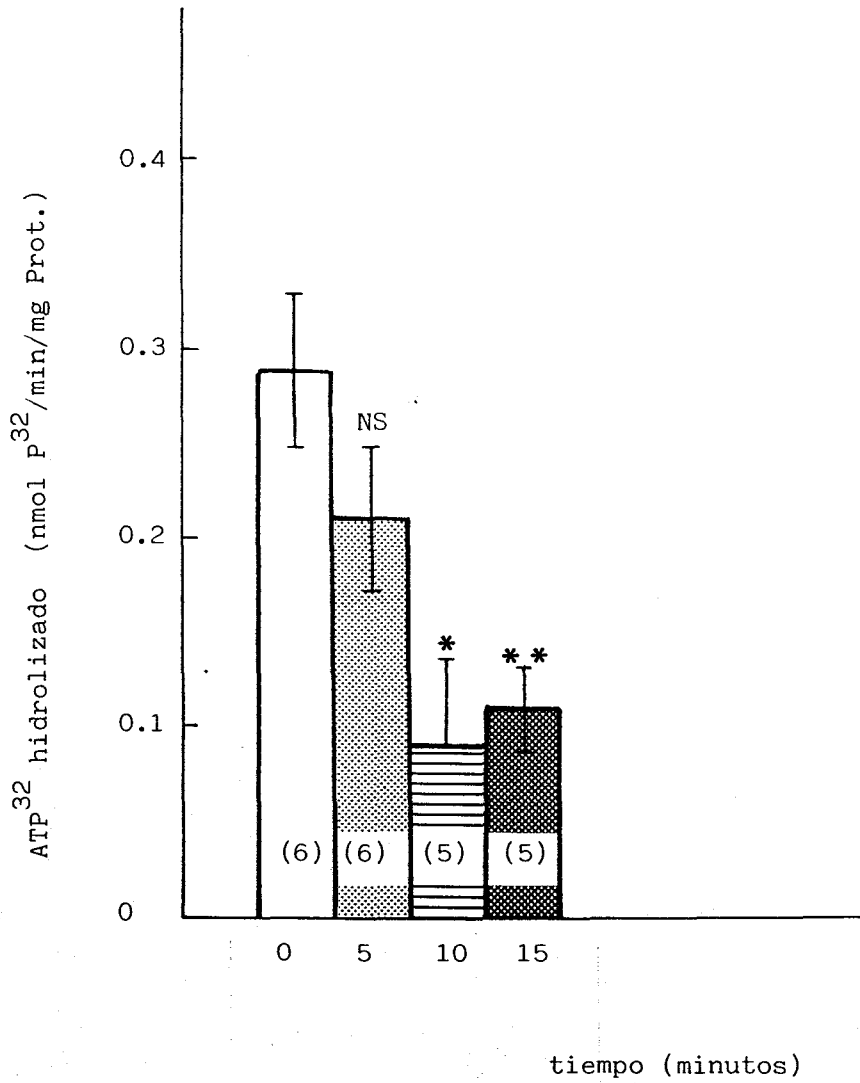
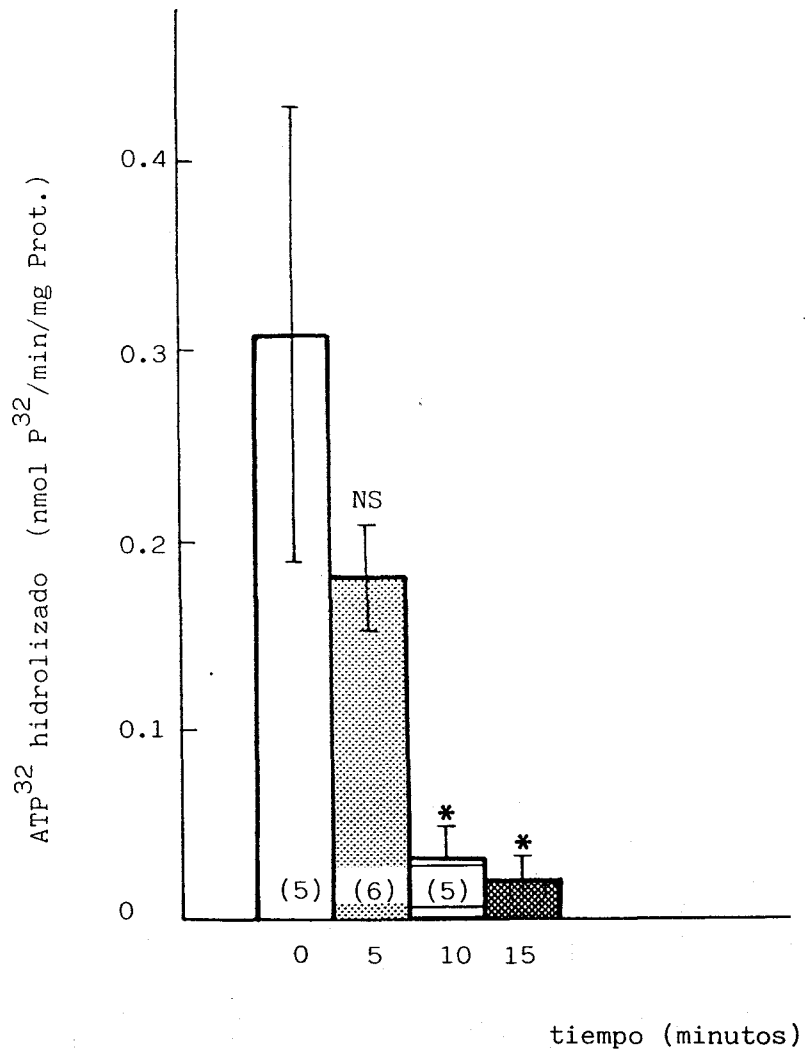


FIGURA 21

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+})
EN LA FRACCION IV DE ADENOHIPOFISIS



3. ESTUDIO DE OTRAS ACTIVIDADES HIDROLITICAS DE ATP

Una vez estudiadas las actividades ATPásicas mencionadas se procedió a estudiar la posible existencia de actividad ADPasa y/o apirasa en las fracciones subcelulares de cerebro (FI, FII y FIII).

3.1. RESULTADOS DE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA CON DI- Y TRIFOSFONUCLEOTIDOS

En primer lugar, se valoró la hidrólisis de nucleósidos di- ó tri-fosfato. Los sustratos empleados fueron el ATP y el ADP (5 mM, en ambos casos), y la hidrólisis existente en presencia de calcio (Cl_2Ca 5 mM para ATP y 2,5 mM para ADP) se determinó midiendo colorimétricamente el fosfato liberado, según el método de Serrano (1978) descrito en Materiales y Métodos.

Los resultados se muestran en la tabla 3, y los valores representados, expresados en nanomoles de Pi liberado por minuto y por mg de proteína, corresponden a la media aritmética de tres ensayos diferentes llevados a cabo cada uno de ellos con una población de al menos siete individuos controles.

Como puede observarse en la mencionada tabla, en las tres fracciones valoradas se observó actividad ADP hidrolítica estimulable por calcio, representando aproximadamente un 31, 35 y 79 % de la actividad ATP hidrolítica en las fracciones FI, FII y FIII, respectivamente.

Del mismo modo realizado anteriormente, se determinó el efecto que la somatostatina producía en dichas actividades (hidrólisis de ADP y ATP) en las tres fracciones subcelulares estudiadas. Los resultados se expresaron así mismo, como nanomoles de Pi por minuto y por mg de

proteína. Y se representaron como % del valor obtenido en los grupos controles, es decir, en grupos no tratados con hormonas.

Estos datos se muestran en las figuras 22, 23, y 24. En la fracción I (fig. 22) la somatostatina produjo una inhibición de la actividad hidrolítica con ambos sustratos (ATP y ADP) en el grupo tratado 5 min que fué estadísticamente significativa ($p < 0,01$).

El efecto que la hormona produjo en la fracción II (fig. 23), fué también inhibitor. En este caso, se produjo una inhibición significativa en el grupo tratado 10 min con somatostatina ($p < 0,05$) y de nuevo ocurrió con ambos sustratos (ATP y ADP).

Y por último, en la fracción III (fig. 24), la somatostatina no afectó significativamente a ninguno de los grupos tratados, ya fuera ATP o ADP el sustrato empleado.

3.2. INHIBICION POR TRIFLUOPERAZINA

La dependencia de calmodulina de las actividades enzimáticas anteriormente estudiadas se determinó en los grupos controles de las tres fracciones subcelulares de cerebro. Para ello se incubó en presencia de distintas concentraciones de trifluoperazina, antagonista de la calmodulina que inhibe los enzimas dependientes. Las concentraciones empleadas fueron: 0,125, 0,25, 0,5 y 1 mM. Los resultados expresados como nanomoles de Pi liberado por minuto y por mg de proteína se exponen en las figuras 25, 26 y 27.

La figura 25 corresponde a la fracción I, y en ella se representa la actividad hidrolítica (ATP y ADP) en presencia de las distintas concentraciones de trifluoperazina. Una concentración de 0,125 mM produjo una inhibición del 50% en la hidrólisis del ATP, y esta misma inhibición se obtuvo con 0,5 mM de trifluoperazina cuando fué el ADP el sustrato empleado.

En la fracción II (fig. 26), la inhibición del 50% de la actividad hidrolítica se alcanzó con concentraciones inferiores a la menor empleada (0,125 mM), con ambos sustratos. Alcanzándose antes, dicha inhibición con el ATP.

En la fracción III (fig. 27), la inhibición del 50% de la actividad hidrolítica se produjo a una concentración de 0,25 mM con ambos sustratos.

3.3. ACTIVIDAD ADENILATO QUINASA

Para excluir la posibilidad de que la actividad hidrolítica con ADP medida anteriormente, se debiera a la formación de ATP a partir de dos moléculas de ADP y posterior hidrólisis de aquel por acción de una adenilato quinasa existente en las fracciones subcelulares valoradas, se volvió a determinar la actividad hidrolítica con ADP como sustrato en presencia de 20 μ M de diadenosilpentafosfato (Ap₅'A), un inhibidor específico de dicha enzima.

Los resultados se muestran en las figuras 28, 29 y 30 y corresponden a la actividad ADP hidrolítica más/menos trifluoperazina (0, 0,125, 0,25 y 0,5 mM), más/menos Ap₅'A, valorada en los grupos controles.

Como puede observarse en las mencionadas figuras, en las tres fracciones valoradas (FI-fig.28, FII-fig.29, FIII-fig.30) la actividad hidrolítica medida corresponde al ADP, ya que los valores obtenidos en presencia del inhibidor de la adenilato quinasa son semejantes a los obtenidos en su ausencia.

3.4. ACTIVIDAD ATP Y ADP HIDROLITICA, INHIBICION POR AZIDA

Cuando la actividad ATPasa de las tres fracciones subcelulares de cerebro se determinó por ambos métodos (colorimétrico e isotópico) los resultados fueron muy diferentes. Como puede observarse en la tabla 4, la actividad ATPasa obtenida por el método isotópico fué un 61% (FI), 63% (FII) y 52% (FIII) de la actividad determinada por el método colorimétrico. Estas diferencias podrían ser explicadas por la presencia, en esas fracciones, de una segunda enzima capaz de hidrolizar el producto de la reacción de la ATPasa, es decir, el ADP.

Cuando se utilizó ADP como sustrato en lugar de ATP, se encontró actividad de hidrólisis de ADP en todas las fracciones (tabla 4). Como puede observarse en dicha tabla, los valores obtenidos con ADP se ajustan muy bien con las diferencias de actividades obtenidas al medir la hidrólisis del ATP por los dos métodos empleados.

Estas mismas valoraciones realizadas, se repitieron en presencia de AZIDA (10 mM), la cual inhibe la actividad ADPásica. La hidrólisis del ADP resultó inhibida en un 20% (FI), 30% (FII) y 40% (FIII) de su actividad.

La mayor inhibición de la actividad ADPásica por AZIDA se presentó en la FIII, quien a su vez presentó una mayor relación hidrólisis de ADP a hidrólisis de ATP (medida por el método isotópico).

Como puede observarse, en la misma tabla, también resultaron inhibidas en presencia de AZIDA la actividad hidrolítica del ATP, medida por ambos métodos.

TABLA 3

ACTIVIDAD ATP- Y ADP-HIDROLITICA EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES
DE CEREBRO

FRACCION	NUCLEOTIDO	ACTIVIDAD HIDROLITICA	
		nmoles P _i /min/mg Prot.	Actividad relativa (%)
I	ATP	63.53 ± 6.8	100
	ADP	20.03 ± 2.3	31
II	ATP	68.16 ± 1.4	100
	ADP	24.30 ± 1.6	36
III	ATP	21.33 ± 0.5	100
	ADP	16.80 ± 1.1	79

FIGURA 22

EFEECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA CON DI- Y TRIFOSFONUCLEOTIDOS EN LA FRACCION I DE CEREBRO

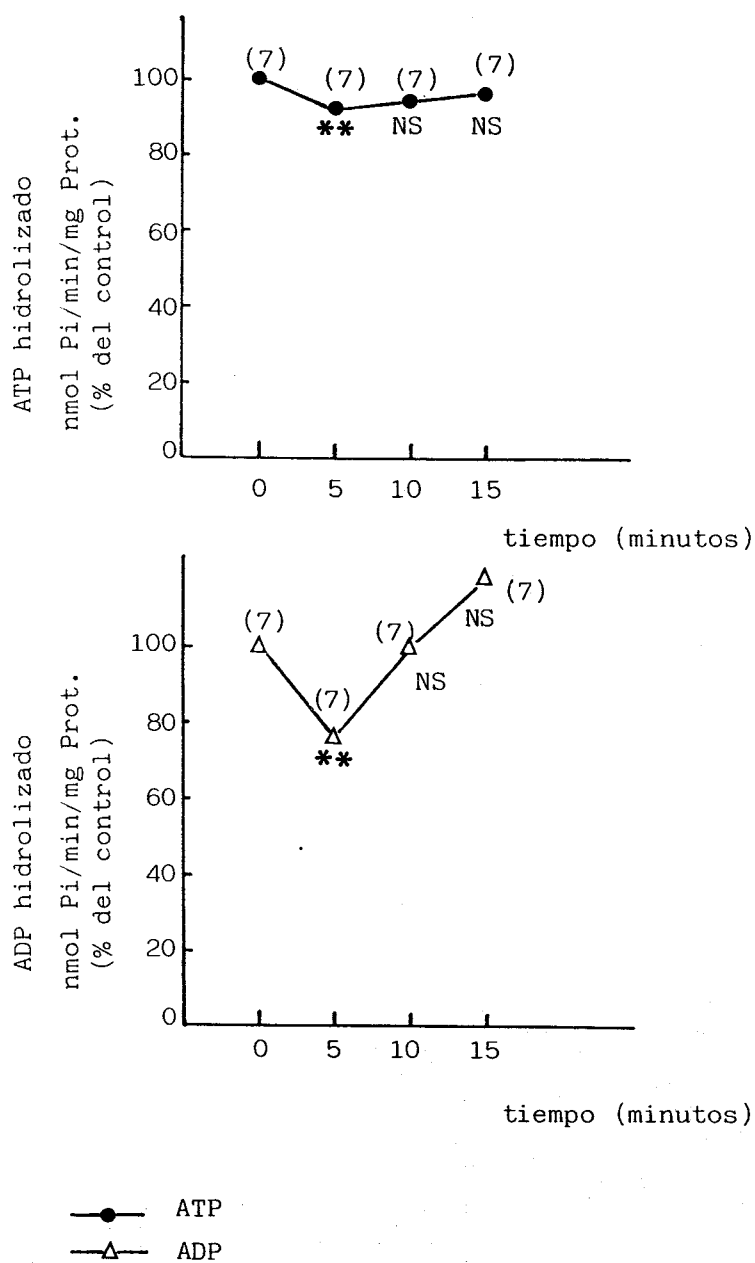
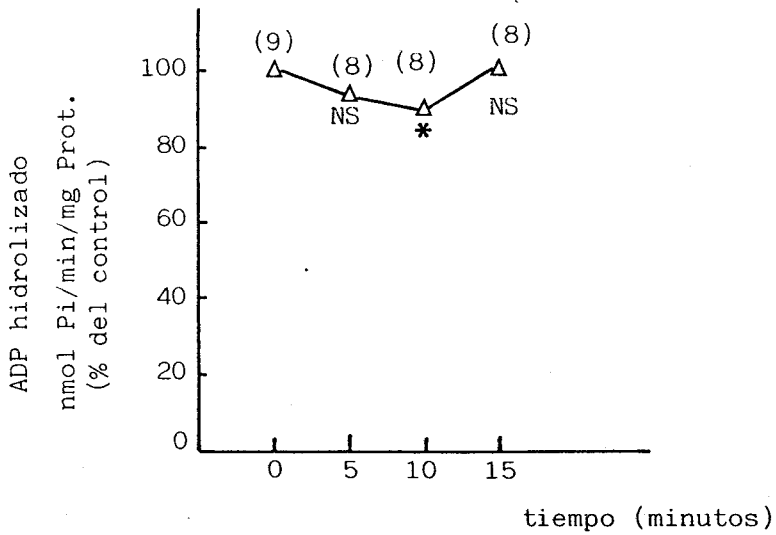
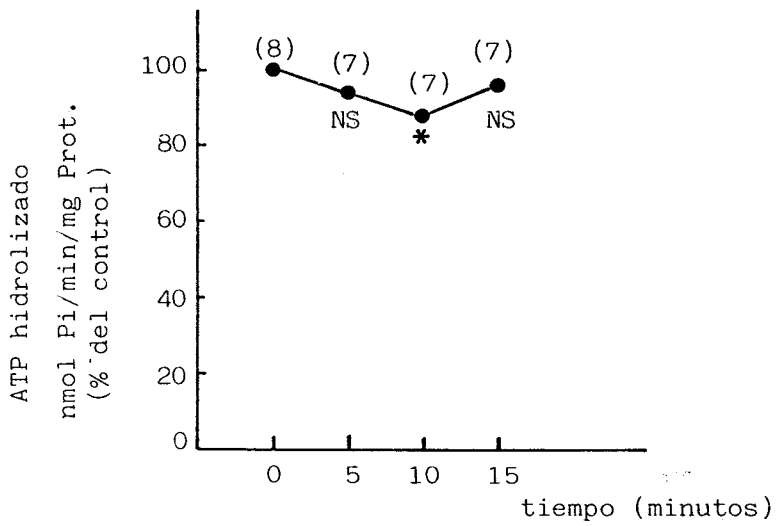


FIGURA 23

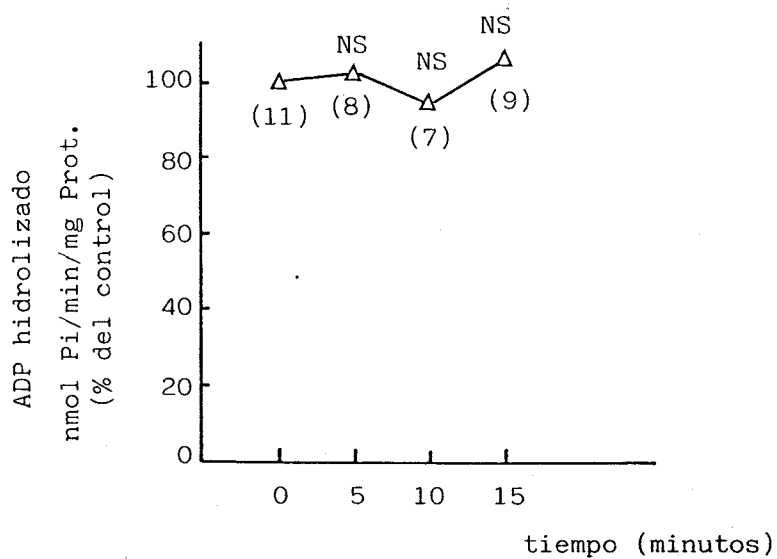
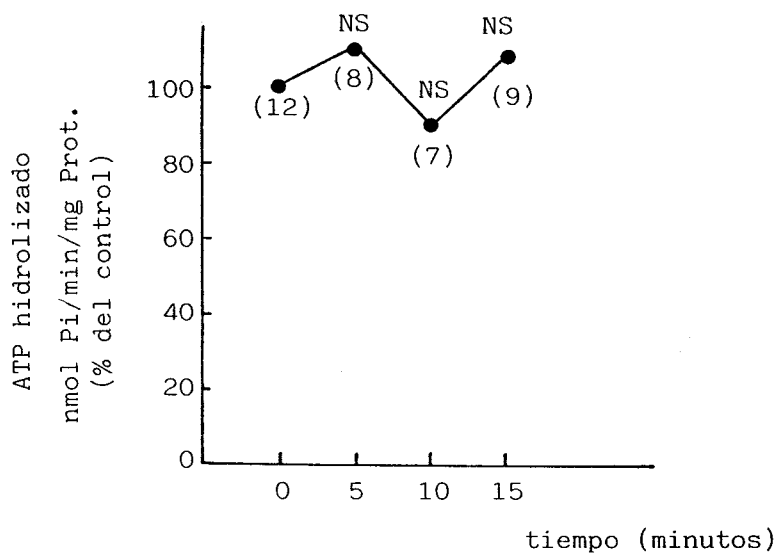
EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA CON DI- Y TRIFOSFONUCLEOTIDOS EN LA FRACCION II DE CEREBRO



● ATP
△ ADP

FIGURA 24

EFEECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD HIDROLITICA CON
DI- Y TRIFOSFONUCLEOTIDO EN LA FRACCION III DE CEREBRO



● ATP
△ ADP

FIGURA 25

EFEECTO DE LA TRIFLUOPERAZINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATP- Y ADPásica
EN LA FRACCION I DE CEREBRO

