



**EFFECTO FARMACOLOGICO DE INHIBIDORES DE  
CALMODULINA SOBRE LOS NIVELES DE RNA<sup>m</sup> DE  
PROLACTINA INCREMENTADOS POR EL 17 B-ESTRADIOL**

**T E S I S**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS  
CON ESPECIALIDAD EN**

**BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA**

**PRESENTA**

**Q.B.P. ROSA PATRICIA HERNANDEZ TORRES**

**MONTERREY, N.L.  
MAYO DE 1990**



TM

Z6658

FM

1990

H4



1020091096



DIRECCION GENERAL DE  
ESTUDIOS DE POSTGRADO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA



EFECTO FARMACOLOGICO DE INHIBIDORES DE  
CALMODULINA SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE  
PROLACTINA INCREMENTADOS POR EL 17  $\beta$ -ESTRADIOL

T E S I S

QUE EN OPCION AL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

CON ESPECIALIDAD EN

BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA

P R E S E N T A

Q.B.P. ROSA PATRICIA HERNANDEZ TORRES

Monterrey, N.L.  
Mayo de 1990

TM  
26658  
FM  
1990  
44



FONDO TESIS

63114

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE MEDICINA

EFFECTO FARMACOLOGICO DE INHIBIDORES DE  
CALMODULINA SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE  
PROLACTINA INCREMENTADOS POR EL 17  $\beta$ -ESTRADIOL

T E S I S

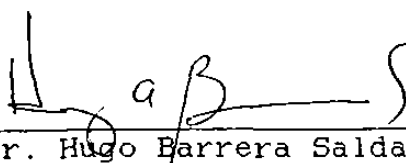
QUE EN OPCION AL TITULO DE


MAESTRO EN CIENCIAS  
con especialidad en  
BIOLOGIA MOLECULAR E INGENIERIA GENETICA


P R E S E N T A

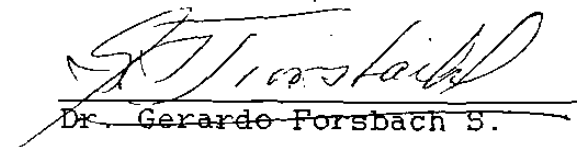
Q.B.P. Rosa Patricia Hernández Torres

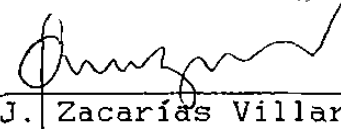
COMISION DE TESIS

  
Dr. Hugo Barrera Saldaña

  
Dr. Abraham Martínez Campos

  
Dra. Herminia Martínez R.

  
Dr. Gerardo Forsbach S.

  
Dr. J. Zacarías Villarreal

*El discípulo: Por qué aprender algo nuevo una semana antes de morir?*

*El maestro: Exactamente por la misma razón por la que quieres aprender algo nuevo cincuenta años antes de morir.*

En "La Oración de la Rana" de Anthony de Mello.



*A Dios.*

Creador del Universo y de la Vida.

*A mi padre.*

Alfonso Hernández Cardona.

He aceptado tu ausencia, pero sigues viviendo en mí. De una manera constante recuerdo tu vida, tus enseñanzas y me vitaliza el amor que me prodigaste. Fuimos tus hijos la fuerza principal de tu obra. Tú, en mí, eres una fuerza importante. Por lo que fuiste, por lo que eres, este avance de mi vida es por tí.

*A mi madre.*

Catalina Torres Zubía de Hernández.

Con gran sabiduría, entregándote a tus hijos y apoyándonos siempre has formado una familia unida y exitosa. Mi familia: éxito tuyo y de mi padre, pero que desde hace 12 años tu sostienes es fundamental en mí. Tuyo este logro, porque es parte de tu éxito.

*A mis hermanos:*

Alfonso y Concepción, Catalina y Benjamín, Amalia, Ana María, Carolina, Luis y Rosalía, y Mónica.

Por las satisfacciones y alegrías que me prodigan.  
Por el cariño que de Ustedes tengo.  
Por el apoyo con el que siempre cuento.

*A mis sobrinos.*

Elizabeth, Caty, Laura, Teresa, Luis y David.

.Por ser una gran fuente de alegría.

*A mis amigos y familiares*

Son parte sustancial en mi vida.

Dr Gerardo Forsbach Sánchez.

Se que una de las máximas en su vida es: *Triunfar en la vida es ayudar a triunfar.*" El apoyo que de Usted recibí como Jefe de la Unidad, como su becaria y como coasesor fué un testimonio de ello. A Dios agradezco ser su alumna. A Usted mi reconocimiento por su alta calidad humana y profesional; y un autocompromiso para no defraudarlo.

El presente trabajo se desarrolló en la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS, y en la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genética del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, bajo la asesoría del Dr. Hugo A. Barrera Saldaña y la coasesoría de los Drs. Abraham Martínez Campos y Gerardo B. Forsbach Sánchez.