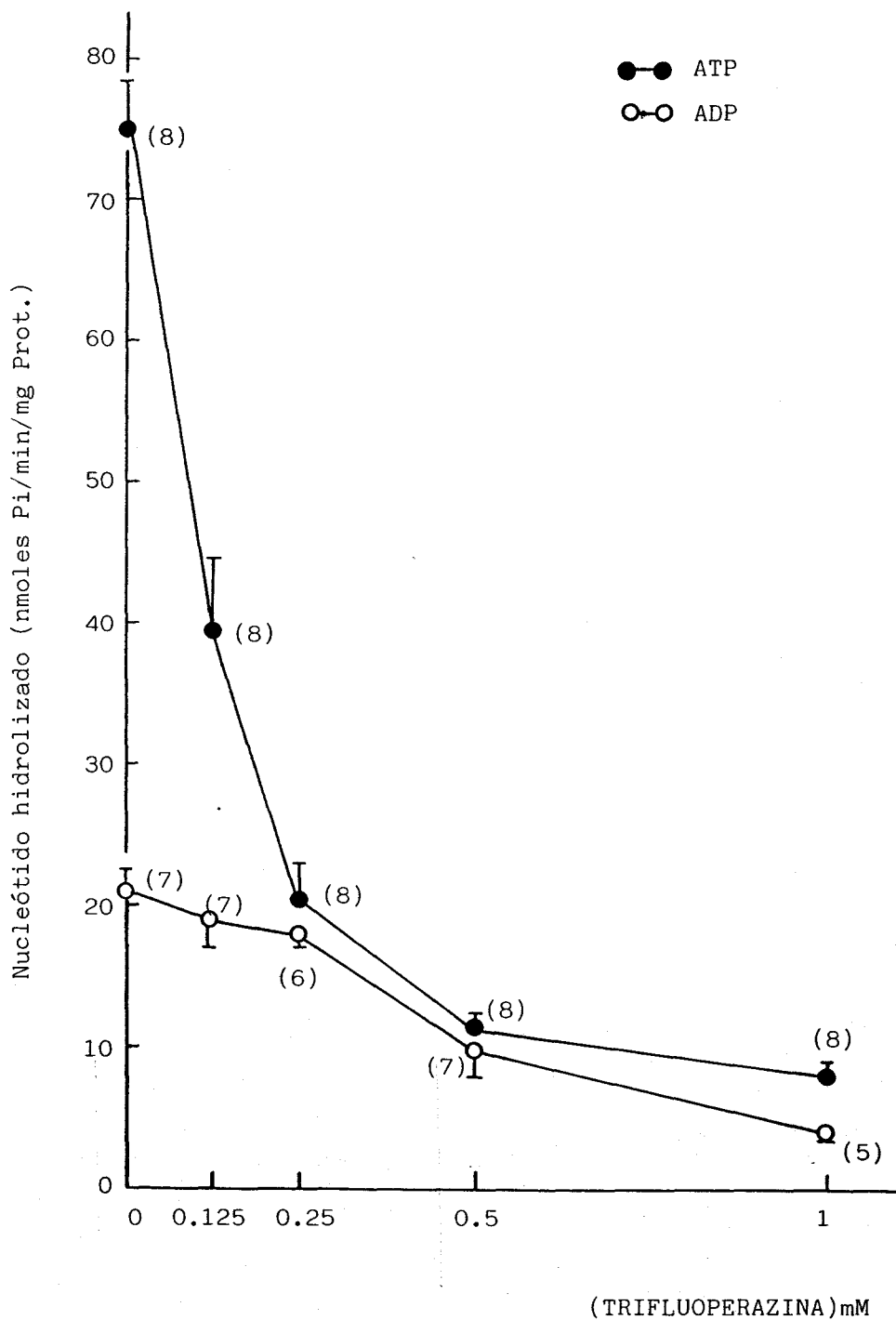


FIGURA 26

EFFECTO DE LA TRIFLUOPERAZINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATP- Y ADPásica
EN LA FRACCION II DE CEREBRO

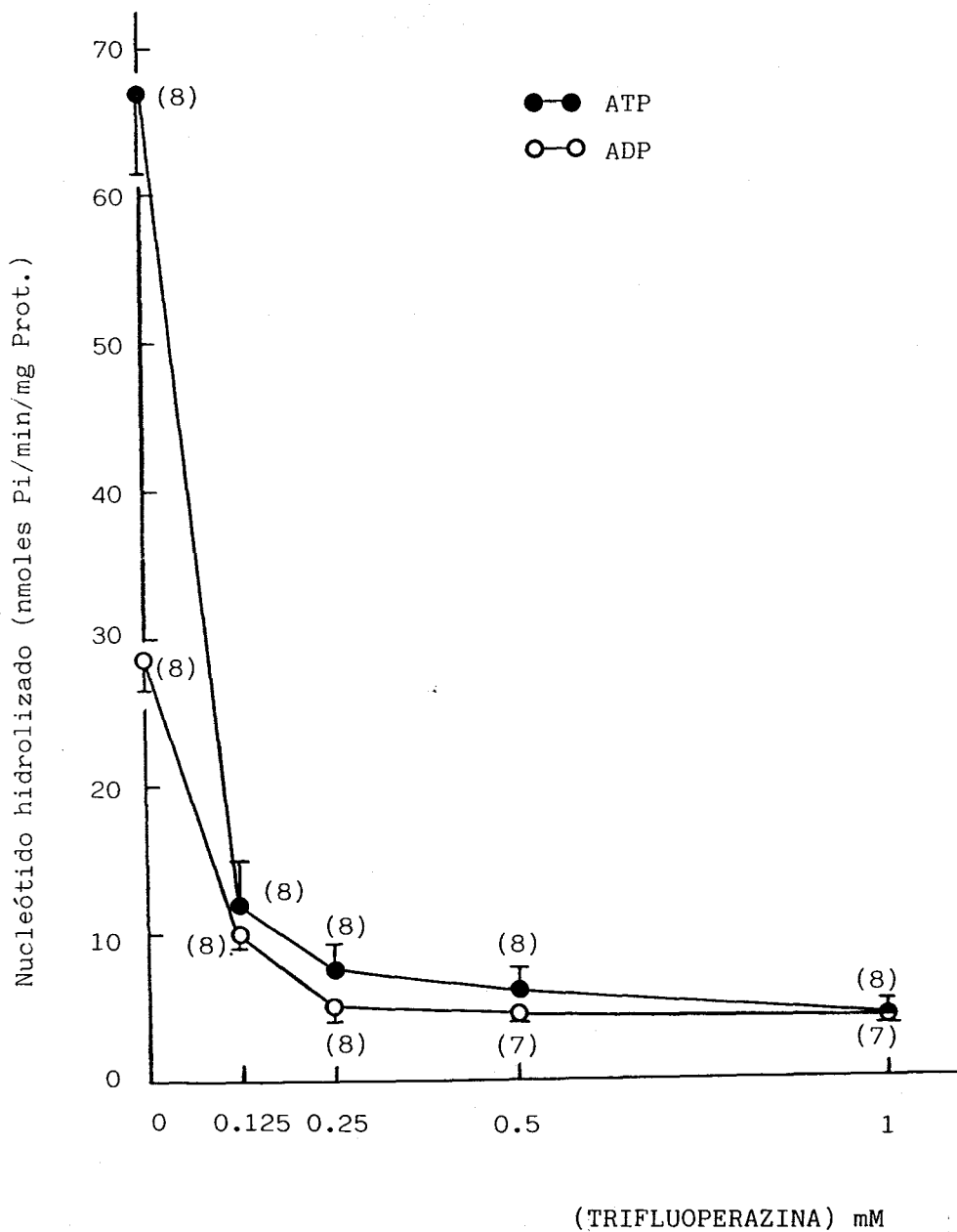


FIGURA 27

EFEECTO DE LA TRIFLUOPERAZINA SOBRE LA ACTIVIDAD ATP- Y ADPásica
EN LA FRACCION III DE CEREBRO

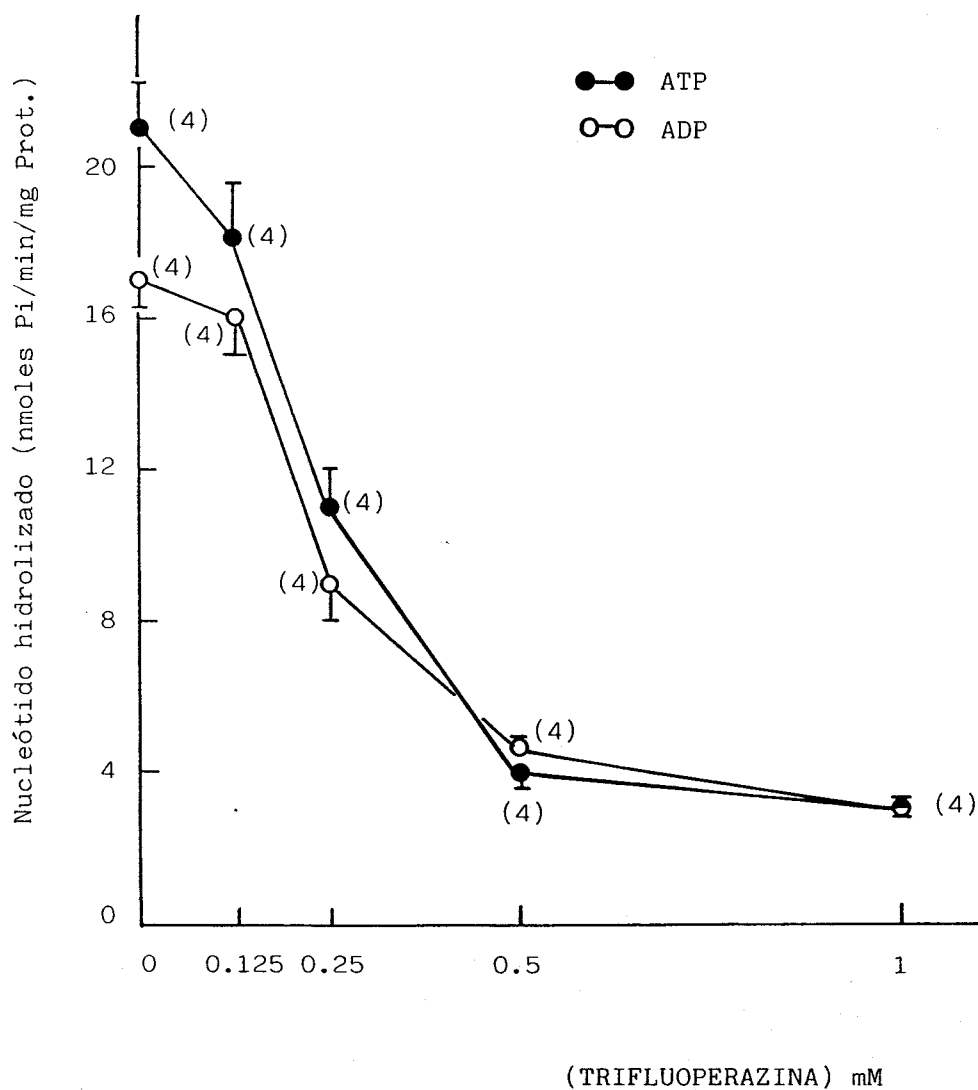


FIGURA 28

EFFECTO DEL Ap5'A SOBRE LA HIDROLISIS DE ADP EN PRESENCIA DE DISTINTAS
CONCENTRACIONES DE TRIFLUOPERAZINA, EN LA FRACCION I DE CEREBRO

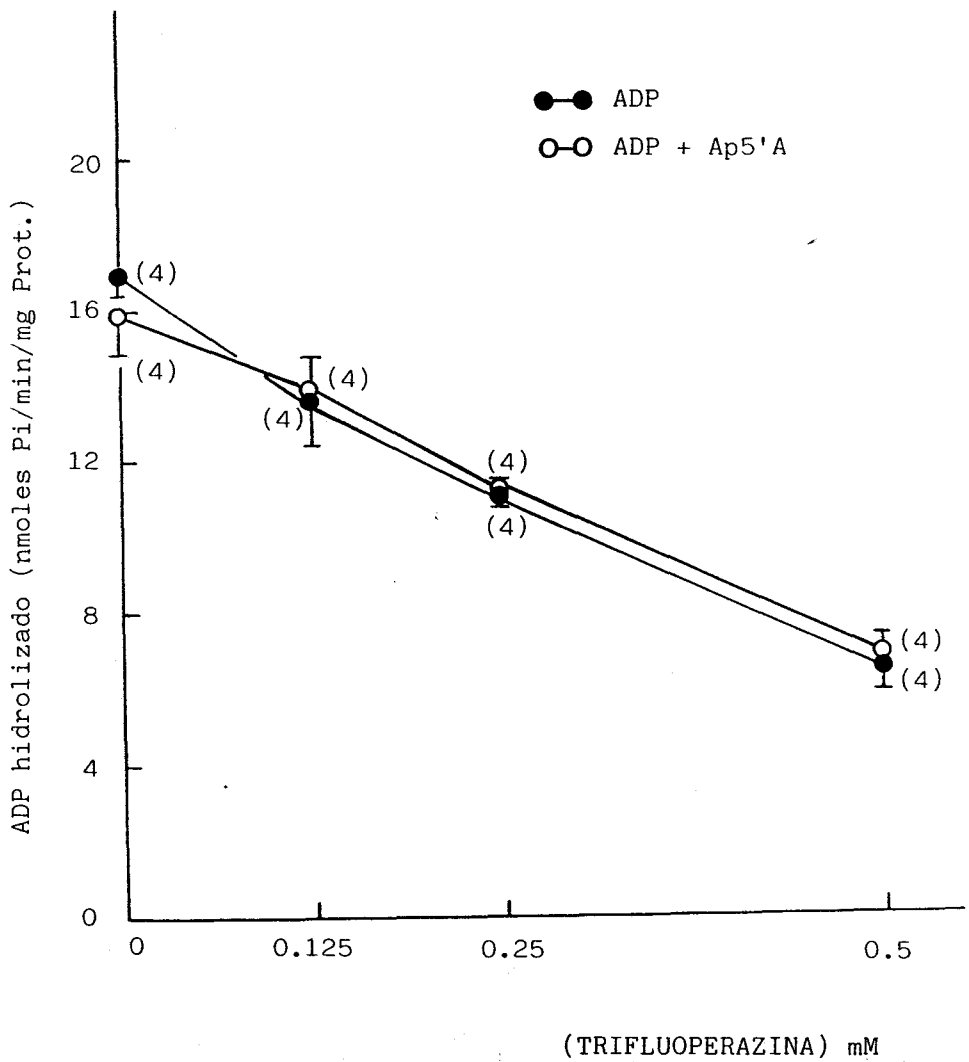


FIGURA 29

EFFECTO DEL Ap5'A SOBRE LA HIDROLISIS DE ADP EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TRIFLUOPERAZINA, EN LA FRACCION II DE CEREBRO

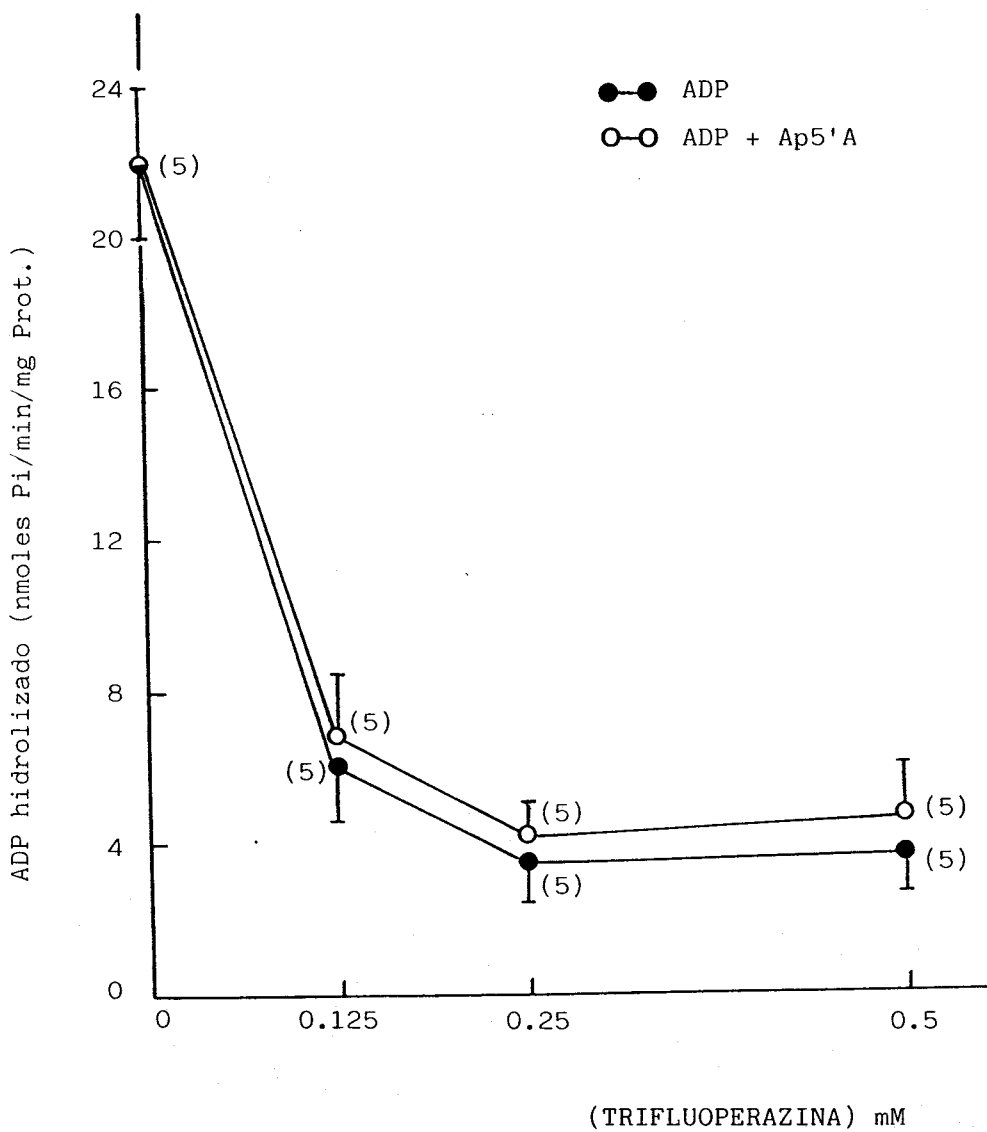
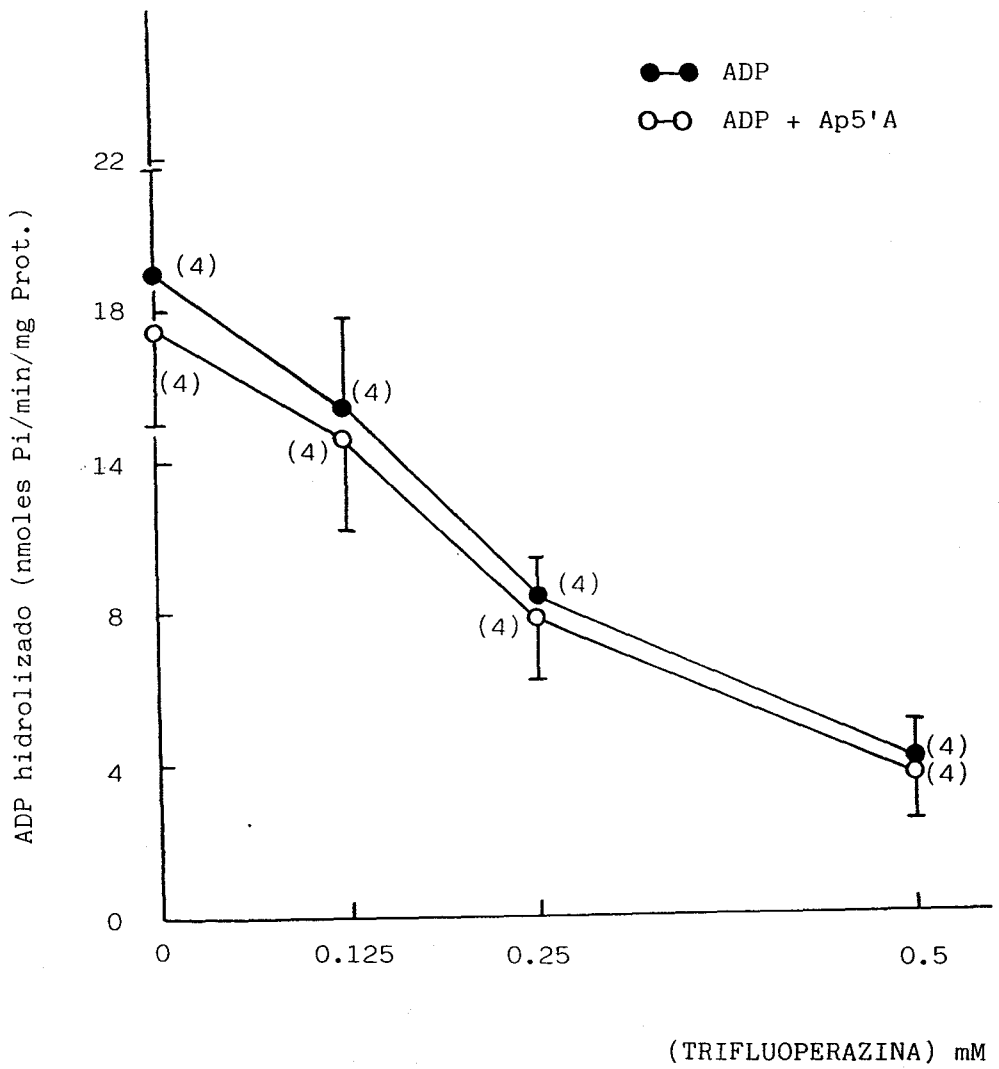


FIGURA 30

EFFECTO DEL Ap5'A SOBRE LA HIDROLISIS DE ADP EN PRESENCIA DE DISTINTAS CONCENTRACIONES DE TRIFLUOPERAZINA, EN LA FRACCION III DE CEREBRO



	ATP(P _i)		ADP(P _i)		ATP(P ³²)		<u>hidrólisis ADP</u> <u>hidrólisis ATP³²</u>
	(nmoles Pi/min/mg Prot.)		(nmoles Pi/min/mg Prot.)		(nmoles P ³² /min/mg Prot.)		
	Sin Azida	Con Azida	Sin Azida	Con Azida	Sin Azida	Con Azida	
F.I	63.26	51.48	26.10	21.11	38.57	30.75	0.67
F.II	69.52	42.38	24.75	17.27	43.80	31.27	0.57
F.III	22.31	16.93	13.83	8.67	11.70	8.38	1.18

TABLA 4

ACTIVIDAD ATP- y ADP HIDROLITICA: INHIBICION POR AZIDA
EN LAS FRACCIONES SUBCELULARES DE CEREBRO

4. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD CALMODULINA

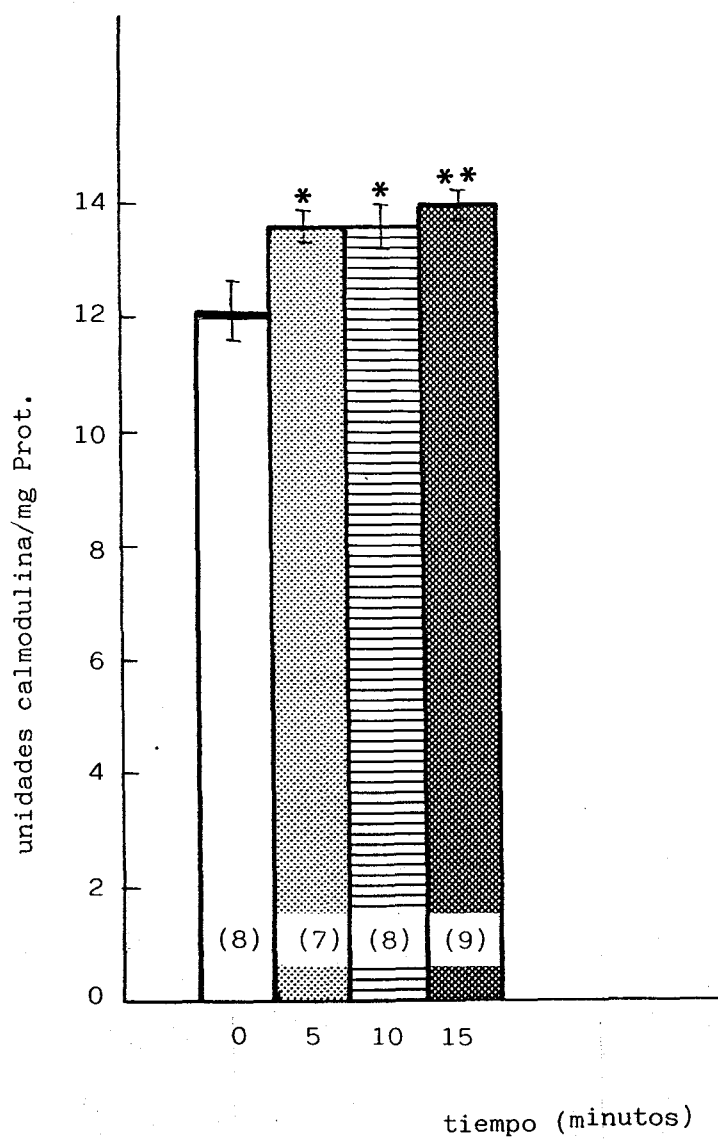
El estudio de esta actividad se llevó a cabo en la fracción III del cerebro,

4.1. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD CALMODULINA

Los resultados se muestran en la figura 31. Como puede observarse esta actividad aumentó de un modo estadísticamente significativo en todos los grupos tratados con somatostatina respecto al grupo control. Este aumento de actividad fué máximo ($p < 0,01$) en el grupo tratado 15 min, siendo semejante el aumento encontrado en los grupos tratados 5 y 10 min ($p < 0,05$).

FIGURA 31

EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE SOMATOSTATINA SOBRE LA DISTRIBUCION
DE LA ACTIVIDAD CALMODULINA EN FUNCION DEL TIEMPO
(FRACCION III DE CEREBRO)



5. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc

El estudio de esta actividad enzimática se llevó a cabo tanto en el cerebro y adenohipófisis de rata, como en las células GH₄C₁. La metodología empleada fué semejante en todos los casos y la actividad se expresó en nanomoles de GMPc hidrolizado por minuto y por mg de proteína.

5.1. EFECTO DE LA INCUBACION SOBRE LA ACTIVIDAD DEL ENZIMA

Puesto que parte de los experimentos se iban a realizar preincubando extractos de tejidos y hormona "in vitro", con posterior incubación para medir la actividad enzimática, interesó ver en primer lugar, si esta preincubación afectaba la estabilidad de la enzima.

Para este estudio se hizo un pool de la fracción III de cerebro (n=11), de ratas controles, observándose (figura 32) que la preincubación del extracto 10 min, disminuía en un 80-85% la actividad fosfodiesterasa en relación a la actividad de la enzima incubada sólo en presencia de sustrato. Probamos distintos compuestos para inhibir dicha inactivación, comprobándose que el mercaptoetanol, uno de los agentes más empleados en esta valoración, tenía un efecto muy escaso (fig. 32-A), lo mismo ocurría con la aprotinina (fig. 32-B). Por el contrario, el inhibidor de tripsina de soja inhibió la inactivación de la enzima (fig. 32-C). Por lo tanto, todos los ensayos posteriores se hicieron en presencia de 100 µg de este inhibidor.

5.2. VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA EN CEREBRO Y ADENOHIPOFISIS DE RATA

Los resultados de las valoraciones de actividad fosfodiesterasa que se exponen en este apartado, corresponden a las fracciones

citoplásmicas de cerebro (FIII) y adenohipófisis (FIII), y se llevaron a cabo en tres situaciones de ensayo diferentes: (A) en presencia de EGTA, (B) en presencia de calcio y (C) en presencia de calcio más calmodulina.

5.2.1. Efecto de la somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa

a) Cerebro;

Los resultados se muestran en la figura 33 y 35. Cuando la fosfodiesterasa de cerebro se ensayó en presencia de EGTA (1 mM) (fig. 33-A), no se observó ninguna diferencia entre los animales controles y los inyectados con somatostatina, a ninguno de los tiempos estudiados. Sin embargo, cuando se ensayó en presencia de calcio (Cl_2Ca 0,2 mM) (fig. 33-B) y calcio más calmodulina (Cl_2Ca 0,2 mM y 100 ng de calmodulina/tubo) (fig. 33-C), hubo un aumento significativo en la actividad de la enzima en todos los grupos tratados con hormona (5, 10 y 15 min.) frente a los controles. Este aumento de actividad fué, en ambos casos, creciendo con el tiempo de la administración de la somatostatina, alcanzándose los valores máximos en el grupo sacrificado a los 15 min de la inyección ($p < 0,001$).

En la tabla 5 se muestran los porcentajes de estimulación de la actividad fosfodiesterasa en presencia de calcio y calcio más calmodulina, en relación a la actividad en presencia de EGTA. Como puede observarse, el calcio produjo un aumento de 3 veces en la actividad fosfodiesterasa, y el calcio más calmodulina aumentó hasta cerca de 6 veces dicha actividad.

La presencia de fosfodiesterasa dependiente de calcio se indica por el incremento en la actividad de la enzima cuando se ensaya en presencia de calcio más calmodulina, comparado con la actividad basal obtenida en presencia de EGTA. La actividad fosfodiesterasa dependiente de calcio es la diferencia entre la actividad estimulada por calcio más calmodulina y la basal y se representa en la figura 35-B.

b) Adenohipófisis:

Las respuestas a la administración de somatostatina de la actividad fosfodiesterasa en la adenohipófisis se muestran en la figura 34, y fueron parecidas a la de la enzima de cerebro, exceptuando el que no encontramos diferencias significativas entre los controles y los grupos tratados a los 15 min de la administración de la hormona. En esta glándula, hubo también un efecto diferente, ya que la calmodulina (fig. 34-C) no fué capaz de incrementar la actividad fosfodiesterasa por encima de los valores obtenidos en presencia de sólo calcio (fig. 34-B).

En los ensayos realizados en presencia de calcio y calcio más calmodulina, se obtuvo la máxima activación en el grupo tratado 10 min. ($p < 0,01$), y en ambos casos se produjo un aumento de 2 veces en la actividad de la enzima, calculado, al igual que para cerebro, con respecto a la actividad obtenida en presencia de EGTA (tabla 5).

De nuevo se calculó la actividad fosfodiesterasa dependiente de calcio por sustracción de las actividades estimuladas por calcio más calmodulina y la basal, y los resultados se muestran en la figura 35-A.

5.2.2. Efecto de la inyección de salino o somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa

Los resultados, que se muestran en la tabla 6, corresponden a la actividad fosfodiesterasa ensayada, tanto en cerebro como en adenohipófisis en dos nuevos grupos de animales: ratas inyectadas con salino y sacrificadas a los diez minutos, y ratas inyectadas con somatostatina y también sacrificadas a los 10 min. Este último grupo aunque era la misma situación de ratas ya sacrificadas, se volvió a repetir con nuevos animales para mantener una similitud con las inyectadas durante 10 min con salino y evitar posible alteraciones en los resultados.

La actividad fosfodiesterasa se ensayó en presencia de calcio (Cl_2Ca 0,2 mM). Los resultados obtenidos (tabla 6) fueron similares a los hallados cuando el grupo control se sacrificó a los 0 min de la administración de salino, en ambas estructuras (ver fig. 33-B y 34-B).

5.2.3. Efecto de la incubación "in vitro" con somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa

Los resultados que se muestran en la figura 36 corresponden a un ensayo de fosfodiesterasa realizado en presencia de calcio (Cl_2Ca 0,2 mM) en un pool de 11 ratas controles, en el que se añadieron diferentes concentraciones de somatostatina (desde $6,1 \times 10^{-12}$ hasta $6,1 \times 10^{-6}$ M).

La hormona no produjo, a ninguna de las dosis empleadas, alteración de la actividad fosfodiesterasa, cuyos valores, expresados como % del valor obtenido en ausencia de somatostatina, permanecieron muy próximos al valor control.

5.3. VALORACION DE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA EN CELULAS GH_4C_1

Los resultados que a continuación se expresan, corresponden a valoraciones de actividad fosfodiesterasa realizadas en homogenados de células tumorales GH_4C_1 . Las valoraciones, al igual que para cerebro y adenohipófisis, se realizaron en presencia de (A) calcio más calmodulina, (B) calcio y (C) EGTA.

5.3.1. Efecto de la somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa

Como puede observarse en la figura 37, la actividad de la enzima incrementó en respuesta a la somatostatina empleada (0,001, 0,01 y 1 μM), aún cuando se ensayó en presencia de EGTA (1 mM) (fig. 37-C).

Cuando el calcio (Cl_2Ca 0,2 mM) (fig. 37-B) y calcio más calmodulina (Cl_2Ca 0,2 mM y 100 ng de calmodulina/tubo) (fig. 37-A) estuvieron presentes en el medio, las diferencias fueron aún más marcadas.

En las tres situaciones de ensayo (A, B, C) la actividad de la enzima aumentó con la concentración de hormona empleada.

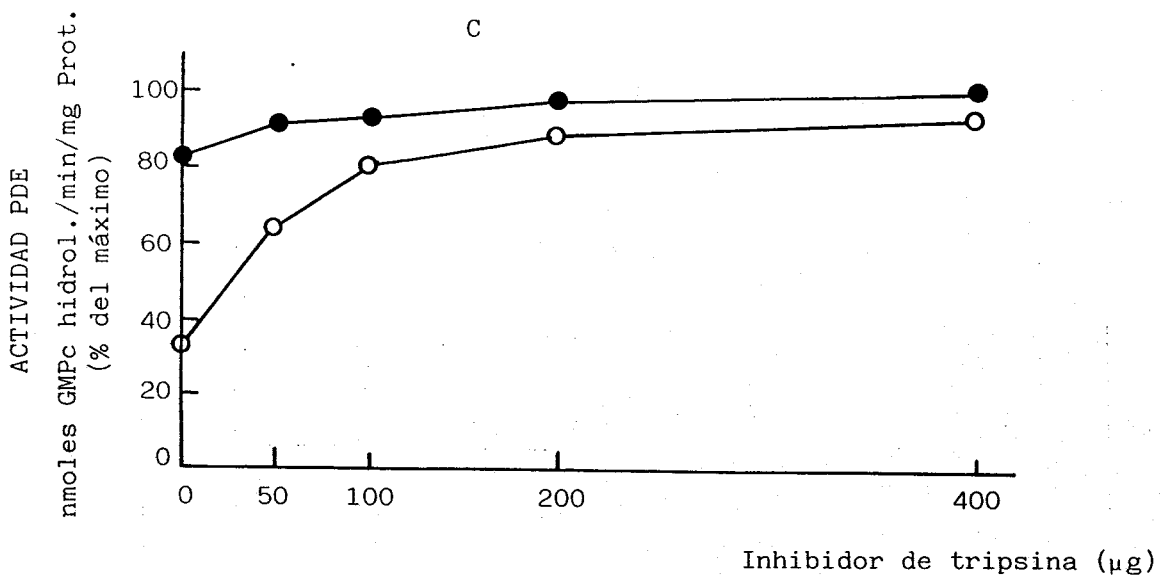
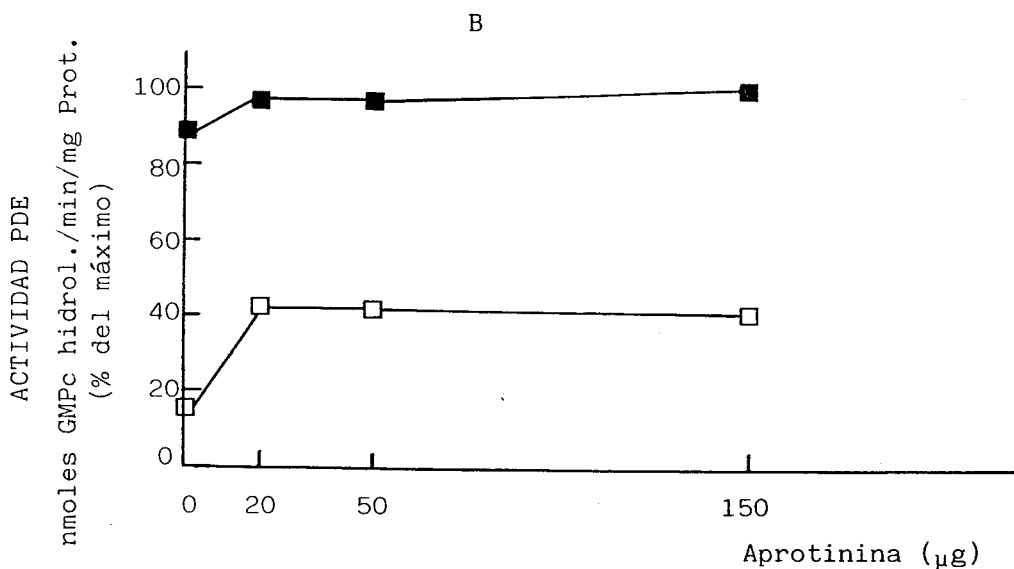
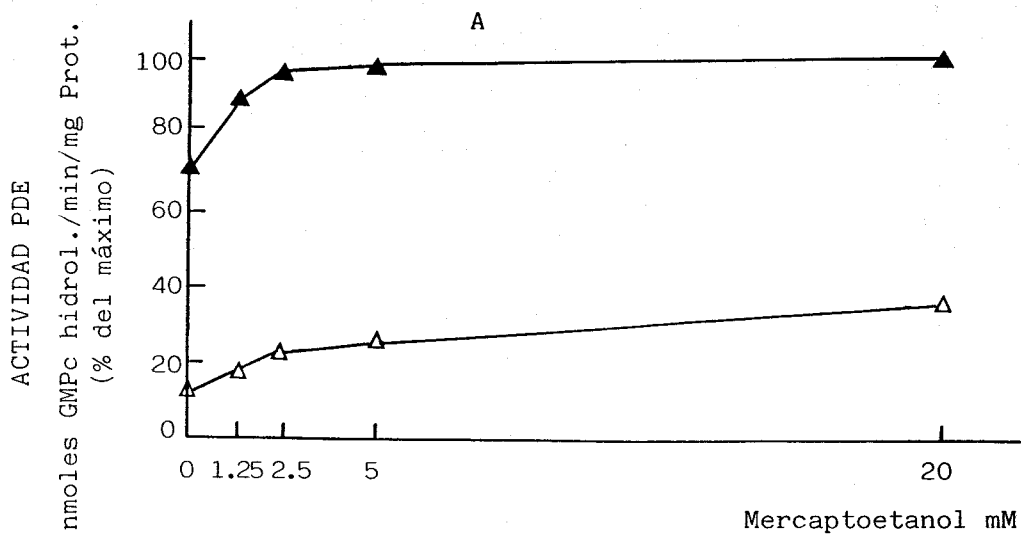
5.3.2. Efecto de la incubación "in vitro" con somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa

En este apartado, al igual que se hizo para la fracción citosólica (FIII) de cerebro, se estudió el efecto que producía la somatostatina cuando era añadida "in vitro" durante el ensayo. Para ello, se añadieron las mismas concentraciones de hormona empleadas en el ensayo "in vivo", es decir, 0,01, 0,1 y 1 μM .

Los resultados se exponen en la tabla 7. La somatostatina produjo un aumento apreciable de la actividad sólo con la concentración más alta.

FIGURA 32

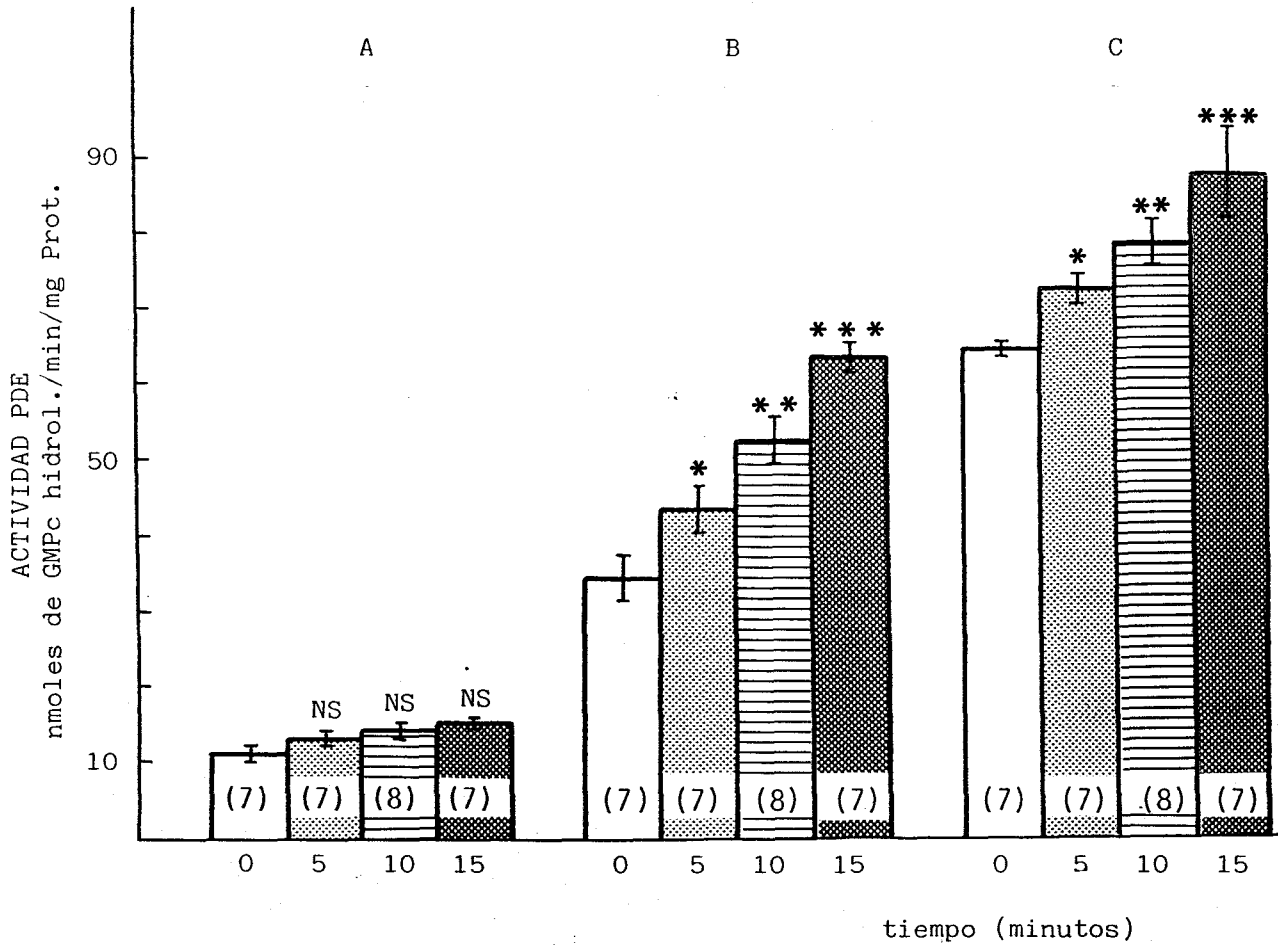
EFFECTO DE INHIBIDORES PROTEOLITICOS SOBRE LA ACTIVIDAD PDE DE GMPC



▲ ■ ● Sin Preincubación
 △ □ ○ Con Preincubación

FIGURA 33

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD PDE DE GMPc
EN LA FRACCION III DE CEREBRO