## INDICE

Agradecimientos.....	i
Lista de abreviaturas.....	ii
Lista de figuras.....	iii
Lista de tablas.....	iv
I. Resumen.....	1
II. Introducción.....	2
II.a. Antecedentes generales.....	3
II.b. Antecedentes particulares.....	4
III. Objetivo.....	6
IV. Hipótesis.....	6
V. Material y métodos	
V.a. Origen de los reactivos.....	7
V.b. Material biológico.....	7
V.c. Procedimientos experimentales.....	7
V.c.1. Preparación del rastreador molecular: pPrl-1..	7
V.c.2. Tratamiento de los animales.....	7
V.c.3. Aislamiento y caracterización del RNA hipofisario.....	9
V.c.4. Detección del RNAm de PRL de rata.....	14
V.c.5. Evaluación de los resultados.....	14
V.d. Técnicas.....	16
VI. Resultados	
VI.a. Preparación del rastreador molecular.....	30
VI.b. Efecto de una dosis de trifluoperazina.....	30
VI.c. Efecto de cinco dosis de trifluoperazina.....	33
VI.d. Efecto de cinco dosis de W <sub>7</sub> .....	45
VI.e. Efecto de una dosis de metoclopramida.....	45
VII. Discusión y conclusiones.....	56
VIII. Perspectivas.....	59
IX. Bibliografía.....	61
Apéndices	
i Preparación de reactivos y soluciones.....	66
ii Mapa de restricción de pPrl-1.....	72

QUIERO AGRADECER A:

La Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS,

La oportunidad de ser Becaria de Investigación por 4 años. La formación que recibí y la que me dejó desarrollar. El apoyo que me brindó para obtener el grado y para que realizara la tesis. Por la beca.

Atención especial dirijo al Departamento de Biología Celular, al cual estuve adscrita y que a cargo del Dr. Salvador Said en mucho me apoyó. Al Bioterio, integrado por el Dr. Arturo Guerrero, Francisco Resendiz y Mateo Bravo, por sus servicios para proveerme de las ratas. A Mateo, mi especial reconocimiento por su apoyo para sacrificar las ratas. Al Dr. Antonio Luna encargado del Departamento de Fotografía y Dibujo, por sus trabajos proporcionados siempre de una manera atenta y con su ya reconocida alta calidad.

A la Unidad de Laboratorios de Ingeniería y Expresión Genéticas (ULIEG), Facultad de Medicina, UANL.

Por la disponibilidad total que tuve de sus laboratorios para lo requerido por la tesis. Porque lograron hacerme sentir "en casa".

A la Escuela de Medicina "Ignacio A. Santos", ITESM.

Por su apoyo a través de la adquisición de algunos reactivos y por la disponibilidad de sus servicios bibliotecarios.

Al Departamento de Biología de la Reproducción, del Hospital Universitario.

Por su apoyo para las cuantificaciones del  $^{32}\text{P}$  en el contador de centelleo líquido.

## MI AGRADECIMIENTO.

Al Dr. Hugo A. Barrera Saldaña.

Porque gracias a su apoyo para ingresar a esta Maestría y a su asesoría técnica me adentré en un área de estudio y recibí una capacitación que además de agradarme mucho, me será de amplia utilidad en mi desarrollo profesional.

. Al Dr. Abraham Martínez Campos.

Por su asesoría. Fué una labor por la que se establecieron muchas horas de interacción en las que no solo me transmitió su línea de investigación, sino también consejos útiles y un testimonio de vida, los cuales dejando huella en mí, serán aplicables.

A la Dra. Herminia G. Rodríguez.

Por su sincera preocupación y por su ayuda en mi desarrollo durante la Maestría. Por sus valiosos consejos y críticas al manuscrito de la tesis.

Al Dr. J. Zacarías. Por el interés al trabajo y críticas al manuscrito de la tesis.

A mis ex-compañeros de laboratorio y desde entonces y para siempre mis amigos:

Felipe, Ramiro, Diego, Diana, Rocío, Alfredo, Manuel, Kiwi, Jaime, Julie, Roberto, Odila, Tomás, Eddy, Claudio, Ataulfo, Ricardo, Rosy, Carmen, Víctor y Juan Ramón.

A Socorrito Valles, Mirtala, Leonor, Raúl y Jesús.

Por el apoyo asistencial que siempre me brindaron amablemente.

A Tirso Gutierrez, Victor Batiza, David Cantú, y Fernando Font.

Por su ayuda entusiasta en algunas de las fases de la tesis.



## LISTA DE ABREVIATURAS.

CaM	calmodulina
Ci/mol	Curies/mol
cpm	cuentas por minuto
DA	dopamina
DEP	dietilpirocarbonato
DMSO	dimetilsulfóxido
E <sub>2</sub>	17 β-estradiol
EDTA	ácido etilendiaminotetracético
g	gramo
Kg	kilogramo
M	molar
mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
mm	milímetro
MTC	metoclopramida
ug	microgramo
ul	microlitro
ng	nanogramo
nM	nanomolar
pH	potencial de hidrógeno
PRL	prolactina
rpm	revoluciones por minuto
S	unidades Svedverg
seg	segundos
TFP	trifluoperazina
TRH	hormona liberadora de la tirotrópina
UV	ultravioleta
Xg	veces la gravedad
W <sub>7</sub>	N-6(6-aminohexyl)5-cloro nafalene-sulfonamida

## LISTA DE FIGURAS.

1.	Procedimiento experimental para la preparación del rastreador molecular: pPrl-1.....	8
2.	Procedimiento experimental para la detección del RNAm de la PRL.....	15
3.	Ejemplo del perfil electroforético de RNAs recuperados de las adenohipófisis de las ratas del experimento I.....	32
4.	Autorradiograma de la hibridación en mancha entre los RNAs de las adenohipófisis de las ratas del experimento I y <sup>32</sup> P-pPr-1.....	34
5.	Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento I y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	35
6.	Ejemplo del perfil electroforético de RNAs recuperados de las adenohipófisis de las ratas del experimento IIa.....	37
7.	Autorradiograma de la hibridación en mancha entre los RNAs del experimento IIa y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	38
8.	Gráfica de la cuantificación del RNAm de la PRL de rata del experimento IIa mediante hibridación y espectrofotometría en centelleo líquido.....	41
9.	Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IIa y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	42
10.	Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IIa y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	43
11.	Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IIb y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	46
12.	Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento III y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	48
13.	Autorradiograma de la hibridación en mancha entre los RNAs del experimento IV y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	50
14.	Autorradiograma de la hibridación en línea entre los RNAs del experimento IV y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	51
15.	Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IV y <sup>32</sup> P-pPrl-1.....	53
16.	Gráfica de la cuantificación del RNAm de la PRL de rata del experimento IV mediante hibridación y espectrofotomtría en centelleo líquido.....	55

LISTA DE TABLAS.

1.	Esquema del tratamiento para evaluar el efecto de TFP sobre los niveles de RNAm de PRL.....	10
2.	Esquema del tratamiento para evaluar el efecto de diferentes dosis de TFP sobre los niveles de RNAm de PRL.....	11
3.	Esquema del tratamiento para evaluar el efecto de diferentes dosis de W, sobre los niveles de RNAm de PRL.....	12
4.	Esquema de tratamiento para evaluar el efecto de la MTC sobre los niveles de RNAm de PRL.....	13
5.	Evaluación de los RNAs purificados a partir de las adenohipófisis de las ratas del Experimento I.....	31
6.	Evaluación de los RNAs purificados a partir de las adenohipófisis de las ratas del Experimento IIa.....	36
7.	Valores cuantitativos del incremento del RNAm de PRL de rata del Experimento IIa.....	39
8.	Evaluación de los RNAs purificados a partir de las adenohipófisis de las ratas del Experimento IIb.....	44
9.	Evaluación de los RNAs purificados a partir de las adenohipófisis de las ratas del Experimento III.....	47
10.	Evaluación de los RNAs purificados a partir de las adenohipófisis de las ratas del Experimento IV.....	49
11.	Valores cuantitativos del Incremento del RNAm de PRL de rata del Experimento IV.....	54



## I RESUMEN.

La investigación del mecanismo de acción intracelular del  $E_2$  ha involucrado paulatinamente primero la participación de calcio iónico y posteriormente la de la CaM. El presente trabajo evaluó en ratas macho Sprague-Dawley la acción de la TFP, el  $W_7$  y la MTC sobre los niveles basales de RNAm de PRL y sobre los inducidos por el  $E_2$ . Dos de los fármacos tienen acción inhibitoria de CaM: la TFP y el  $W_7$ , y dos tienen acción antidopaminérgica: la TFP y la MTC. La hipótesis de trabajo afirmó que la administración farmacológica de la TFP y el  $W_7$  bloquearían el efecto del  $E_2$ . Se ensayaron 5 dosis de TFP, 5 de  $W_7$  y una de MTC. Se purificó el RNA de las adenohipófisis de las ratas y el RNAm de la PRL se evaluó por las técnicas de transferencia en mancha, en línea y tipo Northern utilizando como rastreador molecular a  $^{32}P$ -pPrl-1. Los resultados fueron los siguientes: El grupo de ratas tratadas con aceite y con solución salina presentaron niveles similares de RNAm de PRL y el tratado con  $E_2$  incrementados marcadamente. La TFP estimuló los niveles basales conforme aumentó la dosis y el  $W_7$  no los modificó. La MTC también estimuló los niveles basales de RNAm de la PRL. El incremento ocasionado por la TFP y la MTC a los niveles basales no fué superior al promovido por el  $E_2$ . La TFP y el  $W_7$  bloquearon la acción del  $E_2$ . La potencia de la TFP disminuyó conforme aumentó la dosis. El efecto antiestrogénico del  $W_7$  fué total con todas las dosis. La MTC potenció el efecto del  $E_2$ . Conscientes de las limitaciones del modelo, consideramos no obstante, que en el bloqueo a la acción estimuladora del  $E_2$  contribuyó la actividad inhibitoria de CaM que tienen la TFP y el  $W_7$  y proponemos su ensayo en el modelo del tumor prolactinéxico inducido por tratamiento crónico con  $E_2$  en las ratas Fisher.