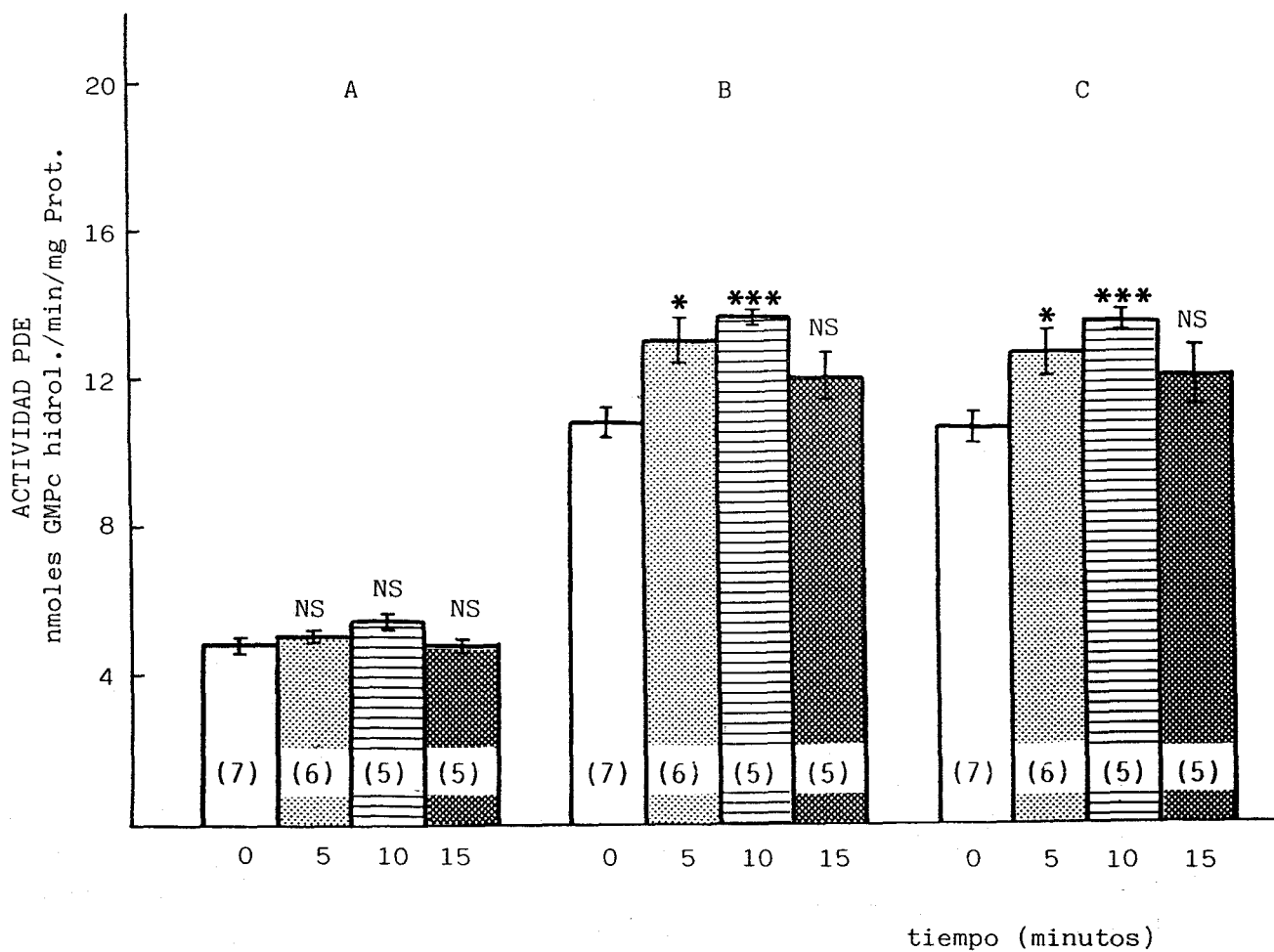
A: en presencia de EGTA

B: en presencia de CaCl_2

C: en presencia de CaCl_2 y calmodulina

FIGURA 34

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD PDE DE GMPc
EN LA FRACCION III DE ADENOHIPOFISIS



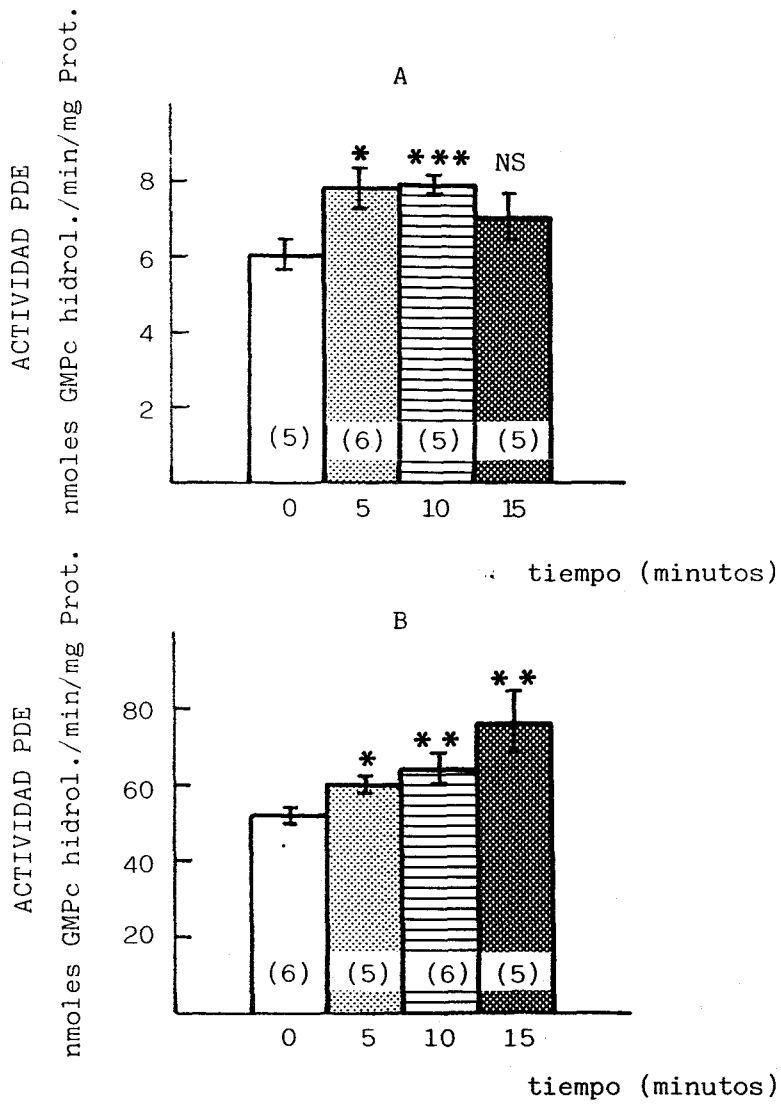
A: en presencia de EGTA

B: en presencia de CaCl₂

C: en presencia de CaCl₂ y calmodulina

FIGURA 35

ACTIVIDAD PDE DEPENDIENTE DE CALCIO Y ACTIVADA POR CALMODULINA



A: Fracción III Adenohipófisis

B: Fracción III Cerebro

TABLA 5

ACTIVACION POR CALCIO Y CALCIO MAS CALMODULINA DE LA ACTIVIDAD
FOSFODIESTERASA EN CEREBRO Y ADENOHIPOFISIS DE RATA

	GRUPO	ACTIVIDAD PDE	
		A	B
CEREBRO	Control	302	572
	SRIF 5 min.	326	550
	SRIF 10 min.	369	561
	SRIF 15 min.	420	580
ADENOHIPOFISIS	Control	222	220
	SRIF 5 min.	264	260
	SRIF 10 min.	250	244
	SRIF 15 min.	247	246

$$A = \frac{\text{Valor en presencia de calcio}}{\text{Valor en presencia de egta}} \times 100$$

$$B = \frac{\text{Valor en presencia de calcio + calmodulina}}{\text{Valor en presencia de egta}} \times 100$$

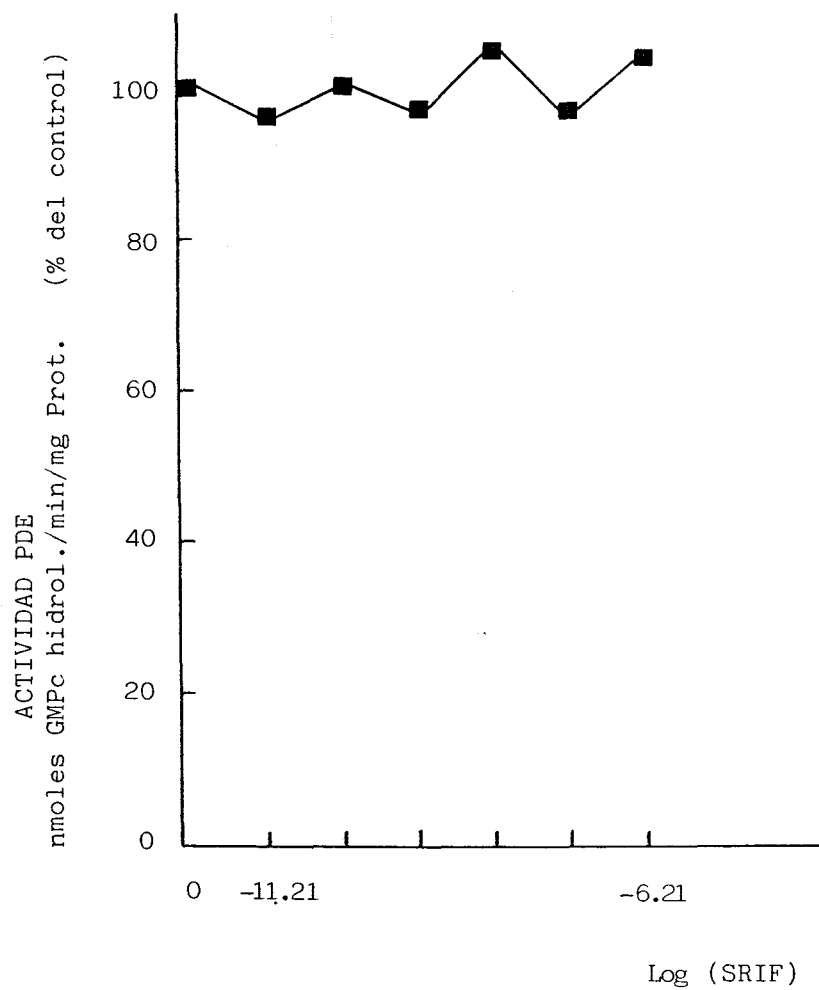
TABLA 6

EFFECTO DE LA INYECCION DE SALINO O SOMATOSTATINA SOBRE LA
LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE CEREBRO E HIPOFISIS DE RATA

FRACCION SOLUBLE	ACTIVIDAD PDE de GMPc (nmoles GMPc hidrol./min/mg Prot.)			
	Salino 10 min.		SRIF 10 min.	
Cerebro	40.37	\pm 1.879 (5)	54.718	\pm 3.596 (5)
			→ ** ←	
Hipófisis	10.915	\pm 0.239 (4)	14.606	\pm 0.473 (5)
			→ ** ←	

FIGURA 36

EFFECTO DE LA INCUBACION "IN VITRO" CON SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD
PDE DE GMPc EN LA FRACCION III DE CEREBRO



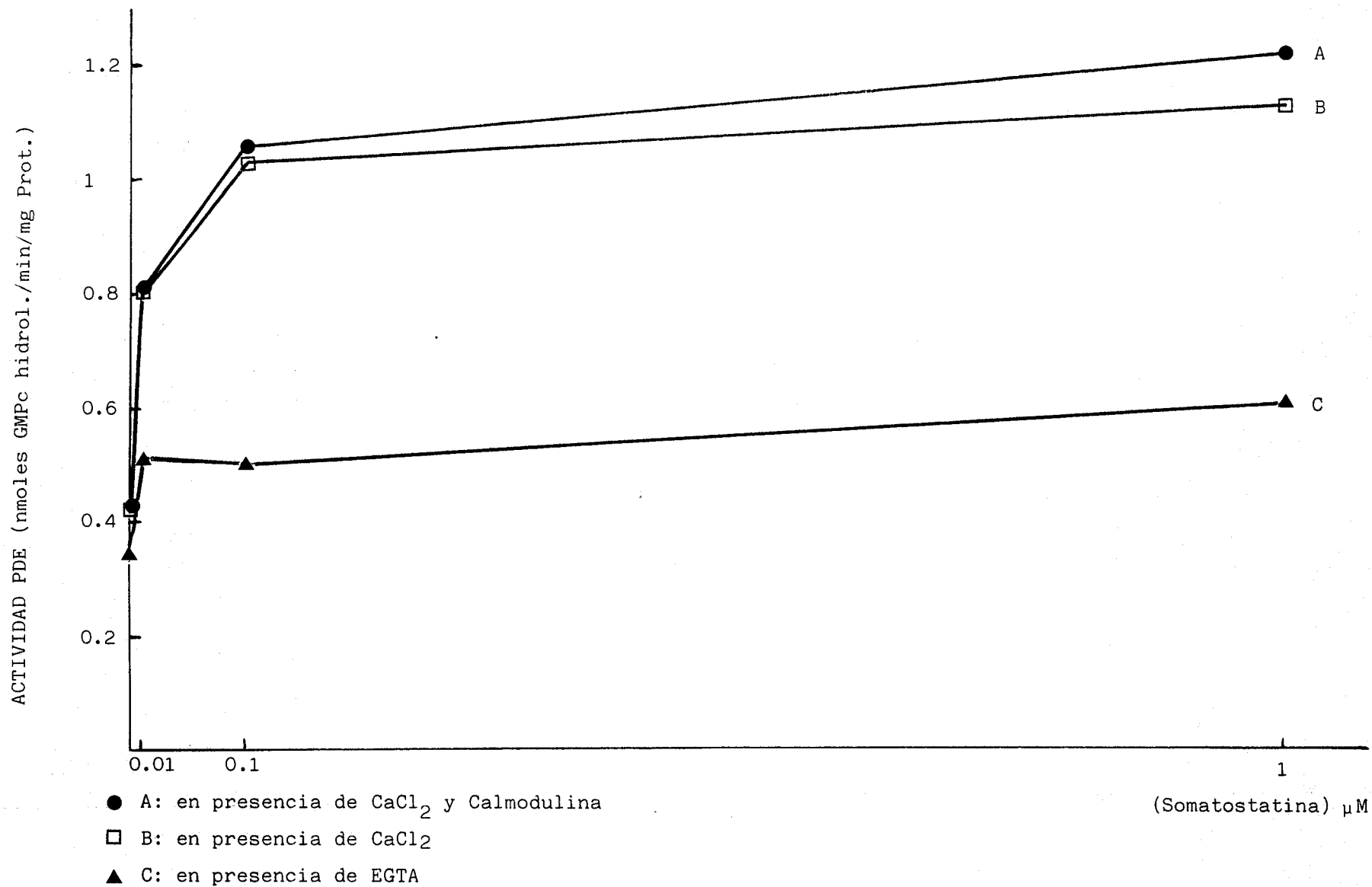


FIGURA 37

EFFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD PDE DE GMPc EN HOMOGENADO DE CELULAS GH_4C_1

TABLA 7

EFEECTO DE LA INCUBACION IN VITRO CON SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD
 FOSFODIESTERASA DE HOMOGENADOS DE CELULAS GH₄C₁

SOMATOSTATINA (μ M)	ACTIVIDAD PDE (nmoles GMP _c hidrol./min/mg Prot.)
0	0.22
0.01	0.25
0.1	0.27
1	0.41

IV. DISCUSSION

En el presente trabajo se ha abordado el estudio de los efectos de la administración de somatostatina sobre actividades enzimáticas que hidrolizan nucleótidos y que están en relación con el bombeo de cationes e iones, y sobre la fosfodiesterasa de GMPC. Algunas de estas actividades (ATPasa - $(Ca^{2+} - Mg^{2+})$ y PDE) tienen la característica de ser estimuladas por calmodulina.

Llama la atención que estos efectos no se hayan estudiado anteriormente. Sobre el mecanismo de acción de la somatostatina, como ya hemos comentado en la Introducción, se conoce su papel en la inhibición de la adenilato ciclasa; en la apertura de los canales de calcio y su efecto sobre la concentración intracelular del catión; en la inactivación de la proteína quinasa C y del recambio de fosfoinosítidos. Pero en la literatura no existe información sobre aspectos tan ligados a los anteriores como son la degradación de nucleótidos cíclicos y las modificaciones en la actividad de las bombas iónicas, dirigidas a disminuir la concentración de iones en el citoplasma.

Creemos que el estudio de estos efectos es importante por varias razones, entre las que cabe destacar el hecho de que ninguna hormona polipeptídica tiene un mecanismo de acción único, perfectamente delimitado, e incluso en este supuesto, la activación o inhibición de un único mecanismo conlleva múltiples efectos posteriores. En este sentido, la activación de la adenilato ciclasa por algunas hormonas produce un aumento de AMPc en el citosol, que no sólo se traduce en activación de la proteína quinasa A, sino también en un aumento de la permeabilidad al calcio, por interacción del nucleótido cíclico con el canal del catión, aumento en el recambio de fosfoinosítidos, activación de los canales de potasio dependientes de calcio, etc.

Aunque los aspectos aquí estudiados no lo hayan sido previamente para la somatostatina, sí lo han sido para otras hormonas. Así se sabe, que la insulina y la oxitocina inhiben la ATPasa $(Ca^{2+} - Mg^{2+})$ de membrana de adipocitos y miometrio, respectivamente (McDonald y cols., 1982), que la insulina estimula la ATPasa $(Na^{+} - K^{+})$

(Rosic y cols., 1985), y que la insulina TSH y acetilcolina producen cambios en el catabolismo de los nucleótidos cíclicos (Appleman y cols., 1984; Brown y cols., 1984; Mattera y cols., 1985).

Por todo esto, nos pareció lógico esperar algún efecto de la somatostatina sobre la actividad fosfodiesterasa, y sobre las bombas iónicas.

1. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA HIDROLISIS DE ATP

1.1. CEREBRO

Debido a la falta del aparataje necesario cuando se inició este trabajo, las fracciones subcelulares que hemos obtenido en el presente trabajo no muestran un grado elevado de pureza. No obstante, los marcadores enzimáticos analizados nos permiten establecer que la fracción I (FI) es la que contiene una mayor concentración de membranas plasmáticas, y la fracción II (FII) de mitocondrias (tabla 2). En consistencia con este hecho, la mayor actividad de ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), que es también un marcador de la membrana plasmática, estaba presente en la fracción I (fig. 13).

En términos generales puede observarse que la administración de somatostatina "in vivo", produjo una disminución en la actividad ATPásica total, (a excepción de la fracción III), y en la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) en cerebro, no produciendo ningún cambio en la actividad dependiente de $\text{Na}^+ - \text{K}^+$. Estos cambios no parecen estar mediados por inhibición en la síntesis de las enzimas correspondientes, puesto que son muy rápidos y también rápidamente reversibles.

La adición de distintas dosis de somatostatina a incubados "in vitro", de las mismas fracciones estudiadas tras la administración "in vivo" no indujo, sin embargo, cambios apreciables en la actividad de la ATPasa total (fig. 15), lo que indica que no estamos en presencia de un artefacto por interacción directa inespecífica de la hormona con las correspondientes enzimas.

En las condiciones de nuestro estudio se pueden distinguir perfectamente las dos actividades fundamentales, típicas de las membranas plasmáticas; la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) (bomba de sodio), y una actividad ATPásica, ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$)-dependiente (bomba de calcio).

La existencia de la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) en membranas plasmáticas de cerebro fué sugerida por Sobue y cols. (1979), quienes demostraron su presencia en una fracción rica en membranas plasmáticas sinaptosómicas, y observaron además que esta actividad era estimulada por calmodulina. La enzima fué purificada en 1982 por Hakim y cols., quienes demostraron la presencia de un intermedio fosforilado, su requerimiento de Mg^{2+} y que constaba de una única cadena polipeptídica. Gill y cols. (1981) demostraron la presencia junto a la actividad ATPásica cálcica, de un intercambio $\text{Na}^+ / \text{Ca}^{2+}$.

En nuestras fracciones subcelulares obtenidas de cerebro, la fracción I, enriquecida en membranas plasmáticas (tabla 2), fué la que presentó, como era lógico esperar, los valores más altos de las dos actividades enzimáticas (figs. 10 y 13).

De los valores obtenidos en la fracción II (fracción rica en mitocondrias, tabla 2) para estas dos actividades, se puede deducir que al menos la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) (fig. 14) se debe a una contaminación por membranas (fracción I), ya que es una enzima típica y exclusiva de esta estructura. Por otro lado, la actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$), medida en esta fracción II (fig. 12), debe reflejar también la contaminación por membranas, aunque no podemos excluir la posibilidad de que parte de esta actividad medida se deba en sí misma a la fracción mitocondrial. Sin embargo, esto último es dudoso, ya que no hemos encontrado ningún dato en la bibliografía sobre la presencia de esta enzima en mitocondrias.

Por el contrario, sí hay datos bibliográficos sobre su presencia en fracción microsomal de distintos órganos (LeBel y cols., 1980; Galván, 1985), pero nos encontramos de nuevo, al no ser la nuestra una fracción pura (fracción III; citosol y microsomas; tabla 2) con la misma situación anterior. Esta fracción sin embargo, presenta baja contaminación por membranas, y reflejo de ello es el que no hayamos detectado actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$).

De lo expuesto hasta aquí, sólo podemos afirmar la presencia de las enzimas ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) y ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) en membranas plasmáticas de cerebro, y de una actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$), medida en FII y FIII, que podría ser o no debida a la presencia de membranas en las mencionadas fracciones.

De los resultados obtenidos es evidente que la hormona inhibe significativamente la actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$). Si nos fijamos en la fracción I (fig. 10) observaremos que la inhibición producida por la hormona es rápida y ocurre a todos los tiempos estudiados.

Lo mismo encontramos para la actividad medida en la fracción II (fig. 11). En la fracción III, sin embargo, la actividad enzimática sólo resulta inhibida significativamente en el grupo tratado cinco minutos con hormona (fig. 12), lo que nos hace dudar que esta actividad sea simplemente reflejo de una contaminación por membranas, y no se deba realmente a la fracción microsomal.

Como ya hemos indicado al principio de esta Discusión, no hemos encontrado ningún trabajo en el que se haya estudiado el efecto de la somatostatina sobre esta actividad en cerebro, ni en ningún otro tejido. Lo único que hemos encontrado es un efecto inhibitor de la insulina sobre dicha actividad en membranas plasmáticas de adipocitos (McDonald y cols., 1982).

Con respecto a la acción de la somatostatina sobre la actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) (figs. 13 y 14), sólo se puede comentar la ausencia total de efecto.

Estos resultados pueden ser interpretados de una forma meramente especulativa de dos maneras:

a. La somatostatina administrada "in vivo" produce la liberación de un factor no identificado que es el responsable directo de la disminución de la hidrólisis de ATP. Factores que inhiben la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) han sido identificados en el hipotálamo bovino y de

rata (Morgan y cols., 1984; Carilli y cols., 1985), y en suero humano (Kelly y cols., 1985), pero no han sido identificados para otras ATPasas.

b. La acción de la somatostatina administrada "in vivo" requiere la participación de un factor o factores que se encuentran en un compartimento celular distinto a la membrana plasmática. La presencia o acción de este factor(s) podría estimular o inhibir la actividad de la enzima, y este proceso a su vez podría estar regulado por somatostatina.

Existen distintos factores que regulan a la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) de distintos tejidos. Entre estos, no cabe duda que la calmodulina es el estimulador mejor conocido (Jarret y Penniston, 1977; Muallen y Karlish, 1981; Pershadsingh y McDonald, 1981).

En nuestros resultados hemos encontrado un aumento de la concentración de calmodulina en la fracción III (fracción rica en citosol, tabla 2) a los distintos tiempos de la administración de somatostatina (fig. 31). Sin embargo, dado que este aumento, aunque significativo estadísticamente, es mínimo, no creemos que la disminución de la actividad ATPásica se deba únicamente a un desplazamiento de la calmodulina desde las membranas a la fracción citosólica. Este aumento de calmodulina citosólica podría estar en relación, aunque no explicaría totalmente, el aumento de fosfodiesterasa observado (véase más adelante).

Esto no excluye la posibilidad de que existan otros tipos de interacciones, entre las cuales, aunque no han sido estudiadas, habría que destacar la disminución en la fosforilación de la enzima, puesto que la somatostatina disminuye la actividad de las proteínas quinasas A, C, y dependiente de calmodulina (Cheung y Storm, 1982; Lin, 1982; Reisine, 1985; Yajima y cols., 1986).

Con respecto a esto último, es perfectamente conocido que la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) es una enzima susceptible de modificación

covalente por fosforilación, siendo la forma fosforilada más activa (Caroni y Carafoli, 1981). McDonald y cols. (1982) han propuesto, que la acción inhibitoria de la insulina sobre la enzima de adipocitos se debe a una disminución en su fosforilación, y a una disminución de la capacidad de unión a calmodulina de las membranas de estas células que fueron tratadas con insulina. En eritrocitos se ha identificado un activador protéico de 56 Kd de la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$), cuyo papel fisiológico se desconoce (Roufogalis y cols., 1984).

También se ha observado que la interacción de la enzima con fosfolípidos ácidos y ácidos grasos insaturados (Niggli y cols., 1981; Hansan y cols., 1984), y con fosfatidil inositol bisfosfato (Penniston, 1982), estimula su actividad.

Algunos de estos factores pueden estar involucrados en la regulación de la ATPasa por somatostatina. En la fig. 38 hemos esquematizado la posible participación de los que creemos más importantes.

Además de estas dos actividades ATPásicas ($(\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+})$ y $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$), claramente diferenciables y medibles, hemos valorado en las tres fracciones subcelulares una actividad ATPásica a la que hemos denominado "total", que representaría una mezcla de diversas actividades hidrolíticas de ATP.