## II. INTRODUCCION

Por medio de las hormonas, el sistema endócrino es capaz de determinar y/o modificar el metabolismo celular y con ello el del organismo. Para este efecto las hormonas una vez que son producidas y secretadas por las glándulas endócrinas correspondientes, "viajan" por vía sanguínea hasta el órgano efector cuyas células contienen los receptores específicos para ellos (20). Unida la hormona al receptor, se desencadena una serie de reacciones intracelulares en respuesta a la señal dictada por la hormona. Este mecanismo de acción intracelular es mediado por moléculas que han recibido el nombre de "segundos mensajeros", de los cuales se han identificado: el AMP cíclico, el diacélglicerol, el inositoltrifosfato y el calcio (20). Este último generalmente actúa uniéndose a la calmodulina (CaM) para activarla (54). La respuesta celular a la acción de las hormonas es dosis dependiente, por lo cual para el funcionamiento óptimo de un organismo es crítica la regulación de su secreción. Los niveles séricos de las hormonas están determinados por diversos factores, como la interacción estimulación-inhibición entre ellas, los niveles plasmáticos de algunos metabolitos y compuestos sanguíneos, y en algunos casos por neurotransmisores del sistema nervioso central (20).

En la actualidad existe interés en detallar el mecanismo de acción intracelular de los factores que inducen o inhiben la producción de PRL. La investigación en esta área, además de contribuir para comprender mejor la fisiología de los lactotropos, puede ser de gran utilidad para estudios donde se busque aclarar la etiología de la hiperprolactinemia, así como de alternativas en su tratamiento.

En el presente trabajo exploramos el mecanismo de acción de los estrógenos en la inducción de la secreción de PRL y en el cual algunos antecedentes realizados en cultivo de células nos sugerían la participación de la CaM (32). En un modelo con ratas macho Sprague-Dawley evaluamos el efecto de la trifluoperazina (TFP) y del N-6(6 aminohexyl)-5-Cloro-napftalenosulfonamida (W<sub>3</sub>) sobre la producción del RNAm de PRL. La TFP es un fármaco que tiene acciones de antagonista dopaminérgico (19) e inhibidor de CaM (56). La acción del W<sub>3</sub> sobre la producción de PRL no se ha aún informado, pero se le ha encontrado capacidad para inhibir CaM (18). El efecto farmacológico lo estudiamos tanto en condiciones basales de síntesis de PRL, como en condiciones de niveles incrementados de PRL por efecto del 17  $\beta$ - estradiol (E<sub>2</sub>). Igualmente evaluamos el efecto de la metoclopramida (MTC), cuya acción farmacológica es antidopaminérgica (19), mas no inhibidora de CaM (22).

## II.a. ANTECEDENTES GENERALES

En el hombre, la hipófisis está localizada en la silla turca siendo sus dimensiones aproximadas de 10 mm X 13 mm X 6 mm y 0.5 g su peso. Anatómicamente está dividida en dos regiones: la neurohipófisis y la adenohipófisis. La neurohipófisis es la terminación de un grupo de axones de neuronas localizadas en el hipotálamo; los axones en su trayecto del hipotálamo a la hipófisis forman un tallo denominado tallo hipotálamo-hipofisario. La neurohipófisis secreta las hormonas peptídicas oxitocina y vasopresina. La adenohipófisis está constituida por un conjunto de células especializadas que sintetizan y secretan hormonas proteínicas más complejas, como son las hormonas luteinizante, foliculoestimulante, de crecimiento, PRL, corticotropina y tirotropina. Además existe un sistema sanguíneo portal entre el hipotálamo y la hipófisis que irriga a las células adenohipofisarias (23).

La PRL es una hormona secretada por un grupo de células adenohipofisarias especializadas denominadas lactotropos, consta de 191 aminoácidos y tiene un peso de aproximadamente 20 000 daltones(23). En la especie humana, su gen está localizado en el brazo corto del cromosoma 6 (43). La función de la PRL se manifiesta en la mujer durante el embarazo preparando a la glándula mamaria para la lactancia (48). En el posparto inmediato, esta hormona induce la secreción de leche (24), y durante la lactancia los niveles elevados de PRL inhiben la secreción de gonadotropinas hipofisarias produciendo amenorrea (37). Fuera del embarazo, puerperio temprano y del período neonatal, la secreción de PRL se encuentra estrictamente regulada y sus niveles basales se encuentran por debajo de 25 ng/ml(5). En las antedichas etapas fisiológicas la concentración sérica de PRL puede alcanzar cifras mayores a los 100 ng/ml (48).

La síntesis y secreción de PRL está regulada por el hipotálamo y es la hormona sobre la cual hay mayores evidencias experimentales de que se ejerce sobre ella un control inhibitorio (23). El mecanismo de regulación de las hormonas hipofisarias se ejerce para cada una de ellas a través de una hormona hipotalámica inhibidora y otra liberadora de su síntesis y/o secreción (23). La acción inhibidora de la secreción de PRL está directamente relacionada con la DA, de tal forma que los agonistas dopaminérgicos inhiben su secreción en condiciones fisiológicas y patológicas (1). Con relación a la hormona hipotalámica liberadora de PRL se han propuesto varios posibles factores. Uno es la succión del pezón que induce la secreción de PRL a través de una vía neuronal(29). Otro factor lo constituye la hormona liberadora de tirotropina (TRH) que cuando es administrada induce la secreción de PRL (29). Además, bajo condiciones experimentales se ha observado que una serie de hormonas y neurotransmisores son capaces de influir sobre la producción de PRL, a través de la modulación del tono dopaminérgico que regula su secreción (23).