De los resultados obtenidos en las tres fracciones valoradas (figs. 7, 8 y 9) podemos deducir que además de las actividades ya medidas (ATPasa $(\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+})$ y $(\text{Na}^+ - \text{K}^+)$) existen otras actividades hidrolíticas de ATP en dichas fracciones, principalmente en las fracciones II y III (figs. 8 y 9), que pueden ser debidas a la apirasa y a la ATPasa mitocondrial, sensible a azida.

A raíz de esto, y existiendo datos en la literatura sobre la existencia de actividades ATP difosfohidrolasas (apirasas) en tejidos animales (LeBel y cols., 1980; Knowles y cols., 1982), pretendimos

comprobar su posible existencia y contribución a las actividades hidrolíticas de ATP encontradas en las fracciones estudiadas.

Comprobamos en primer lugar, la especificidad de sustrato, ya que esta enzima es capaz de hidrolizar tanto ATP como ADP. El ATP lo hidroliza inicialmente a ADP y P_i , y a continuación el ADP es hidrolizado a AMP y P_i . Otra característica de esta enzima es que se activa por concentraciones mmolares de calcio o magnesio.

Efectivamente, en las tres fracciones subcelulares valoradas se obtuvo una alta actividad cuando se valoró la enzima en presencia de ADP (tabla 3). La posibilidad de que esta actividad ADPásica medida pudiera deberse a la presencia de una adenilato quinasa contaminante en las fracciones subcelulares que transformara el ADP en ATP, siendo éste el sustrato real, quedó eliminada al valorar dicha actividad en presencia del inhibidor específico Ap5'A, y comprobándose que su presencia no afectó a la producción de fosfato inorgánico a partir del ADP (figs. 28, 29 y 30).

Esta alta actividad encontrada con el ADP y la sospecha de una posible actividad apirasa, nos llevó a pensar que al medir la actividad con ATP como sustrato por el método colorimétrico (que puede inespecíficamente medir el fósforo inorgánico liberado tanto del ATP como del ADP) estuviéramos enmascarando la actividad real con ATP como sustrato. Por ello, medimos esta misma actividad empleando el método isotópico, que específicamente sólo mide la liberación del fósforo γ - ^{32}P del ATP, y efectivamente, comprobamos (tabla 4) que estábamos supervalorando la actividad ATPásica.

El hecho de que la diferencia entre la actividad ATPásica cuando se utiliza ATP frío como sustrato y cuando se utiliza ATP radioactivo, sea exactamente igual a la actividad cuando se utiliza ADP como sustrato, nos inclinó a pensar que, al menos parte de la actividad ATP hidrolítica, se debe realmente a una ATP difosfohidrolasa.

Una característica que distingue a esta enzima de las ATPasas es su inhibición por azida (Knowles y cols., 1982). En membranas de cerebro de ratón, esta actividad se inhibe aproximadamente un 55% en presencia de magnesio, inhibición que puede llegar a ser hasta del 80% en otros tejidos (membranas de sarcomas Li-7), inhibición que sólo es del 50% cuando se mide en presencia de calcio (Knowles y cols., 1982).

En las tres fracciones subcelulares valoradas, la actividad ADPásica resultó inhibida por azida (tabla 4), en distinto grado según la fracción.

Puesto que la hidrólisis del ATP, medida por ambos métodos, también resultó inhibida por azida (tabla 4), se puede deducir que la ADPasa es capaz de hidrolizar ATP, siendo por tanto la actividad mayoritaria una ATP difosfohidrolasa, lo que está avalado por la inhibición por azida encontrada al medir el fósforo γ - ^{32}P del ATP radioactivo.

En consonancia con lo encontrado por diversos autores (LeBel y cols., 1980; Knowles y cols., 1982), la mayor inhibición por azida de la actividad ADPásica se encontró en aquellas fracciones donde era más activa la hidrólisis del ADP (medida como la relación ADP hidrólisis / ATP^{32} hidrólisis), en nuestro caso la fracción III (tabla 4).

De todo lo expuesto, podemos deducir que existe una actividad ATPásica no inhibible por azida y una actividad ATP difosfohidrolasa inhibible por azida, en las tres fracciones valoradas. La mayor proporción de actividad ATP hidrolítica inhibible por azida, se encontró en FII y FIII, lo que nos permite explicar la mayor actividad medida como ATPasa total en dichas fracciones.

Una característica general de muchas enzimas que son dependientes de calcio, como la ATPasa (Ca^{2+} - Mg^{2+}) es su activación por calmodulina, y su inhibición por trifluoperazina (antagonista de la calmodulina). Aunque se desconoce la función fisiológica de la apirasa, LeBel y cols. (1980) han sugerido que pueda actuar como una bomba de

calcio. En nuestras fracciones subcelulares de cerebro de rata, la actividad hidrolítica medida con ATP y con ADP como sustrato resultó inhibida por la trifluoperazina (figs. 25, 26 y 27). En principio, estos resultados nos permiten suponer que la hidrólisis de ambos sustratos depende de calmodulina, aunque deben ser tenidos en cuenta con precaución, puesto que se ha demostrado que la trifluoperazina puede inhibir inespecíficamente a distintas enzimas, incluso no dependientes de calcio, como la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) (Debetto y Cantley, 1984).

La similitud de inhibición producida por distintas concentraciones de trifluoperazina, utilizando ambos sustratos, refuerza la idea de que sea la misma enzima la que produce la hidrólisis de ambos nucleótidos (figs. 25, 26 y 27).

Esta idea, también se ve apoyada por el efecto semejante que produce la somatostatina sobre dicha actividad con ambos sustratos: inhibición a los cinco minutos en FI (para ADP y ATP), inhibición a los diez minutos en FII (para ADP y ATP), y ausencia de efecto en la fracción III (para ADP y ATP) (figs. 22, 23 y 24, respectivamente).

No disponemos de ninguna interpretación para explicar esta inhibición por somatostatina en la hidrólisis de ADP, pues no se ha descrito previamente ningún tipo de regulación sobre estas enzimas, ni tampoco conocemos la importancia biológica de ellas.

1.2. ADENOHIPOFISIS

La escasa disponibilidad de tejido hizo que el planteamiento experimental en este caso fuese más limitado, y además de no poder valorar la ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), sobre la que no habíamos visto ningún efecto en cerebro, nos obligó a utilizar el ATP-P^{32} como único trazador, pues resultó imposible medir la actividad hidrolítica utilizando el sustrato frío.

No conocemos ningún trabajo en el que se haya valorado previamente esta actividad en esta glándula, aunque sí ha sido determinada en células tumorales procedentes de hipófisis (Barros y Kaczorowski, 1984).

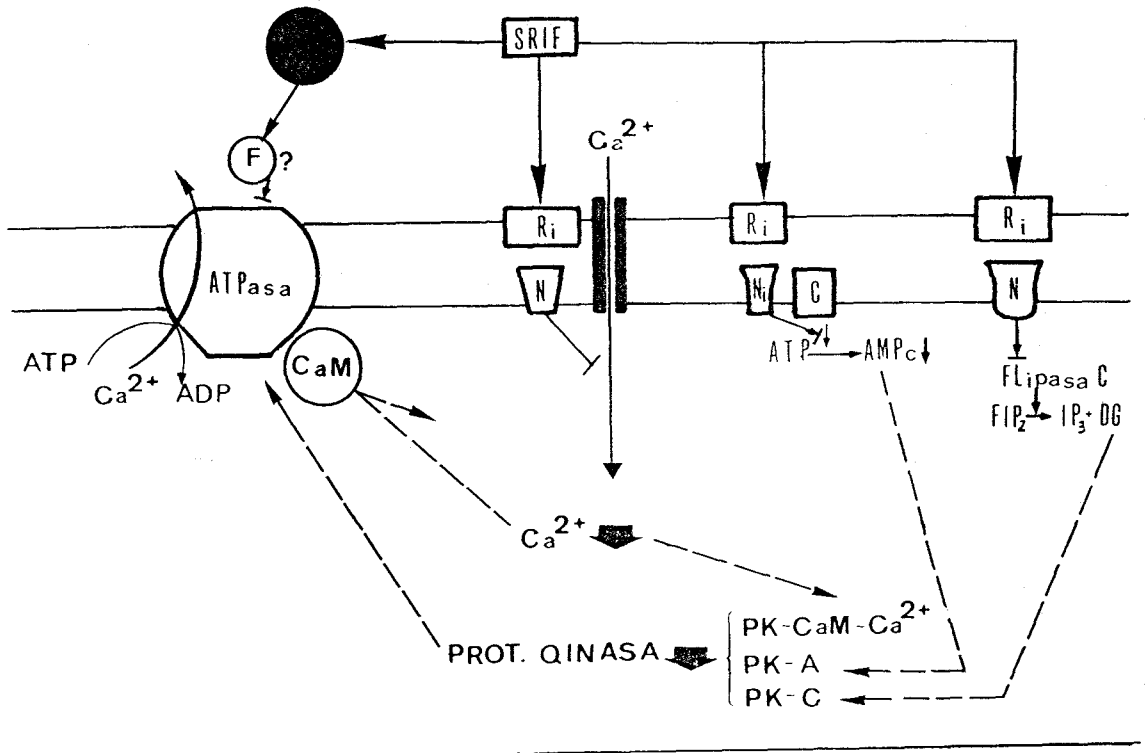
Llama en primer lugar la atención que la actividad ATPásica total y $(Ca^{2+} - Mg^{2+})$ -ATPasa, es menor en todas las fracciones que en cerebro, como corresponde a un tejido, que aunque es excitable, mantiene un potencial de membrana menor que el de células nerviosas.

Sin embargo, en todas las fracciones estudiadas (FI - figs. 16 y 19, FII - figs. 17 y 20 y FIV - figs. 18 y 21) se vió una inhibición de la actividad hidrolítica de ATP cuando se administraba somatostatina (en la fracción III no se detectó actividad). Si tenemos en cuenta la heterogeneidad celular de la adenohipófisis, en la cual existen distintos tipos de células (somatotropas, tirotropas, corticotropas, lactotropas y gonadotropas), de las cuales sólo las dos primeras, y en algunas circunstancias las terceras, responden a somatostatina inhibiendo su secreción (Brazeau y cols., 1973; Vale y cols., 1974; Heisler y cols., 1982), deduciremos que la inhibición observada es muy grande, puesto que en nuestra actividad estamos valorando conjuntamente células que responden y células para las que la somatostatina no tiene ninguna acción.

Los mismos argumentos dados anteriormente para la inhibición de la actividad hidrolítica de ATP en cerebro pueden emitirse en este caso. En definitiva, y para no repetirnos, no sabemos si esta inhibición forma parte del mecanismo de acción de la somatostatina, o si es un efecto secundario.

FIGURA 38

MECANISMOS HIPOTETICOS DE REGULACION DE ATPasa ($\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}$)
POR SOMATOSTATINA



- SRIF Somatostatina
- R_i Receptor inhibitor
- N Proteína transductora
- N_i Proteína transductora inhibidora
- G Componente catalítico de la ciclase
- F Factor no identificado
- ATP 5'trifosfato de adenosina
- ADP 5'difosfato de adenosina
- AMP_c 3',5'-fosfato ciclico de adenosina
- PK Proteína quinasa
- FLipasa C Fosfolipasa C
- FIP₂ Fosfoinositol bisfosfato
- IP₃ Inositol trisfosfato
- DG Diglicéridos

2. EFECTO DE LA SOMATOSTATINA SOBRE LA ACTIVIDAD FOSFODIESTERASA DE GMPc.

El descubrimiento del AMPc como segundo mensajero de la acción hormonal por Sutherland y Rall (1957), ha hecho que durante muchos años la mayoría de las investigaciones hayan ido dirigidas hacia el mecanismo de síntesis de este nucleótido por el sistema de la adenilato ciclasa y hacia la regulación de ésta. Es bien conocido el papel que las hormonas desempeñan en esta síntesis, mediante mecanismos de transducción y amplificación, en los cuales participan el receptor de membrana y las proteínas acopladoras N(G) (Birnbaumer y cols., 1985). Sin embargo, el papel de las fosfodiesterasas que hidrolizan los nucleótidos cíclicos (AMPc y GMPc) no ha sido tan extensamente estudiado en cuanto a su regulación por hormonas, neurotransmisores, etc.

Para algunas hormonas y neurotransmisores, como insulina y acetilcolina, se ha visto que presentan capacidad de modular esta enzima, sin que exista consenso sobre el mecanismo a través del cual actúan. Se ha postulado que la fosforilación de la PDE de AMPc, activa a la enzima, y también que la enzima podría interaccionar con un componente tipo Ni, activándose (Sutherland y Rall, 1957; Birnbaumer y cols., 1985).

Una característica común entre la insulina, acetilcolina, y la hormona empleada en este estudio -somatostatina-, es que ninguna estimula la adenilato ciclasa, y la acetilcolina, al igual que la somatostatina, la inhibe (Brown y cols., 1984; Mattera y cols., 1985), siendo su efecto revertido por la toxina pertúsica. Además, tanto somatostatina como acetilcolina, actúan a través de una proteína transductora Ni.

La actividad enzimática medida en este estudio se caracteriza por ser soluble, e hidrolizar tanto AMPc como GMPc, aunque con características cinéticas distintas. La enzima es estimulada por

calcio-calmodulina, y presenta una K_m alta para AMPc (aprox. 200 μ M) y baja para GMPc (aprox. 10 μ M). Puesto que las concentraciones de AMPc en las células de vertebrados son muy superiores a las de GMPc, la enzima hidroliza en situación fisiológica a ambos nucleótidos.

2.1. ENSAYO

En el presente trabajo se ha utilizado para la valoración de fosfodiesterasa el método descrito por Toro y cols. (1985). En este método la actividad de la enzima varía poco en presencia y ausencia de inhibidores de la proteólisis. No ocurre así (fig. 32) cuando el extracto de tejido que contiene la enzima es preincubado en ausencia de sustrato, habiéndose observado en este trabajo (fig. 32) que en estas circunstancias existe una inactivación superior al 80%. Parece lógico, por tanto, que como ocurre en el caso de otras enzimas, el sustrato proteja de la inactivación. No obstante, puesto que nosotros hemos hecho los dos tipos de valoraciones, nos pareció adecuado incluir siempre 100 μ g de inhibidor de tripsina de soja, que fué el inhibidor con el que obtuvimos mejores resultados (fig. 32-C). Otros autores (Thompson y Appleman, 1971 a y b; Couchie y cols., 1983; Nagasaka y cols., 1983) han utilizado β -mercaptoetanol, para prevenir la oxidación, que, como es sabido, puede inactivar y acelerar la proteólisis (Stadtman, 1986); sin embargo, este compuesto tuvo escasa influencia en nuestra preparación, y lo mismo ocurrió con la aprotinina (fig. 32-A y B).

2.2. CEREBRO

La existencia de fosfodiesterasa ha sido probada en todos los tejidos estudiados (Thompson y Appleman, 1971 a y b). La presencia de la enzima dependiente de calcio y calmodulina en cerebro bovino fué puesta de manifiesto en 1967 por Cheung, y, más tarde, fué caracterizada en cerebro de rata (Kakiuchi y Yamazaki, 1970).

Estudios posteriores demostraron que la enzima dependiente de calcio-calmodulina es la forma principal del cerebro, representando un alto porcentaje de la fosfodiesterasa total (Kakiuchi y cols., 1975; Kincaid y cols., 1984).

Puesto que todos los estudios realizados en cerebro y en otros órganos indican que la fosfodiesterasa dependiente de calcio-calmodulina sólo está presente en la fracción citosólica, en el presente trabajo nos hemos limitado a su valoración en dicha fracción.

Como se muestra en las figuras 33 y 35, y en la tabla 5, la enzima es activable por calcio y calcio-calmodulina. La mayor activación por calcio-calmodulina (aprox. 6 veces) en relación a la activación por calcio sólo (aprox. 3 veces) es indicativa de que, en nuestras condiciones, aunque el tejido contiene calmodulina, ésta no es suficiente para activar completamente a la enzima.

No existen datos en la bibliografía sobre la acción de la somatostatina sobre esta actividad enzimática, por lo que no podemos establecer comparaciones con nuestros resultados. Es evidente que la somatostatina a todos los tiempos de su administración produjo un aumento en la actividad de la enzima ensayada en presencia de calcio o calcio-calmodulina. Los niveles basales de la enzima no presentaron variaciones en comparación con los controles, aunque existía una tendencia a aumentar en los animales tratados. En cerebro la relación entre la actividad en presencia de calcio y la basal, en presencia de EGTA, aumentó en todos los grupos tratados con somatostatina, siendo máxima en los animales sacrificados a los 15 minutos (tabla 5). Por el contrario, la relación entre la actividad en presencia de calcio-calmodulina y basal se mantuvo dentro de los mismos valores (tabla 5).

Estos datos son difíciles de interpretar. En primer lugar, la primera relación sería indicativa de que en los animales tratados con somatostatina existe más calmodulina capaz de interaccionar con la enzima que en los controles, o que esta interacción es más eficiente, por cambios en la afinidad de la enzima por su proteína reguladora. Por

el contrario, en presencia de calmodulina a concentraciones saturantes, la relación se mantendría fija. Efectivamente, la concentración de calmodulina está aumentada en el citosol en los animales tratados con somatostatina; sin embargo, aunque esta elevación es significativa, es muy pequeña, por lo que no creemos que un aumento de la calmodulina en la fracción citosólica sea el responsable del efecto observado. Sería, por tanto, necesario hacer una curva dosis-respuesta de la fosfodiesterasa a calmodulina exógena, para poder aclarar totalmente este aspecto.

Puesto que los controles que hemos utilizado eran animales sacrificados a tiempo "cero", se podría aducir que los efectos vistos no son mediados por la somatostatina, sino por factores inespecíficos, como el estrés. Para resolver este problema, repetimos nuestro estudio en animales inyectados con somatostatina o con salino (controles), obteniéndose los mismos resultados que en el experimento anterior (tabla 6).

Por último, cuando la somatostatina se añadió "in vitro" a la fracción de cerebro estudiada y se valoró la actividad enzimática, no obtuvimos ningún efecto (fig. 36), lo que indica que es necesaria la presencia de otras fracciones subcelulares para que la activación mediada por somatostatina se produzca, y además, que el efecto observado sobre la fosfodiesterasa no se trata de un artefacto por interacción inespecífica de la hormona con la enzima o con su proteína reguladora.

La acción de la somatostatina es posible que no sea directa, pudiendo estar mediada por la inhibición, ejercida por ésta hormona, sobre la síntesis y secreción de otras hormonas. Este es un aspecto que discutiremos más adelante.

2.3. ADENOHIPOFISIS

En la adenohipófisis de rata y bovino se ha puesto de manifiesto la existencia de fosfodiesterasas que hidrolizan tanto AMPc como GMPc (Azhar y Menon, 1977; Nagasaka y cols., 1983). En la hipófisis de rata la enzima soluble hidroliza los dos nucleótidos, dependiendo su actividad de calcio-calmodulina, y eluye en dos picos en cromatografía en DEAE-celulosa, que presentan aproximadamente, la misma K_m para ambos nucleótidos, y su actividad es aumentada varias veces por calcio-calmodulina. En la hipófisis bovina (Nagasaka y cols., 1983) se han aislado también dos fracciones por cromatografía en sefarosa 6B, de las cuales la de más alto peso molecular hidroliza los dos nucleótidos, y presenta activación por calcio-calmodulina. Existen, por tanto, evidencias de que la enzima estimulable por calcio-calmodulina es la responsable de la hidrólisis de ambos nucleótidos.

Esta misma actividad ha sido encontrada por nosotros en fracción soluble de rata en hipófisis (Toro y cols., en prensa; Toro, 1983), y por tanto, en estos trabajos como en el presente, se demuestra su activación por calcio-calmodulina. Esta activación medida, como en el caso del cerebro, por la relación entre la actividad en presencia de calcio o de calcio-calmodulina y la actividad ensayada en presencia de EGTA, es menor que en cerebro, (aprox. 240%), tanto para calcio como para calcio-calmodulina (tabla 5), lo que indica que en el extracto existe suficiente cantidad de calmodulina endógena como para activar totalmente a la enzima. No obstante, los valores de actividad de la enzima fueron considerablemente más bajos que los encontrados en cerebro.

La administración de somatostatina indujo un aumento en la actividad de la enzima a los 5 y 10 minutos de la inyección (figs. 34 y 35), y al igual que hicimos con el cerebro, esta estimulación pudo ponerse también de manifiesto en animales inyectados con somatostatina en comparación con animales inyectados con salino, sacrificados ambos a

los 10 minutos de la inyección (tabla 6), lo que demuestra que el efecto visto no es inespecífico.

2.4. CELULAS GH₄C₁

Puesto que la estimulación de fosfodiesterasa de cerebro e hipófisis podía estar mediada por la estimulación o inhibición de otras hormonas o neurotransmisores, estudiamos el efecto de la somatostatina sobre la fosfodiesterasa en cultivos de células tumorales clonales de hipófisis (GH₄C₁).

El homogenado de estas células presentaba actividad fosfodiesterasa, que era estimulada a niveles parecidos (aprox. 2 veces) cuando se analizaba en presencia de calcio o calcio-calmodulina (fig. 37).

Con todas las dosis estudiadas (0.01, 0.1 y 1 μ M) se pudo observar un aumento en la actividad de la enzima, lo que demuestra que este efecto no está ejercido por otras hormonas. La actividad aumentó en las tres situaciones en que la enzima fué ensayada; en presencia de EGTA, calcio, y calcio-calmodulina (fig. 37).

Cuando la somatostatina fué añadida al homogenado total de células, pudo observarse que con la dosis más alta había un aumento apreciable en la actividad de la enzima, ensayada en presencia de calcio (tabla 7). Estos datos están en contradicción aparente con los encontrados en cerebro, en cuyos homogenados no encontramos activación de la fosfodiesterasa "in vitro" por somatostatina. Por otra parte, el grado de activación es menor que cuando se estudia la respuesta a la administración en células intactas. Estos hechos pueden deberse a que en este homogenado, al contrario de lo que ocurría en cerebro, donde utilizábamos fracciones subcelulares, tiene todos los componentes necesarios para la activación de la enzima, que se discutieron anteriormente. La menor activación puede deberse a la degradación

parcial de los receptores de somatostatina, por la sonicación, o por no haber incluido inhibidores de la proteólisis, en el proceso de homogeneización (sonicación).

En resumen, en la adenohipófisis y en las células GH_4C_1 , encontramos el mismo efecto de activación de la fosfodiesterasa de GMPc dependiente de calcio-calmodulina, que en cerebro. Es muy posible, y los datos y la literatura así lo indican, que esta enzima sea la misma para GMPc que para AMPc, con lo cual su activación vendría a reforzar el mecanismo de inhibición de la adenilato ciclasa (Borgeat y cols., 1974; Heindel y cols., 1978; Bokoch y cols., 1984; Spada y cols., 1984; Peake y Smoake, 1985), disminuyendo la concentración de AMPc.