La producción de PRL es también estimulada por los estrógenos, que siendo producidos por los ovarios y/o placenta actúan directamente sobre la adenohipófisis, induciendo hiperplasia de los lactotropos y un incremento de la concentración intracelular de la PRL y de su secreción basal (32, 47).

## II.b. ANTECEDENTES PARTICULARES

El efecto de los estrógenos a nivel de la hipófisis está apoyado por las siguientes evidencias: 1) En ratas hipofisectomizadas a las que se les ha injertado una o varias hipófisis en la cápsula renal se presenta una producción de PRL libre de influencia hipotalámica, misma que se eleva significativamente después de administrar estrógenos (1) y 2) En cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata se incrementa la secreción de PRL después de añadir  $E_2$  al medio (32).

En el animal intacto y en la mujer, la acción de los estrógenos sobre la hipófisis, se manifiesta en un incremento en su tamaño y una elevación de los niveles séricos de PRL (47). Lo anterior sugiere que los estrógenos incrementan tanto la actividad mitótica del lactotropo así como la síntesis de PRL. Ensayos con hemipituitarias, con cultivos primarios de células de adenohipófisis de rata y con líneas celulares, donde específicamente se evaluaron los parámetros de actividad mitótica y de síntesis de PRL, confirman ambos efectos (23, 32). Más aún, los estrógenos inducen la formación de prolactinomas en ratas Fisher (11). La potencia biológica de los estrógenos naturales de la mujer tales como, estrona, estriol y  $E_2$  es diferente y de ellos el  $E_2$  es el más potente (20).

Los estrógenos actúan uniéndose a su receptor en el citosol de la célula. El receptor libre se localiza predominantemente en el núcleo, pero ante la presencia intracelular de la hormona, migra al citosol donde debe activarse antes de unirse a la hormona (62). Esta activación se logra con la fosforilación de los residuos de tirosina (40). La hormona se une al receptor fosforilado y el complejo hormona-receptor, se introduce al núcleo, interactúa con el genoma y modifica su expresión (60).

El proceso de síntesis de PRL puede evaluarse a diversos niveles: por la magnitud de la transcripción del gen, por los niveles de transcritos nucleares y citoplasmáticos, por la concentración de la proteína intracelular; y por la magnitud de secreción de la hormona al medio extracelular (28).

En el modelo experimental en cultivo primario de células de adenohipófisis de rata, así como en los modelos experimentales en el animal intacto se ha demostrado que el  $E_2$  incrementa la transcripción del gen y los niveles de RNAm nucleares y del RNA

citoplasmático de PRL (36, 42). Así mismo, por la acción del  $E_2$ , se aumenta la concentración de PRL intra y extracelular (32).

En el mecanismo de acción propuesto para la inducción de la síntesis de PRL se involucra la participación del calcio y la CaM. Uno de los datos experimentales en que se apoya la participación de calcio se derivó de los resultados obtenidos con la línea celular GH<sub>3</sub>, donde después de estar la células un minuto en contacto con el  $E_2$ , se detectó una entrada del calcio del medio extracelular al intracelular (12). Otro dato experimental lo proporcionó el ensayo con ratas hembras, donde la administración de verapamil, un bloqueador de los canales de calcio, disminuyó los niveles basales de PRL en ratas intactas y no en ratas ovariectomizadas (33). Algunos trabajos realizados con otros órganos blanco de los estrógenos han aportado las evidencias de que en el mecanismo de acción intracelular  $E_2$  también está participando la CaM. En ensayos realizados con proteínas purificadas de útero, se observó que la activación del receptor fué mediada por una proteína-cinasa dependiente de calcio-CaM (40). Así también, en las células embrionarias del hígado de pollo, la cantidad de CaM activa en la matriz nuclear fué mayor cuando las células estuvieron bajo la acción del  $E_2$  (51). Por otra parte, en la línea de células GH<sub>3</sub> de hipófisis de rata, la transcripción basal del gen de la PRL requirió de calcio y CaM (58, 59). Finalmente, otro estudio más directo y realizado en cultivo primario de células adenohipofisarias de rata, informó que la inhibición de la CaM disminuyó la síntesis y secreción de la PRL basal, así como el efecto estimulador del  $E_2$ , detectándose un decremento dosis-dependiente en la concentración de la PRL intra y extracelular (32).

Una forma de evaluar la participación de la CaM en algún evento celular es por medio del empleo de fármacos que bloquean su actividad, como lo son pimozide, TFP,  $W_7$ ,  $W_8$  y calmidazolium (32, 40 y 50). En el presente trabajo empleamos a la TFP y al  $W_7$ , ambos inhibidores de CaM. La TFP además de bloquear a la CaM, impidiendo que el calcio se una a ella y la active (56), es un antagonista dopaminérgico (19). Ensayamos también la MTC, cuya acción farmacológica es antidopaminérgica y no inhibidora de CaM. (19, 22).