En el presente trabajo no hemos estudiado el mecanismo o mecanismos por los cuales esta activación se produce. No creemos que el aumento de calmodulina visto en la fracción citosólica de cerebro sea suficiente como para justificar la activación de la enzima. Tampoco la disminución de calcio citosólico que induce la administración de somatostatina (Maruyama e Ishikawa, 1977; Koch y cols., 1985; Schegel y cols., 1985; Login y Judd, 1986), puesto que nosotros hemos estudiado la actividad con concentraciones de calcio prefijadas. Por tanto, deben existir otros mecanismos por los cuales se produzca esta activación.

A la vista de los resultados que se han obtenido con otros tejidos y otras hormonas o neurotransmisores (Appleman y cols., 1984; Houslay y cols., 1984; Erneux y cols., 1985), cabría pensar que la somatostatina puede aumentar o disminuir la fosforilación de la fosfodiesterasa, y que esta variación cambie la actividad de la enzima. Por otra parte, puesto que es bien conocido que en el mecanismo de acción de la somatostatina existe una proteína transductora tipo Ni, podría ser que la interacción de esta proteína activada, con la fosfodiesterasa, estimulase la actividad de ésta última.

Estos mecanismos han sido propuestos para explicar la acción de la insulina en hígado. Houslay y cols. (1984) han encontrado que en membranas de hepatocitos existen dos formas de fosfodiesterasa, una que

es una proteína integral de la membrana, con baja afinidad por el AMPc, y otra periférica fácilmente dissociable, que presenta alta afinidad por el nucleótido. Esta última forma es la regulable por insulina, y el mecanismo de su regulación (activación) es la fosforilación llevada a cabo por una proteína quinasa dependiente de AMPc.

Más en relación con el presente trabajo, Sharma y Wang (1985) han visto que la fosfodiesterasa de cerebro dependiente de calmodulina tiene dos subunidades (60 y 63 Kd) que por asociación forman tres isoenzimas. La subunidad de 60 Kd es sustrato de una proteína quinasa dependiente de AMPc, fosforilándose. La enzima fosforilada tiene menos afinidad por la calmodulina, mostrando por tanto menor actividad.

Puesto que la somatostatina inhibe la adenilato ciclasa, la disminución de AMPc haría que la proteína quinasa estuviese en su forma inactiva, y por tanto, la fosfodiesterasa en su forma más activa. En este sentido, sería interesante estudiar si agentes u hormonas que actúan estimulando la formación de AMPc en cerebro e hipófisis disminuyen la actividad de la enzima.

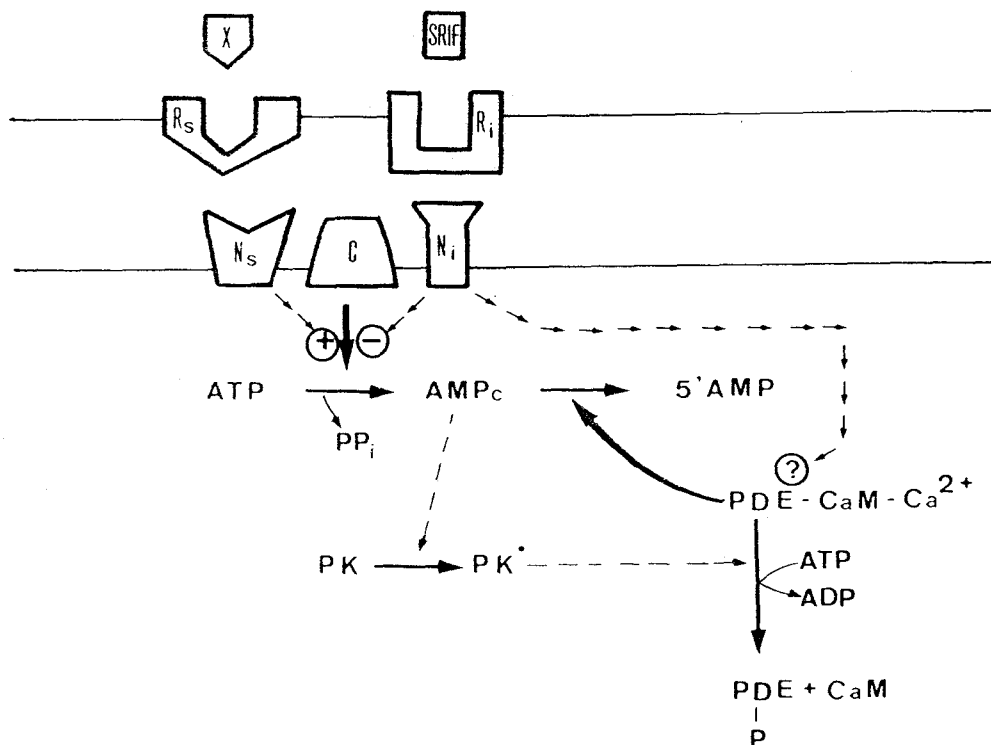
Por otra parte, Houslay (1985) ha sugerido que las acciones metabólicas de la insulina, y concretamente, la activación de la fosfodiesterasa, puede estar mediada además por un componente tipo N (Nins), puesto que los nucleótidos de guanina estimulan la actividad de la enzima y la toxina pertúsica abole los efectos de la insulina. Esta hipótesis ha sido estudiada sobre la base de que otra fosfodiesterasa bien conocida, la de los bastones de la retina, está acoplada a una proteína tipo Ni, la transducina (Takemoto y cols., 1982; Miller y cols., 1986).

Por último, creemos que el efecto visto se debe a la interacción directa de la somatostatina sobre los tejidos estudiados y no a un efecto mediado por otras hormonas.

En la figura 39 se esquematiza los posibles mecanismos de activación de fosfodiesterasa por somatostatina.

FIGURA 39

POSIBLES MECANISMOS DE ACTIVACION DE PDE POR SOMATOSTATINA



X	Hormona estimuladora
SRIF	Somatostatina
R_s	Receptor estimulador
R_i	Receptor inhibidor
N_s	Proteína transductora estimuladora
N_i	Proteína transductora inhibidora
G	Componente catalítico de la ciclase
PDE	Fosfodiesterasa
CaM	Calmodulina
PK	Proteína quinasa
ATP	5' trifosfato de adenosina
AMP_c	3'5'-fosfato cíclico de adenosina
5'AMP	5' fosfato de adenosina

V. CONCLUSIONES

1. En el cerebro de la rata existe además de las ATPasas descritas clásicamente, ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) y ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$), una actividad ATP difosfohidrolasa (apirasa) que supone un porcentaje alto en la hidrólisis del nucleótido (ATP).

2. La administración de somatostatina a ratas produce una disminución de la actividad ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) en cerebro e hipófisis, y de otras actividades ATP hidrolíticas (apirasa de cerebro).

La actividad ATPasa ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) de cerebro no se ve afectada por la somatostatina.

3. Este efecto observado sobre la ATPasa ($\text{Ca}^{2+} - \text{Mg}^{2+}$) puede formar parte del mecanismo de acción de la somatostatina o ser una consecuencia de dicha acción.

4. En cerebro e hipófisis de rata (fracción soluble) existe fosfodiesterasa dependiente de calcio y calmodulina. La actividad de esta enzima aumenta en los tejidos tras la administración de somatostatina.

5. Este efecto sobre la fosfodiesterasa es directo, puesto que se demuestra también en células GH_4C_1 , y puede formar parte del mecanismo de acción de la somatostatina, potenciando el efecto inhibitor de la síntesis de AMPc.

VI. BIBLIOGRAFIA

AGUILERA, G., HARWOOD, J.P. y CATT, K.J.

Somatostatin modulates the effects of angiotensin II in the adrenal glomerulosa zone.

Nature, 292:262, 1981.

AGUILERA, G., PARKER, D.S. y CATT, K.J.

Characterization of Somatostatin Receptors in the Rat Adrenal Glomerulosa Zone.

Endocrinology, 111:1376, 1982.

ALBERTI, K.G., CHRISTENSEN, S.E., IVERSEN, J., SEYER-HANSEN, K.,

CHRISTENSEN, N., HANSEN, A.J., LUNDBAECK, K. y ØRSKOV, H.

Inhibition on insulin secretion by somatostatin.

Lancet, 2:1299, 1973.

ALPERT, L.C., BRAWER, J.R., PATEL, Y.C. y REICHLIN, S.

Somatostatinergic neurons in anterior hypothalamus: immunohistochemical localization.

Endocrinology, 98:255, 1976.

ALUMETS, J., EKELOUND, M., ELMUNSHID, H.A., HAKANSON, R., LOREN, I. y

SUNDLER, F.

Topography of somatostatin cells in the stomach of the rat: possible functional significance.

Cell, Tissue Res., 202:177, 1979.

APPLEMAN, M.N., ALLAN, E.H., ARIAND, M.A., ONG, K.K., TUSANG, C.A.,

WEBER, H.W. y WHITSON, R.H.

Insulin control of cyclic AMP phosphodiesterase.

Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research,

16:149, 1984.

- ARILLA, E., LOPEZ-RUIZ, M.P., GONZALEZ-GUIJARRO, L., PRIETO, J.C., GOMEZ-PAN, A. y HIRST, B.
Characterization of somatostatin binding sites in cytosolic fraction of rat intestinal mucosa.
Biochim. Biophys. Acta, 802:203, 1984.
- ARILLA, E., LOPEZ-RUIZ, M.P., GONZALEZ-GUIJARRO, L. y PRIETO, J.C.
Somatostatin binding sites in cytosolic fraction of parietal and non-parietal cells from rabbit fundic mucosa.
Bios. Reports, 5:321, 1985.
- ARIMURA, A., SATO, H., COY, D.H. y SCHALLY, A.V.
Radioimmunoassay for GH-release inhibiting hormone.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 148:784, 1975a.
- ARIMURA, A., SATO, H., DUPONT, A., NISHI, N. y SCHALLY, A.V.
Somatostatin; Abundance of Immunoreactive Hormone in rat stomach and Pancreas.
Science, 189:1007, 1975b.
- AUB, D.L., FREY, E.A., SEKURA, R.D. y COTE, T.E.
Coupling of the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C by a GTP-binding protein distinct from the inhibitory or stimulatory GTP-binding protein.
J. Biol. Chem., 261:9333, 1986.
- AZHAR, S. y MENON, K.M.J.
Cyclic nucleotide phosphodiesterases from rat anterior pituitary. Characterization of multiple forms and regulation by protein activator and Ca^{2+} .
Eur. J. Biochem, 73:73, 1977
- BAKHIT, C., BENOIT, R. y BLOOM, F.E.
Release of somatostatin-28(1-12) from rat hypothalamus in vitro.
Nature, 301:524, 1983.

- BARROS, F. y KACZOROWSKI, G.J.
Mechanism of Ca^{2+} transport in plasma membrane vesicles prepared from cultured pituitary cells. II (Ca^{2+} - Mg^{2+}) - ATPase Dependent Ca^{2+} transport activity.
J. Biol. Chem., 259:9404, 1984.
- BECKER, G.L., FISKUM, G. y LEHNINGER, A.L.
Regulation of free Ca^{2+} by liver mitochondria and endoplasmic reticulum.
J. Biol. Chem., 225:9009, 1980.
- BENDIT, R., BOHLEN, P., LING, N., BRISKIN, A., ESCH, F., BRAZEAU, P., YING, S-Y, y GUILLEMIN, R.
Presence of somatostatin-28₍₁₋₁₂₎ in hypothalamus and pancreas.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:917-921, 1982a.
- BENDIT, R., LING, N., BAKHIT, C., MORISON, J.H., ALFORD, B. y GUILLEMIN, R.
Somatostatin-28₍₁₋₁₂₎like immunoreactivity in the rat.
Endocrinology, 111:2149, 1982b.
- BERGMAYER, H.U.
En: Methods of Enzymatic Analysis (Bergmeyer, H.U. ed.), pag. 978, Academic Press, New York, 1963.
- BERGMAYER, H.U. y BENT, E.
En: Methoden der Enzymatischen Analyse (Bergmeyer, H.U., ed.), pag. 533, Verlag Chemie, Weinheim, 1970.
- BERLOWITZ, M., KRONHEIM, S., PIMSTONE, B. y SHAPIRO, B.
Somatostatin-like immunoreactivity in rat blood. Characterization, regional differences and responses to oral and intravenous glucosa.
J. Clin. Invest., 61:1410, 1978.

BERRIDGE, M.J.

Interaction of cyclic nucleotide and calcium in the control of cellular activity.

Adv. Cyclic Nucleotide Res., 6:1-98, 1975.

BERRIDGE, M.J.

The molecular bases of communication within the cell.

Investigación y Ciencia, 142, 1986.

BESSER, G.M., BUTLER, P.W.P., LANDON, J. y REES, L.

Growth hormone release inhibiting hormone in acromegaly.

Br. Med. J., 1:352, 1974.

BILEZIKJIAN, L.H. y VALE, W.W.

Stimulation of adenosine 3',5'-monophosphate production by growth hormone-releasing factor and its inhibition by somatostatin in anterior pituitary cells in vitro.

Endocrinology, 113:1726, 1983.

BIRNBAUMER, L., CODINA, J., MATTERA, R., LERIONE, R.A., HILDEBRAND, J.D., SUNYER, T., ROJAS, F.J., CARON, M.J., LEFROWITZ, R.J. e IYENGAR, R.

Structural basis of adenylate cyclase stimulation and inhibition by distinct guanine nucleotide regulatory protein.

En: Molecular aspects of cellular regulation. Vol. 4. Molecular mechanisms of transmembrane signalling. (eds. Cohen, Houslay), Elsevier, Amsterdam, pag. 131., 1985.

BIRNBAUMER, L.

Comunicación personal, 1987.

BLOOM, S.R., MORTIMER, C.H., THORNER, M.O.; BESSER, G.M.; HALL, R., GOMEZ-PAN, A., ROY, V.H., RUSSEL, R.C.G., COY, D.H., KASTIN, A.J. y SCHALLY, A.V.

Inhibition of gastrin and gastric-acid secretion by growth-hormone release-inhibiting hormone.

The Lancet, 9:1106, 1974

BODEN, G., SIVITZ, H.C., OWEN, D.E., ESSA-KOUMAR, N. y LANDOR, J.H. Somatostatin suppresses secretin and pancreatic exocrine secretion. Science, 190:163, 1975.

BODKCH, G.M., KATADA, T., NORTHUP, J.K., VI, M. y GILMAN, A.G.

Purifications and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase.

J. Biol. Chem., 259:3560, 1984.

BORGEAT, P., LABRIE, F., DROVIN, J., BELANGER, A., IMMER, H., SESTANJ, K., NELSON, V., GOTZ, M., SCHALLY, A.V., COY, D.H. y COY, E.S. Inhibition of adenosine 3',5'-monophosphate accumulation in anterior pituitary gland in vitro by growth hormone-release inhibiting hormone. Biochem. Biophys. Res. Commun., 56:1052, 1974.

BRADFORD, M.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding.

Anal. Biochem., 72:248, 1976.

BRATUSH-MARRAIN, P. y WALDHAUS, W.

The influence of amino acids and somatostatin on prolactin and growth hormone release in man.

Acta Endocrinol. (Copeak), 90:403, 1979.

BRAZEAU, P., RIVIER, J., VALE, W. y GUILLEMIN, R.

Hypothalamic polypeptide that inhibits the secretion of immunoreactive pituitary growth hormone.

Science, 179:77, 1973.

- BRAZEAU, P., RIVIER, J. y VALE, W.
Inhibition of growth hormone secretion in the rat by synthetic somatostatin.
Endocrinology, 94:184, 1974a.
- BRAZEAU, P., VALE, W. y RIVIER, J.
Acyclated Des-(Ala¹-Gly²)-Somatostatin Analogs: Prolonged Inhibition of Growth Hormone Secretion.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 60:1202, 1974b.
- BRAZEAU, P., LING, N., ESCH, F., BOHLEN, P., BENOIT, R. y GUILLEMIN, R.
High biological activity of the synthetic replicates of somatostatin-28 and somatostatin-25.
Regul. Pept., 1:255, 1981.
- BROWN, M.P., COY, D.H., GOMEZ-PAN, A., HIRTS, B.H., HUNTER, M., MEYERS, C., REEDS, J.D., SCHALLY, A.V. y SHAW, B.
Structure-activity relationships of eighteen somatostatin analogues on gastric secretion.
J. Physiol., 277:1-14, 1979.
- BROWN, M.P., RIVIER, J. y VALE, W.
Somatostatin: Central neurons system actions on glucoregulation.
Endocrinology, 104:1709, 1979.
- BROWN, M.P., WOJCIKIEWICZ, R.J.H., DOBSON, P.R.M., ROBINSON, A. y IRONS, L.I.
Pertussis toxin blocks the inhibitory effect of muscarinic cholinergic agonists on cyclic AMP accumulation and prolactin secretion in GH₃ anterior pituitary tumor cells.
Biochem. J., 223:145, 1984.
- BROWNSTEIN, M.S., ARIMURA, A., SATO, H., SCHALLY, A.V. y KIZER, J.S.
The Regional Distribution of Somatostatin in the Rat Brain.
Endocrinology, 96:1456, 1975.

BROWNSTEIN, M.S., ARIMURA, A., FERNANDEZ-DURANGO, R., SCHALLY, A.V.,
PALKOVITS, M. y KIZER, J.S.

The effect of hypothalamic deafferentation on somatostatin-like
activity in the rat brain.

Endocrinology, 100:246, 1977.

BURGUS, R., LING, N. y GUILLEMIN, R.

Primary structure of somatostatin. A hypothalamic peptide that inhibits
the secretion of pituitary growth hormone.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70:684, 1973.

CALKER, V., MOLLER, M. y HAMPRECHT, B.

Modulation by secretin, vasoactive intestinal peptide, and somatostatin
of cyclic AMP accumulation in cultured brain cells.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 111:6907, 1980.

CARAFOLI, E. y CROMPTON, M.

The regulation of intracellular calcium.

Curr. Top. Membr. Transp., 10:151, 1978.

CARILLI, C.T., BERNE, M., CANTLEY, L.C. y HAUPERT, G.T.

Hypothalamic factor inhibits the (Na, K) ATPase from the extracellular
surface. Mechanism of inhibition.

J. Biol. Chem., 260:1027, 1985.

CARONI, P. y CARAFOLI, E.

Regulation of Ca^{2+} -pumping ATPase of heart sarcolemma by a
phosphorylation-dephosphorylation process.

J. Biol. Chem., 256:9371, 1981.

COHEN, P., BURCHELL, A., FOULKES, J.G., COHEN, P.T.W., VANAMAN, T.C. y
NAIRN, A.C.

Identification of the Ca^{2+} -dependent modulator protein as the fourth
subunit of rabbit skeletal muscle phosphorylase kinase.

FEBS Lett., 92:287, 1978.

COLAS, B., ARILLA, E. y PRIETO, J.C.

Characterization of somatostatin binding sites in cytosolic fraction of pig retina.

Neurons, Lett., 65:193, 1986.

COOPER, G.R. y SHIN, S.H.

Somatostatin inhibits prolactin secretion in the estradiol primed male rat.

Can. J. Physiol. Pharmacol., 59:1082, 1981.

COUCHIE, D., PETRIDIS, G., JASTORFF, B. y ERNEUX, C.

Characterization of phosphodiesterase catalytic sites by means of cyclic nucleotide derivatives.

Eur. J. Biochem., 136:571, 1983.

COX, J.A., MALNOÉ, A. y STEIN, E.A.

Regulation of brain cyclic nucleotide phosphodiesterase by calmodulin: a quantitative analysis.

J. Biol. Chem., 256:3218, 1981.

COY, D., COY, E., ARIMURA, A. et al.

Solid Phase Synthesis of Growth Hormone-Release Inhibiting Factor.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 54:1267, 1973.

CRONIN, M.J., ROGOL, A.D., MYERS, G.A. y HEWLETT, E.L.

Pertussis toxin blocks the somatostatin-induced inhibition of growth hormone release and adenosine 3',5'-monophosphate accumulation.

Endocrinology, 113:209, 1983.

CRONIN, M.J., HEWLETT, E.L., EVANS, W.S., THORNER, M.D. y ROGOL, A.D.

Human pancreatic tumor growth hormone (GH)-releasing factor and cyclic adenosine 3',5'-monophosphate evoke GH release from anterior pituitary cells; The effects of Pertussis Toxin, Cholera Toxin, forskolin, and cycloheximide.

Endocrinology, 114:904, 1984.

CHARPENET, G. y PATEL, Y.C.

Characterization of tissue and releasable molecular forms of somatostatin-28₍₁₋₁₂₎-like immunoreactivity in rat median eminence. *Endocrinology*, 116:1863-68, 1985.

CHEUNG, W.Y.

Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase: pronounced stimulation by snake venom.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 29:478, 1967.

CHEUNG, W.Y.

Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Demonstration of an activator.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 33:533, 1970a.

CHEUNG, W.Y.

Cyclic nucleotide phosphodiesterase.

Adv. Biochem. Pharmacol., 3:51, 1970b.

CHEUNG, W.Y.

Cyclic nucleotide phosphodiesterase: Evidence for an properties of a protein activator.

J. Biol. Chem., 246:2859, 1971.

CHEUNG, W.Y.

Calmodulin.

En: *Calcium and cell function*, Vol. 1 (ed. Cheung, W.Y.), pag. 1-12, Academic Press, New York, 1980.

CHEUNG, W.Y. y STORM, D.R.

Calmodulin regulation of cAMP metabolism.

En: *Handbook of Experimental Pharmacology*, Vol. 58/1, (eds. Nathanson, J.A. y Keibarian, J.W.), pag. 301, Springer-Verlag, Berlin, 1982.

- CHIHARA, K., A. ARIMURA, C. KUBLI-GARFIAS y A.V. SCHALLY,
Enhancement of Immunoreactive Somatostatin Release into Hypophysial
Portal Blood by Electrical Stimulation of the Preoptic Area in the rat,
Endocrinology, 105:1416, 1979a.
- CHIHARA, K., ARIMURA, A. y SCHALLY, A.V.
Immunoreactive somatostatin in rat hypophyseal portal blood; Effects of
anesthetics,
Endocrinology, 104:1434, 1979b.
- DABROWSKA, R., SHERRY, J.M.F., ARAMATORIA, D.K. y HARTSHORNE, D.J.
Modulator protein as a component of the myosin light chain kinase from
chicken gizzard,
Biochemistry, 17:253, 1978.
- DEBETTO, P. y CANTLEY, L.
Characterization of a Ca^{2+} -stimulated, Mg^{2+} -dependent adenosine
triphosphatase in friend murine erythroleukemia cell plasma membranes,
J. Biol. Chem., 259:13824, 1984.
- DHARMSATHAPHORN, K., RACUSEN, L. y DOBBINS, J.W.
Effect of somatostatin on ion transport in the rat colon,
J. Clin. Invest., 65:813, 1980.
- DiPOLO, R y BEAUGE, L.
Physiological role of ATP-driven calcium pump in squid axon,
Nature, 278:271, 1979.
- DITCHER, M.A. y DELFS, J.R.
Somatostatin and cortical neurons in cell culture,
Adv. Biochem. Psychopharmacol., 28:145, 1981.

- DORFLINGER, L.J. y SCHONBRUNN, A.
Somatostatin inhibits basal and vasoactive intestinal peptide-stimulated hormone release by different mechanisms in GH pituitary cells.
Endocrinology, 113:1551, 1983a.
- DORFLINGER, L.J. y SCHONBRUNN, A.
Somatostatin inhibits vasoactive intestinal peptide-stimulated cyclic adenosine monophosphate accumulation in GH pituitary cells.
Endocrinology, 113:1541, 1983b.
- DOUGLAS, W.W.
Stimulus-secretion coupling: the concept and clues from chromaffin and other cells.
Br. J. Pharmacol., 34:451, 1968.
- DRAZNIN, B., SHERMAN, N., SUSSMAN, K, DAHL, R. y VATTER, A.
Internalization and cellular processing of somatostatin in Primary culture of rat anterior pituitary cells.
Endocrinology, 117:960, 1985.
- DROVIN, J., DELEAN, A., RAINVILLE, D., LACHANCE, R. y LABRIE, F.
Characteristic of the interaction between thyrotropin releasing hormone and somatostatin for thyrotropin and prolactin release.
Endocrinology, 98:514, 1974.
- DUFY, B. y BARKER, J.
Peptide Hormone regulate ionic conductances in clonal pituitary cells.
Program of the 66th Annual Meeting of The Endocrine Society, Quebec City, Quebec, Canada, p. 633 (Abstract 746), 1984.
- ENJALBERT, A., TAPIA-ARANCIBIA, L., RIEUTORT, M., BRAZEAU, P., KORDON, C. y EPELBAUM, J.
Somatostatin Receptors on Rat Anterior Pituitary Membranes.
Endocrinology, 110:1634, 1982a.

- ENJALBERT, A., EPELBAUM, J., ARANCIBIA, S., TAPIA-ARANCIABIA, L.,
BLUET-PAJOT, M.T. y KORDON, C.
Reciprocal interactions of somatostatin with thyrotropin-releasing
hormone and vasoactive intestinal peptide on prolactin and growth
hormone secretion in vitro.
Endocrinology, 111:42, 1982b.
- EPELBAUM, J., WILLOUGHBY, J.O., BRAZEAU P. y MARTIN, J.B..
Effects of Brain Lesions and Hypothalamic Deafferentation on
Somatostatin Distribution in the Rat Brain.
Endocrinology, 101:1495, 1977.
- ERIKSEN, E.F. y LARSSON, L.I.
Neuropeptides in the retina: evidence for differential topographical
localization.
Peptides, 2:153, 1981.
- ERNEUX, C., VAN SANDE, J., MIOT, F., COCHAUX, P., DECOSTER, C. y
DUMONT, J.E.
A mechanism in the control of intracellular AMPc level: The activation
of a calmodulin-sensitive phosphodiesterase by a rise of intracellular
free calcium.
Molecular and Cellular Endocrinology, 43:123, 1985.
- ESCH, F., BOHLEN, P., LING, N., BENOIT, R., BRAZEAU, P. y GUILLEMIN, R.
Primary structure of ovine hypothalamic somatostatin-28 and
somatostatin-25.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:6827, 1980.
- FEHM, H.L., VOIGHT, K.H., LANG, R., BEINERT, K.E., RAPTIS, S. y
PFEIFFER, E.F.
Somatostatin: a potent inhibitor of ACTH-hypersecretion in adrenal
insufficiency.
Klin. Wochenschr, 54:173, 1976.

FINLEY, J.C.W., MADERDRUT, J.L., ROGER L.J. y PETRUSZ, P.

The immunocytochemical localization of somatostatin-containing neurons in the rat central neurons system.

Neuroscience, 6:2173-92, 1981.

FISKE, C.H. y SUBBAROW, Y.

J. Biol. Chem., 65:375, 1925.

FITZPATRICK, L.A., BRANDI, M. y AURBACH, G.D.

Calcium-controlled secretion is effected through a guanine nucleotide regulatory protein in parathyroid cells.

Endocrinology, 119:2700, 1986.

FOLKERS, K.

Synthesis of Hypothalamic Neurohormones.

En: 23rd International Congress of Pure and Applied Chemistry.

London, Butterworth, pag. 205, 1971.

GALVAN, A.

Tesis doctoral: Regulación intracelular del calcio en páncreas exocrino, 1985.

GASPAR, L., JULESZ, J., JANAKY, T., KOESIS, J. y LASZLO, F.

En: Second International Symposium on Somatostatin (Serono, Athens, Greece), pag. 52 (Abstract), 1981.

GERICH, J.E., LORENZI, M., SCHNEIDER, V. y FORSHAM, P.H.

Effect of somatostatin on plasma glucose and insulin responses to glucagon and tolbutamide in man.

J. Clin. Endocrinol, 39:1057, 1974a.

GERICH, J.E., LORENZI, M., SCHNEIDER, V. y FORSHAM, P.H.

Inhibition of pancreatic glucagon responses to arginine by somatostatin in normal man and insulin-dependent diabetics.

Diabetes, 23:876, 1974b.

GERICH, J.E., LDVINGER, R. y GRODSKY, G.M.

Inhibition by somatostatin of glucagon and insulin release from the perfused rat pancreas in response to arginine, isoproterenol and theophylline. Evidence for a preferential effect on glucagon secretion. *Endocrinology*, 96:749, 1975.

GERSHENGORN, M.C.

Mechanism of thyrotropin releasing hormone stimulation of pituitary hormone secretion.

Ann. Rev. Physiol., 48:515, 1986.

GILL, D.L., GROLLMAN, E.F. y KOHN, L.D.

Calcium transport mechanisms in membrane vesicles from guinea pig brain synaptosomes.

J. Biol. Chem., 256:184, 1981.

GOLDSMITH, P.C., ROSE, I.C., ARIMURA, A. y GANONG, W.F.

Ultrastructural Localization of Somatostatin in Pancreatic Islets of the rat.

Endocrinology, 97:1061, 1975.

GOMEZ-PAN, A., REED, J.D., ALBINUS, M., SHAW, B., HALL, R., BESSER, G.M., COY, D.H., KASTIN, A.J. y SCHALLY, A.V.

Direct inhibition of gastric acid and pepsin secretion by growth-hormone release-inhibiting hormone in cats.

Lancet, 1:888, 1975.

GOMPERTS, B.D.

Involvement of guanine nucleotide-binding protein in the gating of Ca^{++} by receptors.

Nature, 306:64, 1983.

GUANDALINI, S., KACHUR, J.F., SMITH, P.L., MILLER, R.J. y FIELD, M.

In vitro effects of somatostatin on ion transport in rabbit intestine.

Am. J. Physiol., 238:6-67, 1980.

- HAKIN, G., ITANO, T., VERMA, A.K. y PENNISTON, J.T.
Purification of the Ca^{2+} -ATPase from rat brain synaptic plasma membrane.
Biochem. J., 207:225, 1982.
- HALASZ, B., KOVES, K. y RETHELYI, M.
Recent data on neurocontrol of the adenohypophysis.
En: Stumpf, W., Grant, L. (eds): Anatomical Neuroendocrinology, International Conference of Neurobiology of CNS Hormone Interactions, Basel, Karger, pag. 9, 1975.
- HALL, R., BESSER, G.H., SCHALLY, A.V., COY, D.H., EVERED, G., GOLDIE, D.J., KASTIN, A.J., McNEILLY, A.S., MORTIMER, C.H., PHENEKOS, C., TUNBRIDGE, V.M.G. y WEIGHTMAN, D.
Actions of growth-hormone-release inhibitory hormone in the healthy men and in acromegaly.
Lancet, 2:581, 1973.
- HANSAN, T.A., MOLLA, A. y KATZ, S.
 Ca^{2+} -ATPase activity in pancreatic acinar plasma membranes. Regulation by calmodulin and acidic phospholipids.
J. Biol. Chem., 259:13442, 1984.
- HANSEN, A.P., DRSKOV, H., SEYER-HANSEN y LUNDBACK, K.
Some actions of growth hormone release inhibiting factor.
Br. Med. J., 2:523, 1973.
- HAYASAKI-KIMURA, N. y TAKAHASHI, K.
Studies on action of somatostatin on growth hormone release in relation to calcium and AMPc.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 161:312, 1979.
- HEINDEL, J.J., WILLIAMS, E., ROBISON, G.A. y STRADA, S.J.
Inhibition of GH_1 rat pituitary tumor cell adenylyl cyclase activity by somatostatin.
J. Cyclic Nucleotides, Res., 4:453, 1978.

HEISLER, S., REISINE, T.D., HOOK, V.Y.H. y AXELROD, J.
Somatostatin inhibits multireceptor stimulation of cyclic AMP formation
and adrenocorticotropin secretion in mouse pituitary tumor cells.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 79:6502, 1982.

HEISLER, S. y REISINE, T.D.
Forskolin stimulates AC activity, cAMP accumulation and ACTH secretion
in mouse pituitary tumor cells.
J. Neurochem., 42:1659, 1984.

HEISLER, S. y SRIKANT, C.B.
Somatostatin-14 and Somatostatin-28 pretreatment down-regulate
Somatostatin-14 receptors and have biphasic effects on forskolin-
stimulated Cyclic adenosine, 3', 5'-monophosphate synthesis and
adrenocorticotropin secretion in mouse anterior pituitary tumor cells.
Endocrinology, 117:217, 1985.

HIDAKA, H., YAMAKI, T., OCHIAI, Y., ASANO, T. y YAMABE, H.
Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase determined in various human
tissues by DEAE-cellulase chromatography.
Biochim. Biophys. Acta, 484:398, 1977.

HILDEBRAND, J.D., CODINA, J., RISINGER, R. y BIRNBAUMER, L.
Identification of a γ subunit associated with the adenylyl cyclase
regulatory proteins Ns and Ni.
J. Biol. Chem., 259:2039, 1984.

HIROOKA, Y., HOLLANDER, C.S., SUZUKI, S., FERDINAND, P. y JUAN, S.
Somatostatin inhibits release of thyrotropin releasing factor from
organ cultures of rat hypothalamus.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:4509, 1978.

HOKFELT, T., EENDIC, S., HELLERSTROM, C., JOHANSSON, O., LUFT, R. y ARIMURA, A.

Cellular localization of somatostatin in Endocrine-like cells and Neurons of the rat with special References to the A₁-Cells of pancreatic islets and to the Hypothalamus.

Acta Endocrinologica 80:1-41, 1975.

HOLZ, G.G., RANE, G. y DUNLAP, K.

GTP-binding proteins mediate transmitter inhibition of voltage-dependent calcium channels.

Nature, 319:670, 1986.

HOUSLAY, M.D., WALLANCE, A.V., MARCHMONT, R.J., MATIN, B.R. y HEYWORTH, C.M.

Insulin controls intracellular cyclic AMP concentrations in hepatocytes by activating specific cyclic AMP phosphodiesterase; phosphorylation of the peripheral plasma membranes enzyme.

Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorilation, Res., 16:159, 1984.

HOUSLAY, M.D.

The insulin receptor and signal generation at the plasma membrane.

En: Molecular Aspects of cellular regulation, Vol. 4: Molecular Mechanisms of transmembrane signalling. (Eds. Chen, Houslay) Elsevier, Amsterdam, pag. 279, 1985.

HSIA, J.A., MOSS, J., HEWLETT, E.L. y VAUGHAN, M.

ADP-ribosylation of adenylate cyclase by pertussis toxin. Effects on inhibitory agonist binding.

J. Biol. Chem., 259:1086, 1984.

JARRET, H.W. y PENNISTON, J.T.

Partial purification of the (Ca²⁺ - Mg²⁺)-ATPase activator from human erythrocytes: Its similarity to the activator of 3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 77:1210, 1977.

KACZOROWSKI, G.J., COSTELLO, L., DETHMERS, J., TRUMBLE, M.J. y VANDLEND, R.L.

Mechanisms of Ca^{2+} transport in plasma membrane vesicles prepared from cultured pituitary cells. I. Characterization of Na^{+}/Ca^{2+} exchange activity.

J. Biol. Chem., 259:9395, 1984.

KAKIUCHI, S. y YAMAZAKI, R.

Calcium dependent phosphodiesterase activity and its activating factor (PAF) from brain. Studies on cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 41:1104, 1970.

KATADA, T., NORTHUP, J.K., BOKOCH, G.M., VI, M. y GILMAN, A.G.

The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylyl cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition.

J. Biol. Chem., 259:3578, 1984.

KATADA, T.

Two guanine nucleotide-binding protein in rat brain serving as the specific substrate of islet-activating protein pertussis toxin.

J. Biol. Chem., 261:8182, 1986.

KELLY, R.A., O'HARA, D.S., CANESSA, M.L., MITCH, W.E. y SMITH, T.W.

Characterization of digitoxin-like factors in human plasma. Interactions with NaK -ATPase and cross-reactivity with cardiac glycoside-specific antibodies.

J. Biol. Chem., 260:11396, 1985.

KEMMLER, W. y LOEFFLER, G.

Diabetologia, 13:235, 1977.

KEWLWY, C.F., MILLAR, R.P., BERMAN, M.C. y SCHALLY, A.V.

Depolarization and conophore-induced release of octacosyl somatostatin from stalk median eminence synaptosomes.

Science, 213:913, 1981.

KIKUCHI, A., KOZAWA, O., KAIBUCHI, K., KATADA, T., VI, M. y TAKAI, Y.
Direct evidence for involvement of a guanine nucleotide-binding protein
in chemotactic peptide-stimulated formation of inositol bisphosphate
and trisphosphate in differentiated human leukemic (HL-60) cells.
Reconstitution with Gi or Go of the plasma membranes ADP-ribosylated by
pertussis toxin.

J. Biol. Chem., 261:11558, 1986.

KINCAID, R.L., MANGANIELLO, V.C., O'DYA, CH. E., OSBORNE, J.C.,
SMITH-COLEMAN, I.E., DANIELLO, M.A. y VAUGHAN, M.
Purification and properties of calmodulin-stimulated phosphodiesterase
from mammalian brain.

J. Biol. Chem., 259:5158, 1984.

KLEE, C.B., CROUCH, T.H. y KRINKS, M.H.
Subunit structure and catalytic properties of bovine brain Ca^{2+} -
dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase.
Biochemistry, 18:722, 1979.

KNOWLES, A.F., ISLER, R.E. y REECE, J.F.
The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma
membranes.
Biochim. Biophys. Acta, 281:88, 1982.

KOCH, B.D. y SCHONBRUNN, A.
The somatostatin receptor is directly coupled to adenylate cyclase in
GH₄C₁ pituitary cell membranes.
Endocrinology, 114:1784, 1984.

KOCH, B.D., DORFLINGER, L.J. y SCHONBRUNN, A.
Pertussis toxin blocks both cyclic AMP-mediated and cyclic AMP-
independent actions of somatostatin. Evidence for coupling of Ni to
decreases in intracellular free calcium.
J. Biol. Chem., 260:13138, 1985.

KOERKER, D.J., RUCH, W., CHIDECKEL, E., PALMER, J., GOODNER, C.,
ENSICK, J. y GALE, C.C.

Somatostatin: Hypothalamic inhibitor of the endocrine pancreas.
Science, 184:482, 1974.

KRAICER, J. y CHOW, A.E.H.

Release of growth hormone from purified somatotrophs: use of perfusion
system to elucidate interrelations among Ca^{++} , adenosine 3',5'-
monophosphate and somatostatin.

Endocrinology, 111:1173, 1982.

KRANIAS, E.G., BILEZIKJIAN, L.M., POTTER, J.D., PIASCIK, M.T. y
SCHWARTZ, A.

The role of calmodulin in regulation of cardiac sarcoplasmic reticulum
phosphorylation.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 355:279, 1980.

KRISCH, B.

Hypothalamic and extrahypothalamic distribution of somatostatin-
immunoreactive elements in the rat brain.

Cell Tissue Res., 195:499, 1978.

KRISCH, B.

Immunohistochemical results on the distribution of somatostatin in the
hypothalamus and in limbic structures of the rat.

J. Histochem cytochem, 27:1389-90, 1979.

KRULICH, L., DHARIWAL, A. y McCANN, S.

Stimulatory and Inhibitory Effects of Purified Hypothalamic Extracts on
Growth Hormone Release from Rat Pituitary, in vitro.

Endocrinology, 83:783, 1968.

LABRIE, F., BERGEAT, P., GODBOUT, M., BARDEN, N., BEAULIEU, M.,
LAGACE, L., MASSICOTTE, J. y VEILLEUX, R.

Mechanism of action of hypothalamic hormones and interactions with sex
steroides in the anterior pituitary gland.

En: Synthesis and Release of Adenohypophyseal Hormones. Plenum Press,
New York, pag. 415, 1978.

LARSSON, L.I.

Somatostatin cells.

En: Gut Hormons. (Ed. S.R. Bloom, J.M. Polak). Churchill-Livingstone,
Edinburgh, pp. 350, 1981.

LaPOSTOLLE, D.C., TOSCANO, W.A. y STORM, D.R.

Cross-linking of iodine-125 labelled calcium-dependent regulatory
protein to the Ca^{2+} -sensitive phosphodiesterase purified from bovine
heart.

Biochemistry, 18:2821, 1979.

LaBEL, D., POIRIER, G.G., PHANEUF, S., St-JEAN, P., LALIBERTE, J.F. y
BEAUDOIN, A.R.

Characterization and purification of a calcium-sensitive ATP
Diphosphohydrolase from pig pancreas.

J. Biol. Chem., 255:1227, 1980.

LaROITH, D., VINIK, A.I., EPSTEIN, S., BARON, P., OLKENITZKY, M.N. y
PIMSTONE, B.L.

Somatostatin and serum gastrin in normal subjects and in patients with
pernicious anemia, chronic liver disease and renal disease.

S. Afr. Med. J., 49:1601, 1985.

LIN, Y.M., LIU, Y.P. y CHEUNG, W.Y.

Cyclic 3',5'-nucleotide phosphodiesterase Ca^{2+} -dependent formation of
bovine brain enzyme-activator complex.

FEBS Lett., 49:356, 1975.

LIN, Y.M.

Calmodulin.

Molecular and Cellular Biochemistry, 45:101, 1982.

LIN, Y.M. y CHEUNG, W.Y.

Ca²⁺-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase.

Calcium and cell function, vol. IV, chapter 5:79, 1983.

LDGIN, I.S. y JUDD, A.M.

Trophic effects of somatostatin on calcium flux: Dynamic analysis and correlation with pituitary hormone release.

Endocrinology, 119:1703, 1986.

LOLLEY, R.N. y FABER, D.B.

Cyclic nucleotide phosphodiesterase in dystrophia rat retinas: guanosine 3',5'-cyclic monophosphate anomalies during photoreceptor cell degradation.

Expl. Eye. Res., 20:585, 1975.

LOPEZ-RUIZ, M.P., ARILLA, E., GONZALEZ-GUIJARRO, L. y PRIETO, J.C.

Somatostatin binding sites in cytosolic fraction of rabbit intestinal mucosa: distribution throughout the intestinal tract.

Comp. Biochem. Physiol., Vol. 81-B: 1041, 1985.

LDWRY, D.H., ROSEBROUGH, N.I., FARR, A.L. y RANDALL, R.J.

Protein measurement with the Folin-phenol reagent.

J. Biol. Chem., 193:265, 1951.

MAJEREUS, P.W., CONNOLLY, T.M., DECKMYN, H., ROSS, T.S., BROSS, T.E.,
ISHII, H., BANSAL, V.S. y WILSON, D.B.

The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules.

Science, 234:1519, 1986.

MARTIN, J.B.

Inhibitory effect of somatostatin on the release of growth hormone induced in the rat by electrical stimulation.

Endocrinology, 94:497, 1974.

MARTIN, J.B., AUDET, J. y SANDERS, A.

Effects of somatostatin and hypothalamic ventromedial lesions on GH release induced by morphine.

Endocrinology, 96:839, 1975.

MARTIN, T.F.J., LUCAS, D.O., BAJJALIEH, S.M. y KOWALCHYK, J.A.

Thyrotropin-releasing hormone activates a Ca^{2+} -dependent polyphosphoinositide phosphodiesterase in permeable GH₃ cells.

J. Biol. Chem., 261:2918, 1986.

MATTERA, R., PITTS, B.J.R., ENTMAN, M.L. y BIRNBAUMER, L.

Guanine nucleotide regulation of an mammalian myocardial muscarinic receptor system.

J. Biol. Chem., 260:7410, 1985.

MARUYAMA, T. e ISHIKAWA, H.

Somatostatin; its inhibiting effect on the release of hormones and IgG from clonal cells strains its Ca-influx dependence.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 74:1083, 1977.

McCANN, S.M.

Control of anterior pituitary Hormone release by brain peptides.

Neuroendocrinology, 31:355, 1980.

McCORMACK, J.G. y DENTON, R.M.

Ca^{2+} as a second messenger within mitochondria.

Trends in Biochem. Sci., 11:34, 1986.

McDONALD, J.M., CHAN, K.M., GOEWERT, R.G., MOONEY, R.A. y
PERSHANDINGN, H.A.

The $(Ca^{2+} - Mg^{2+})$ -ATPase of adipocyte plasma membrane: regulation by
calmodulin and insulin.

Ann. N.Y. Acad. Sci., 82:381, 1982.

MEANS, A.R. y DEDMAN, J.R.

Calmodulin: an intracellular calcium receptor.

Nature, 285:73, 1980.

MICHELL, B.

Inositol phosphates. Profusion and confusion.

Nature, 319:176, 1986.

MILLER, J.L., FOX, D.A. y LITMAN, B.J.

Amplification of phosphodiesterase activation is greatly reduced by
rhodopsin phosphorylation.

Biochemistry, 25:4983, 1986.

MORGAN, N., FOORD, S.M., SPURLOCK, G., CHARALAMBOUS, B.M., DIEGUEZ, C.,
SCANLON, M.F. y MIR, M.A.

Release of an active sodium transport inhibitor (ASTI) from rat
hypothalamic cells in culture.

Endocrinology, 115:1642, 1984.

MUALLEN, S. y KARLISH, S.J.D.

Studies on the mechanism of regulation of the red-cell Ca^{2+} pump by
calmodulin and ATP.

Biochim. Biophys. Acta, 647:73, 1981.

MULLANEY, I. y CLEGG, R.A.

Cyclic AMP phosphodiesterase and cyclic GMP phosphodiesterase
activities of rat mammary tissue.

Biochem. J., 219:801, 1984.