### III. OBJETIVO

Determinar si fármacos con acción inhibidora de CaM son capaces de disminuir los niveles de RNAm de PRL que se incrementan por acción del  $E_2$ .

### IV. HIPOTEISIS

La administración farmacológica de la TFP y el  $W_7$ , ambos con la propiedad de inhibir CaM, disminuyen los niveles del RNAm de PRL que se incrementan por efecto del  $E_2$ .



## V. MATERIALES Y METODOS

### V.a. ORIGEN DE LOS REACTIVOS

El E<sub>2</sub> y el W se obtuvieron de Sigma Chemical Company, la TFP de Laboratorios Smith Klein and French y la MTC de Laboratorios Lepetit de México. Las enzimas de restricción y sus amortiguadores se adquirieron de New England Biolab. Las sales y los reactivos ya preparados fueron adquiridos de Sigma Chemical Company y de Merck de México, La resina AG 501-X8(D) de Biorad y el Sephadex G-50 (medium) de Pharmacia Company. El <sup>32</sup>P-dCTP y el equipo Multiprime se adquirió a Amersham International.

### V.b. MATERIALES BIOLÓGICOS

Se emplearon ratas macho Sprague-Dawley con un peso entre 180 a 220 g ó entre 200 a 250 g.

### V.c. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

#### V.c.1. Producción de pPrl-1

El plásmido para detectar al RNAm de la PRL fué pPrl-1, el cual contiene el DNAC de la PRL de rata inserto en pBR322. pPrl-1 porta un gen de resistencia a la tetraciclina (16). El DNAC contiene los nucleótidos que van desde el codón para el aminoácido 16 del péptido señal hasta 90 nucleótidos después del codón de terminación. Con la secuencia del inserto (16), con la de pBR322 y con el programa computacional Pustell, se obtuvo el listado de enzimas de restricción que no cortan a pPrl-1 y el de aquellas que lo cortan 1 y 2 veces. De este listado se escogió a EcoRI, BglIII, BamHI y PstI para corroborar que el plásmido efectivamente correspondía a pPrl-1. Los cortes enzimáticos se corroboraron por medio de electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en buffer TE (técnica 3.1). Para el crecimiento a gran escala se escogió como cepa huésped de pPrl-1 a *Escherichia coli* cepa HB101. Las bacterias se hicieron Ca<sup>2+</sup> competentes (técnica 3.2) y su eficiencia para la transformación se valoró primero en un ensayo (técnica 3.2) con pBR322 y posteriormente con pPrl-1. A partir de varias colonias transformadas con pPrl-1 se obtuvo el plásmido por la técnica de obtención de DNA a pequeña escala (técnica 3.3) y se reconfirmó su identidad. Una de estas colonias se usó para la producción de pPrl-1 a gran escala (técnica 3.4) (figura 1).

#### V.c.2. Tratamiento de los Animales

Los experimentos se realizaron empleando ratas macho Sprague-Dawley con un peso entre 180-220 g ó 200-250 g las cuales fueron proporcionadas por la Unidad de Investigaciones Biomédicas del Noreste, IMSS. Los animales se mantuvieron en condiciones de