- NAGASAKA, A., OHKUBO, S. y HIDAHA, H.
3',5'-cyclic nucleotide phosphodiesterase in the bovine pituitary gland.
Biochim. Biophys. Acta, 755:481, 1983.
- NIGGLI, V., ADUNYAH, E.S. y CARAFOLI, E.
Acidic phospholipids, unsaturated fatty acids and limited proteolysis mimic the effect of calmodulin on the purified erythrocyte Ca^{2+} -ATPase.
J. Biol. Chem., 256:8588, 1981.
- NÖRDSTEDT, G., MODE, A., HOKFELT, T., ENEROTH, P., ELDE, R., FERLAND, L., LABRIE, F. y GUSTAFSSON, J.A.
y GUSTAFSSON, J.
Possible Role of Somatostatin in the Regulation of the Sexually Differentiated Steroid Metabolism and Prolactin Receptorin Rat Liver.
Endocrinology, 112:1076, 1983.
- PACE, C.S. y TARVIN, J.T.
Somatostatin: mechanism of action in pancreatic islet β -cells.
Diabetes, 30:836, 1981.
- PALKOVITS, M., BROWNSTEIN, M.J., ARIMURA, A., SATO, H., SCHALLY, A.V. y KIZER, J.S.
Somatostatin content of the hypothalamic ventromedial and arcuate nuclei and the circumventricular organs in the rat.
Brain Res, 109:430, 1976.
- PATEL, Y.C., WEIR, G.C. y REICHLIN, S.
Anatomic distribution of somatostatin in brain and pancreatic islets as studied by radioimmunoassay.
En: Program of the 57th Meeting, pag. 127. American Endocrine Society, 1975.

PATEL, Y.C. y REICHLIN, S.

Somatostatin in Hypothalamus, Extrahypotalamic Brain, and Peripheral Tissues of the rat.

Endocrinology, 102:523, 1978.

PATEL, Y.C., WHEATLEY, T. y NING, C.

Multiple forms of immunoreactive somatostatin; comparison of distribution in neural and nonneural tissues and portal plasma of the rat.

Endocrinology, 109:1943, 1981.

PATEL, Y.C.

A high molecular weight form of somatostatin-28(1-12)-like immunoreactive substance without somatostatin-14 immunoreactivity in the rat pancreas.

J. Clin. Invest., 72:2137, 1983.

PATEL, Y.C. y WHEATLEY, T.

In vivo and in vitro Plasma Disappearance and Metabolism of Somatostatin-28 and Somatostatin-14 in the Rat.

Endocrinology, 112:220, 1983.

PATEL, Y.C., ZINGG, H.H. y SRIKANT, C.B.

Somatostatin-14 immunoreactive forms in the rat: characterization, distribution and biosynthesis.

Somatostatin, (ed. Y.C. PATEL; G.S. TANNENBAUM), New York: Plenum, pag. 510, 1985.

PEAKE, G.T. y SMOAKE, J.A.

Regulation by calmodulin of adenylate cyclase activity in anterior pituitary.

Endocrinology, 116:2098, 1985.

PELLETIER, G., LABRIE, F., ARIMURA, A. y SCHALLY, A.V.

Electron microscopic immunohistochemical localization of growth hormone release inhibiting-hormone (somatostatin) in the rat median eminence. Am. J. Anat., 140:445, 1974.

PELLETIER, G., DUBE, D. y PUVIANI, R.

Somatostatin; Electron microscope Immunohistochemical localization in Secretory Neurons of rat hypothalamus. Science, 196:1469, 1977.

PENNISTON, J.T.

Plasma membranes Ca^{2+} -pumping ATPases. Ann. N.Y. Acad. Sci., 402:296, 1982.

PERSHADSINGH, H.A. y McDONALD, J.M.

$(Ca^{2+} + Mg^{2+})$ -ATPase in adipocyte plasmalemma; Inhibition by insulin and concanavalin, A in the intact cell. Biochem. Int., 2:243, 1981.

PLDNIKOFF, N.D., KASTIN, A.J. y SCHALLY, A.V.

Growth hormone release inhibiting hormone; nemopharmacological studies. Pharmacol. Biochem. Behav., 2:693, 1974.

PRADAYROL, L., JORNVAL, H., MUTT, V. y RIBET, A.

N-terminally extended somatostatin; the primary structure of somatostatin-28.

FEBS Lett., 109:55, 1980.

RASMUSSEN, H., JENSEN, P., LAKE, W., FRIEDMAN, N. y GOODMAN, D.B.P.

Cyclic nucleotides and cellular calcium metabolism.

Adv. Cyclic. Nucleotide. Res., 5:375, 1975.

REICHLIN, S.

Somatostatin in the nervous system.

En; Molecular Genetic Neuroscience. (Bloom, F.E., Schmitt, F.D. eds.), New York, Raven Press, pag. 359, 1982.

REICHLIN, S.

Somatostatin.

New. Eng. J. Med., 309:1495, 1983.

REISINE, T., HEISLER, S., HOOK, V.Y.H. y AXELROD, J.

Multireceptor-induced release of adrenocorticotropin from anterior pituitary tumor cells.

Biochem. Biophys. Res. Commun., 108:1251, 1982.

REISINE, T. y AXELROD, J.

Prolonged somatostatin pretreatment desensitizes somatostatin's inhibition of receptor-mediated release of adrenocorticotropin hormone and sensitizes adenylate cyclase.

Endocrinology, 113:811, 1983.

REISINE, T.

Multiple mechanisms of somatostatin inhibition of adrenocorticotropin release from mouse anterior pituitary tumor cells.

Endocrinology, 116:2259, 1985.

RENAUD, L.P., BRAZEAU, P. y MARTIN, J.B.

Depressant action of TRH, LHRH and somatostatin on the activity of central neurons.

Nature, 225:233, 1975.

RENAUD, L.P.

Influence of amygdala stimulation on the activity of identified tuberoinfundibular neurons in the rat hypothalamus.

J. Physiol, 260:237, 1976.

RENAUD, L.P.

Electrophysiology of brain peptides.

En: Brain Peptides: a new endocrinology. (eds. Gotto, A.M. Jr., Peck, E.J. Jr., Boyd, A.E. III). Amsterdam: Elsevier / North Holland, pag. 119, 1979.

REUNTER, H.

Calcium channel modulation by neurotransmitters, enzymes and drugs.
Nature, 301:569, 1983.

REYL-DESMARS, F. y LEWIN, M.S.M.

Evidence for an intracellular somatostatin receptor in pancreas: a comparative study with reference to gastric mucosa.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 109:1324, 1982a.

REYL-DESMARS, F. y LEWIN, M.S.M.

Intracellular receptor for somatostatin in gastric mucosal cells: Decomposition and reconstitution of somatostatin-stimulated phosphoprotein phosphatases.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 79:978, 1982b.

RICHARDSON, V.I. y SCHONBRUNN, A.

Inhibition of adrenocorticotropin secretion by somatostatin in pituitary cells in culture.
Endocrinology, 108:281, 1981.

RIVIER, J., BRAZEAU, P. y VALE, W.

Total Synthesis in Solid Phase of a Tetradecapeptide Having the Chemical and Biological Properties of Somatostatin.
C.R. Acad. Sci. Ser., D276:2737, 1973

RIVIER, J., BRAZEAU, P. y VALE, W.

Somatostatin Analogs. Relative Importance of the Disulfide Bridge and of the Ala-Gly Side Chain for Biological Activity.
J. Med. Chem., 18:123, 1975

ROBBERECHT, P., DESCHODT-LANCKMAN, M., De NEEF, P. y CHRISTOPHE, J.

Effects of somatostatin on pancreatic exocrine function. Interaction with secretin.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 67:315, 1975.

ROBINSON, G.A., BUTCHER, R.W. y SUTHERLAND, E.W.
Cyclic AMP.
Academic press, New York, 1971.

RORSTAD, D.P., BROWNSTEIN, M.J. y MARTIN, J.B.
Immunoreactive and biologically active somatostatin-like material in
rat retina.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3019, 1979.

ROSIC, N.K., STANDAERT, M.L. y POLLET, R.J.
The mechanism of insulin stimulation of (Na⁺, K⁺) ATPase transport
activity in muscle.
J. Biol. Chem., 260:6206, 1985.

ROUFGALIS, B.D., ELLIOTT, C.T. y RALSTON, G.B.
Characterization of a (Ca²⁺ - Mg²⁺) ATPase activator bound to human
erythrocyte membranes.
Cell Calcium, 5:77, 1984.

ROULEAU, D. y BARDEM, N.
Inhibition of anterior pituitary prostaglandin-stimulated adenylate
cyclase activity by somatostatin.
Can. J. Biochem., 59:307, 1981.

RUGGERE, M.D. y PATEL, Y.C.
Hepatic Metabolism of Somatostatin-14 and Somatostatin-28;
Immunochemical characterization of the Metabolic Fragments and
Comparison of Deavage Sites.
Endocrinology, 117:88, 1985a.

RUGGERE, M.D. y PATEL, Y.C.
Somatostatin Merabolism by the Isolated Rat Lung.
Endocrinology, 117:1870, 1985b.

- SAKAI, T., YAMANAKA, H., TANAKA, R., MAKINE, H. y KASI, H.
Stimulation of cyclic nucleotide phosphodiesterase from rat brain by
activator protein, proteolytic enzymes and a vitamin E derivative,
Biochem. Biophys. Acta, 483:121, 1977.
- SAKAMOTO, Ch., GOLDFINE, I.D. y WILLIAMS, J.A.
The Somatostatin Receptor on Isolated Pancreatic Acinar Cell Plasma
Membranes. Identification of Subunit Structure and Direct Regulation
By Cholecystokinin,
J. Biol. Chem., 259:9623, 1984.
- SARANKATIS, D. y McKINLEY, W.
Total Synthesis of Hypotalamic Somatostatin,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 54:234, 1973.
- SARANKATIS, D., McKINLEY, W. y GRANT, N.
The Synthesis and Biological Activity of Ala³⁻¹⁴-Somatostatin,
Biochem. Biophys. Res. Commun., 55:538, 1973.
- SCHALLY, A.V., HUANG, W.Y., CHANG, R.C.C., ARIMURA, A., REDDING, T.W.,
MILLAR, R.P., HUNKAPILLER, M.W. y HOOD, L.E.
Isolation and structure of prosomatostatin: a putative somatostatin
precursor from pig hypothalamus,
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4489, 1980.
- SCHARFF, O., FODER, B. y SKIBSTED, V.
Two states of Ca²⁺ ATPase and activation of Ca²⁺ pump of human
erythrocytes,
Acta Physiol. Latinoam., 32:253, 1982.
- SCHATZMAN, H.J.
The plasma membrane calcium pump of erythrocytes and other animal
cells,
En: Membrane Ca²⁺-transport, (Ed. E. Carafoli), pag. 41, Academic
Press, New York, 1981.

SCHLEGEL, W., WUARIN, F., ZBAREN, C. y ZAHND, G.R.

Lowering of cytosolic free Ca^{2+} by carbachol, a muscarinic cholinergic agonist, in clonal pituitary cells (GH₃ Cells).

Endocrinology, 117:976, 1985.

SCHONBRUNN, A. y TASHJIAN, A.H.

Characterization of Functional Receptors for Somatostatin in Rat Pituitary Cells in Culture.

J. Biol. Chem., 253:6473, 1978.

SCHONBRUNN, A. y TASHJIAN, A.H.

Modulation of somatostatin receptors by thyrotropin-releasing hormone in a clonal pituitary cell strain.

J. Biol. Chem., 255:190, 1980.

SCHONBRUNN, A.

Glucocorticoids down-regulate somatostatin receptors on pituitary cell in culture.

Endocrinology, 110:1147, 1982.

SCHONBRUNN, A, PORSTAD, D.P, WESTENDORF, M.J. y MARTIN, J.B.

Somatostatin analogs: correlation between receptor binding affinity and Biological potency in GH pituitary Cells.

Endocrinology, 113:1559, 1983.

SEGAL, D.S. y MANDELL, A.J.

The thyroid axis drugs and behavior.

(A.J. Prange, ed.), Raven Press, New York, pag. 129, 1974.

SHAPIRO, B., SHEPPARD, H., KRONHEIM, S. y PIMSTONE, B.L.

Transrenal gradient of serum somatostatin-like immunoreactivity in the rat.

Horm. Metab. Res., 10:356, 1978.

- SHARMA, R.K. y WANG, J.H.
Differential regulation of bovine brain calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes by cyclic AMP-dependent protein kinase and calmodulin dependent-phosphatase.
Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 82:2603, 1985.
- SHEPARD, M., SPENCE, J.W. y KRAICER, J.
Release of growth hormone from purified somatotrophs; role of adenosine 3',5'-monophosphate and guanosine 3',5'-monophosphate.
Endocrinology, 105:261, 1979.
- SHEPARD, M., MOOR, B.C. y KRAICER, J.
Release of growth hormone (GH) from purified somatotrophs; Interaction of GH-releasing factor and somatostatine and role of adenosine 3',5'-monophosphate.
Endocrinology, 117:2364, 1985.
- SILER, T.M., VANDENBERG, G., YEN, S.S.C., BRAZEAU, P., VALE, W. y GUILLEMIN, R.
Inhibition of growth hormone release in humans by somatostatin.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 37:632, 1973.
- SILER, T.M., YEN, S.S.C., VALE, W. y GUILLEMIN, R.
Inhibition by somatostatin on the release of TSH induced in man by Thyrotropin releasing-factor.
J. Clin. Endocrinol Metab., 38:742, 1974.
- SKAMENE, A. y PATEL, Y.C.
Infusion of graded concentrations of somatostatin-14 in man: Pharmacokinetics and differential inhibitory effects on pituitary and islets hormones.
Clin. Endocrinol., 20:555, 1984.

SMITH, CH.D., COX, C.C. y SNYDERMAN, R.

Receptor-coupled activation of phosphoinositide-specific phospholipase C by an N protein.

Science, 232:97, 1986.

SOBUE, K., ICHIDA, S., YOSHIDA, H., YAMAZAKI, R. y KAKIUCHI, S.

Occurrence of a Ca^{2+} -and modulator protein-activable ATPase in the synaptic plasma membranes of the brain.

FEBS Lett., 99:199, 1979.

SPADA, A, VALLAR, L. y GIANNATTASIO, G.

Presence of an adenylate cyclase dually regulated by somatostatin and human pancreatic growth hormone (GH)-releasing factor in GH-secreting cells.

Endocrinology, 115:1203, 1984.

SRIKANT, C.B. y PATEL, Y.C.

Somatostatin Receptors: Identification and characterization in rat brain membranes.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 78:3930, 1981a.

SRIKANT, C.B. y PATEL, Y.C.

Receptor binding of somatostatin-28 is tissue specific.

Nature, 294:259, 1981b.

SRIKANT, C.B. y PATEL, Y.C.

Characterization of Pituitary Membrane Receptors for Somatostatin in the Rat.

Endocrinology, 110:2138, 1982.

SRIKANT, C.B. y PATEL, Y.C.

Cysteamine-induced depletion of brain somatostatin is Associated with up-regulation of cerebrocortical somatostatin receptors.

Endocrinology, 115:990, 1984.

SRIKANT, C.B. y PATEL, Y.C.

Somatostatin Receptors in the Rat Adrenal Cortex; Characterization and Comparison with Brain and Pituitary Receptors.
Endocrinology, 116:1717, 1985a.

SRIKANT, C.B. y PATEL, Y.C.

Somatostatin Receptors.

En; Somatostatin. Advances in experimental Medicine and Biology, Vol. 188, 1985b.

STADMAN, E.R.

Oxidation of proteins by mixed-function oxidation systems; implication in protein turnover, ageing and neurotrophil function.
Trends in Biochem. Sci., 11:11, 1986.

STANGE, F.E., SCHEIDER, A, SCHUSDZIARRA, V. y DITSCHUNEIT, H.

Inhibitory effects of somatostatin on growth and differentiation in cultured intestinal mucosa.
Horm. Metab. Res., 16:74, 1984.

SULLIVAN, K.A., LIAD, Y-CH., ALBORZI, A., BEIDERMAN, B., CHANG, F., MASTERS, S.B., LEVINSON, A.D. y BOURNE, H.R.

Inhibitory and stimulatory G proteins of adenylate cyclase: cDNA and amino acid sequences of the α chains.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:6687, 1986.

SUTHERLAND, E.W. y RALL, T.V.

The properties of and adenine ribonucleotide produced with cellular particles, ATP, Mg^{2+} and epinephrine or glucagon.
J. Am. Chem. Soc., 79:3608, 1957.

SUTHERLAND, E.W. Y RALL, T.V.

Fractionation and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide and characterization of a cyclic adenine ribonucleotide formed by tissue particles.
J. Biol. Chem., 232:1077, 1958.

TABATA, M., SHIMA, K., TANAKA, R., OTA, T., TANAKA, A., SHIMOMURA, Y., SAWAZAKI, N. y KUMAHARA, Y.

The tissue distribution of immunoreactive somatostatin in different species; with special reference to gastrointestinal somatostatin.

Folia Endocrinal J.P.N., 56:662, 1980.

TAKEMOTO, D.J., HANSEN, J., TAKEMOTO, L.J. y HOUSLAY, M.D.

Peptide mapping of multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase.

J. Biol. Chem., 257:14597, 1982.

TAPIA-ARANCIBIA, L. y REICHLIN, S.

VIP and PHI stimulate somatostatin release from rat cerebral cortical and diencephalic cells in dispersed culture.

Brain, Res., 336:67, 1985.

TARBOSKY, G.I. y ENSINCK, J.W.

Extraction of Somatostatin by the Pancreas.

Endocrinology, 112:303, 1983.

TASHJIAN, Jr.A.H., YASUMARU, Y., LEVINE, L., SATO, G.H. y PARKER, M.L.

Establishment of clonal strains of rat pituitary tumor cells that secrete growth hormone.

Endocrinology, 82:342, 1968.

TASHJIAN, Jr.A.H., BANCROFT, F.C. y LEVINE, L.

Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells; differential effects of hydrocortisone and tissue extracts.

J. Cell. Biol., 47:61, 1970.

TASHJIAN, Jr.A.H.

Clonal strains of hormone producing pituitary cells.

Methods in Enzymol, 58:527, 1979.

THOMPSON, W.J. y APPELMAN, M.M.

Multiple cyclic nucleotide phosphodiesterase activities from rat brain.
Biochemistry, 10:311, 1971a.

THOMPSON, W.J. y APPELMAN, M.M.

Characterization of cyclic nucleotide phosphodiesterase of rat tissues.
J. Biol. Chem., 246: 3145, 1971b.

TORO, M.J.

Tesis doctoral: Efectos de la administración aguda de TRH y somatostatina sobre la distribución subcelular de calmodulina y de actividades enzimáticas dependientes de calmodulina en adenohipófisis de rata, 1983.

TORO, M.J., SALINAS-FANDO, M. y MONTOYA, E.

Postnatal development of calmodulin and calmodulin-dependent phosphodiesterase in different regions of the rat central nervous system.

Int. J. Devl. Neuroscience, 3:647, 1985.

TORO, M.J., BIRNBAUMER, L., RENDON, M.C. y MONTOYA, E.

Somatostatin. Mechanism of action.

Hormone Res. (En Prensa).

TYRREL, J.B., LORENZI, M., GERICH, J.E. y FORSHAM, P.H.

Inhibition by somatostatin on ACTH secretion in Nelson's syndrome.

J. Clin. Endocrinol. Metab., 40:1125, 1975.

VALE, W., RIVIER, C., PALKOVITS, M., SAAVEDRA, J.M. y BROWNSTEIN, M.

Ubiquitous brain distribution of inhibitors of adenohipophysial secretion.

En: The Endocrine Society Program of the 56th Annual Meeting, Atlanta, nº 146 (Abstract), 1974a.

- VALE, W., RIVIER, C., BRAZEAU, P. y GUILLEMIN, R.
Effects of somatostatin on the secretion of thyrotropin and prolactin.
Endocrinology, 95:968, 1974b.
- VALE, W., LING, N., RIVIER, J., VILLAREAL, J., RIVIER, C. y DOUGLAS, C.
Somatostatin.
Metabolism, 25:1491, 1976.
- VALE, W., RIVIER, C. y BROWN, M.
Regulatory peptides of the hypothalamus.
Annu. Rev. Physiol., 39:473, 1977.
- VALE, W., RIVIER, J., LING, N. y BROWN, M.
Biologic and immunologic activities and applications of somatostatin
analogs.
Metabolism, 27:1391, 1978.
- VANAMAN, T.C.
Structure, function and evolution of calmodulin.
Calcium and cell function., Vol. 1, Chapter 3, pag.: 41, 1980.
- VEBER, D.F., HOLLY, F.W., NUTT, R.F., BERGSTRAND, S.J., BRADY, S.F.,
HIRSCHMAN, R., GLITZER, M.S. y SAPERSTEIN, R.
Highly active cyclic and bicyclic somatostatin analogues of reduced
ring size.
Nature, 280:512, 1979.
- VERMA, A.K. y PENNISTON, J.T.
A high affinity Ca^{2+} -stimulated and Mg^{2+} -dependent ATPase in rat corpus
luteum plasma membrane fractions.
J. Biol. Chem., 256:1269, 1981.
- WESTENDORF, J.M. y SCHONBRUNN, A.
Bombesin stimulates prolactin and growth hormone release by pituitary
cells in culture.
Endocrinology, 110:352, 1982.

YAJIMA, Y., AKITA, Y. y SAITO, T.

Pertussis toxin blocks the inhibitory effects of somatostatin on cAMP-dependent vasoactive intestinal peptide and cAMP-independent thyrotropin releasing hormone-stimulated prolactin secretion of GH₃ cells.

J. Biol. Chem., Vol. 261/6:2684, 1986.

YAMANE, T.

Statistic. An Introductory abalysis.

Harper and Row, New York, 1970.

YATANI, A., CODINA, J., BROWN, A.M. y BIRNBAUMER, L.

Direct activation of mammalian atrial muscarinic potassium channels by GTP regulatory protein G_k.

Science, 235:207, 1987.

YEN, S.S.C., SILER, T.M. y DeVANE, G.W.

Effect of somatostatin in patients with acromegaly. Suppression of growth hormone, prolactin, insulin and glucose levels.

N. Engl. J. Med., 290:935, 1974.

FE DE ERRATAS

<u>Pág.</u>	<u>Línea</u>	<u>Donde dice</u>	<u>Debe decir</u>
153	-7	Componenete	Componente
136	-13	(fig. 12)	(fig. 11)
121	-2	(0.001, 0.01)	(0.01, 0.1)
80	1	Tabla 2	Tabla 1
79	1	Tabla 1	Tabla 2

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. MARIA DEL CARMEN RENDON UNCOTA titulada "VARIACIONES DE LAS ACTIVIDADES FOLFODIESTERASA Y ATPASA TRAS LA ADMINISTRACION DE SOMATOSTATINA EN CORONES E HIPOFISIS DE RATA" acordó otorgarle la calificación de APTO "CUM LAUDO" (POR UNANIMIDAD)

Sevilla,

10 de JULIO

19 87

El Vocál,

El Vocal,

El Vocal,

[Signature]

[Signature]

[Signature]

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,

[Signature]

[Signature]

[Signature]



UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672523