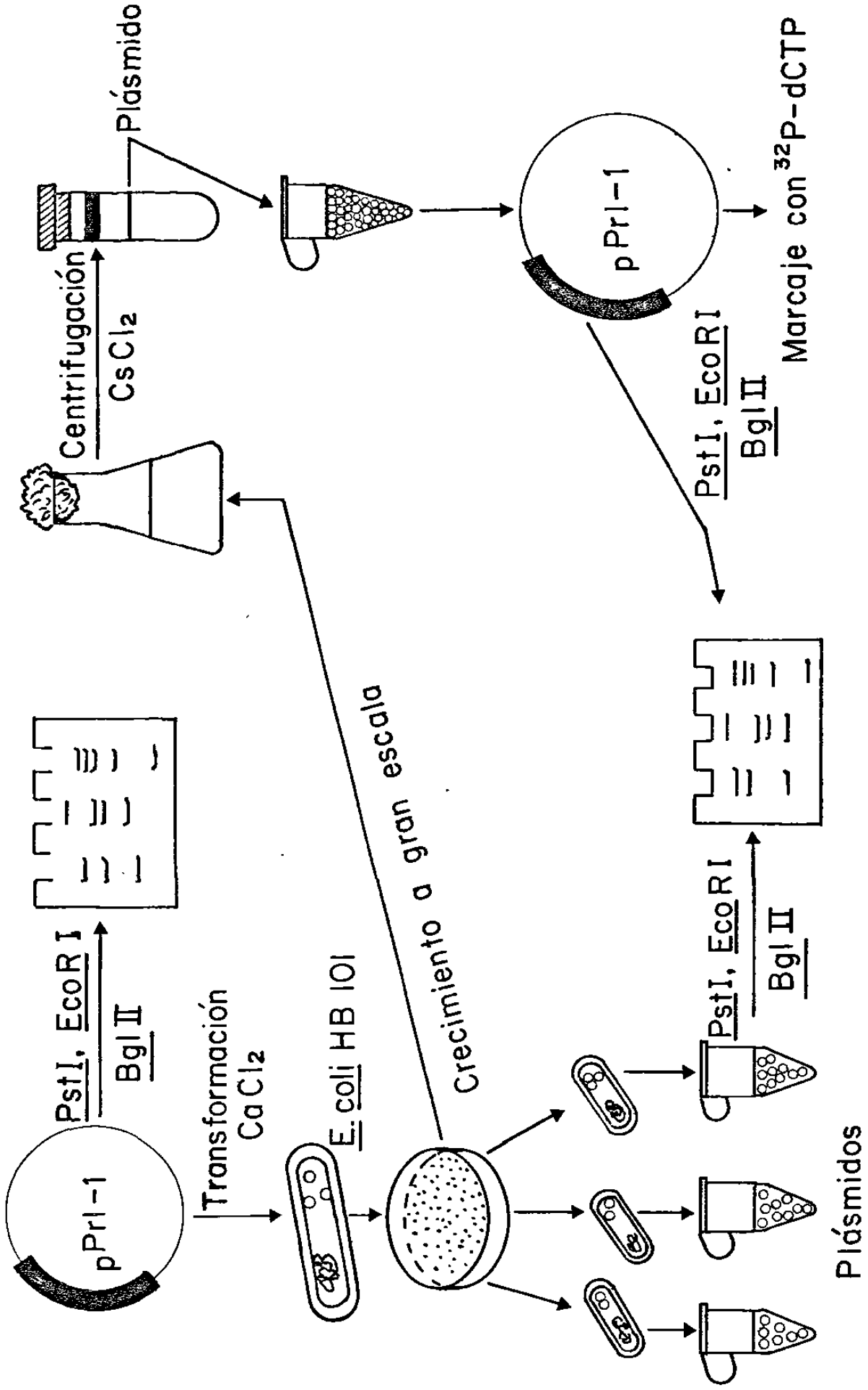


FIG. 1 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA PREPARACION DEL RASTREADOR MOLECULAR: pPrI-1

12 horas luz y recibieron alimento purina y agua *ad libitum*. Se formaron grupos de 5, 8 ó 10 animales en cada experimento.

Los tratamientos farmacológicos se aplicaron a las ratas por 4 días. La frecuencia de administración del aceite, la solución salina y el E<sub>2</sub> fué de una dosis cada 24 horas; la dosis de la TFP, del W<sub>7</sub> y de la MTC se fraccionó en 3 alícuotas y se administraron cada 8 horas. La vía de administración de los vehículos y la de los fármacos fué intraperitoneal. Las ratas se sacrificaron por dislocación cervical dentro de un período no mayor de 4 horas, después de la última aplicación farmacológica. Las hipófisis se extrajeron y las adenohipófisis se conservaron a -70°C hasta su procesamiento (técnica 1.1)

En el experimento I se evaluó el efecto de 21 µg de TFP diarios (tabla 1). En el experimento IIa y IIb se evaluó el efecto de 4 dosis de TFP en un rango de 12 a 96 µg diarios (tabla 2). En el experimento III se evaluó el efecto de 4 dosis de W<sub>7</sub> en un rango de 9.4 a 37.5 µg diarios (tabla 3). En el experimento IV se evaluó el efecto de la dosis de 99 µg de MTC (tabla 4)

La dosis de 21 µg de TFP del experimento I correspondió, en el peso promedio de las ratas (200 g) al doble de la dosis máxima (3-4 mg/día) (15) recomendada para el humano con un peso de 70 Kg. Las dosis de TFP de 12, 24, 38 y 96 µg diarios se ensayaron con el objeto de ampliar e intentar definir las dosis a la que la TFP presenta su efecto inhibitor. Este experimento se repitió una vez más con fines corroborativos, teniendo como única variante el empleo de 8 en lugar de 10 animales por grupo. Las dosis de W<sub>7</sub> ensayadas en el experimento III correspondieron a las mismas concentraciones molares de TFP del experimento II. Finalmente la dosis de MTC de 99 µg diarios correspondió en el peso promedio de las ratas (200g), a la máxima recomendada para el hombre (35 mg/día) con un peso de 70 kg (7).

### V.c.3. Aislamiento y caracterización del RNA hipofisario

Las adenohipófisis de las ratas tratadas de manera similar se procesaron en conjunto para su extracción del RNA total. La técnica de extracción fué la del isotiocianato de guanidina y cloruro de litio (técnica 1.2).

La medición de la cantidad de RNA total se realizó por espectrofotométricamente registrando su absorbancia a 260 nm (técnicas 1.3). El grado de contaminación con proteínas se infirió por el valor del cociente de absorbancia a 260/280 nm (técnica 1.3). La integridad de los RNAs se constató por medio de su resolución y visualización en gel de agarosa-urea-ácido (técnica 1.4) (Figura 2).

TABLA 1. ESQUEMA DE TRATAMIENTO\* PARA EVALUAR EL EFECTO DE UNA DOSIS DE TFP SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE PRL.

Grupos	Tratamiento	n	Dosis ( $\mu$ g)/Día	
			E <sub>2</sub>	TFP
1	Aceite	10	-	-
2	E <sub>2</sub>	10	20	-
3	TFP	10	-	21
4	E <sub>2</sub> + TFP	10	20	21

\* Se formaron grupos (n) de 10 animales con un peso promedio de 220 g. El aceite y el 17  $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) se administraron cada 24 horas. La dosis de la trifluoperazina (TFP) se fraccionó en 3 alícuotas y cada una se aplicó cada 8 horas. El aceite y el E<sub>2</sub> se administraron por vía subcutánea y la TFP por vía intraperitoneal. El tratamiento duró 4 días.

TABLA 2. ESQUEMA DE TRATAMIENTO\* PARA EVALUAR EL EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE TFP SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE PRL.

Grupos	Tratamiento	n	Dosis ( $\mu\text{g}$ )/Día	
			$E_2$	TFP
1	aceite	10	-	-
2	solución salina	10	-	-
3	$E_2$	10	20	-
4	TFP	10	-	12
5	TFP	10	-	48
6	TFP	6	-	96
7	$E_2$ + TFP	10	20	12
8	$E_2$ + TFP	10	20	24
9	$E_2$ + TFP	10	20	36
10	$E_2$ + TFP	10	20	48

\* Se formaron grupos (n) de 10 animales con un peso promedio de 200 g. Los vehículos de los fármacos y el 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ), se administraron cada 24 horas. La dosis de la trifluoperazina (TFP) se fraccionó en 3 alícuotas y cada una se aplicó cada 8 horas. Los fármacos y sus vehículos se administraron por 4 días por vía intraperitoneal.

TABLA 3. ESQUEMA DEL TRATAMIENTO\* PARA EVALUAR EL EFECTO DE DIFERENTES DOSIS DE  $W_7$  SOBRE LOS NIVELES DE  $RNA_m$  DE PRL.

Grupo	Tratamiento	n	Dosis ( $\mu g$ )/Día	
			$E_2$	$W_7$
1	aceite	5	-	-
2	solución salina	5	-	-
3	$E_2$	5	20	-
4	$W_7$	5	-	9.4
5	$W_7$	5	-	37.5
6	$W_7$	5	-	75.0
7	$E_2 + W_7$	5	20	9.4
8	$E_2 + W_7$	5	20	18.7
9	$E_2 + W_7$	5	20	28.1
10	$E_2 + W_7$	5	20	37.5

\*Se formaron grupos (n) de 5 animales con un peso promedio de 200 g. Los vehículos de los fármacos y el 17  $\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) se administraron cada 24 horas. La dosis del  $W_7$  se fraccionó en 3 alícuotas y cada una se aplicó cada 8 horas. Los fármacos y sus vehículos se administraron por 4 días por vía intraperitoneal.

TABLA 4. ESQUEMA DE TRATAMIENTO\* PARA EVALUAR EL EFECTO DE UNA DOSIS DE MTC SOBRE LOS NIVELES DE RNAm DE PRL.

Grupo	Tratamiento	n	Dosis ( $\mu$ g)/Día	
			E <sub>2</sub>	MTC
1	aceite	8	-	-
2	solución salina	8	-	-
3	E <sub>2</sub>	8	20	-
4	MTC	8	-	99
5	E <sub>2</sub> + MTC	8	20	99

\* Se formaron grupos (n) de 8 animales con un peso promedio de 200 g. La solución salina y el 17  $\beta$ -estradiol se administraron cada 24 horas. La dosis de la metoclopramida (MTC) se fraccionó en 3 alícuotas y se cada una se aplicó cada 8 horas. Los fármacos y sus vehículos se administraron por 4 días por vía intraperitoneal.



#### V.c.4. Detección del RNAm de la PRL de rata

La fijación del RNA total a filtros de nitrocelulosa se realizó por la técnica de transferencia en mancha en su modalidad manual (técnica 2.1) y con ayuda del sistema "Vacusystem" (técnica 2.2). Para la fijación de RNA por la técnica de transferencia tipo Northern (técnica 2.5) las muestras se desnaturalizaron con formamida/formaldehído (técnica 2.3) o con glioxal (técnica 2.4). El rastreador molecular: pPri-1, se marcó radiactivamente con <sup>32</sup>P-dCTP por la técnica de Marcaje de DNA con Oligonucleótidos al Azar (técnica 3.5). La prehibridación, la hibridación y los lavados (técnica 3.6) se llevaron a cabo en condiciones de alta rigurosidad de apareamiento de bases. Para las autorradiografías se emplearon películas de Rayos X y se expusieron a los filtros de nitrocelulosa radiactivos en presencia de pantallas amplificadoras (técnica 3.7) (figura 2)

#### V.c.5. Evaluación de los resultados

Los niveles de RNAm de PRL se valoraron por apreciación visual de los autorradiogramas (figura 2) y por la determinación de la radiactividad unida a los filtros de nitrocelulosa conteniendo RNA fijado en mancha (técnica 4). Las pruebas estadísticas utilizadas fueron el análisis de varianza y la comparación múltiple de medias de Tukey (técnica V.d.5).

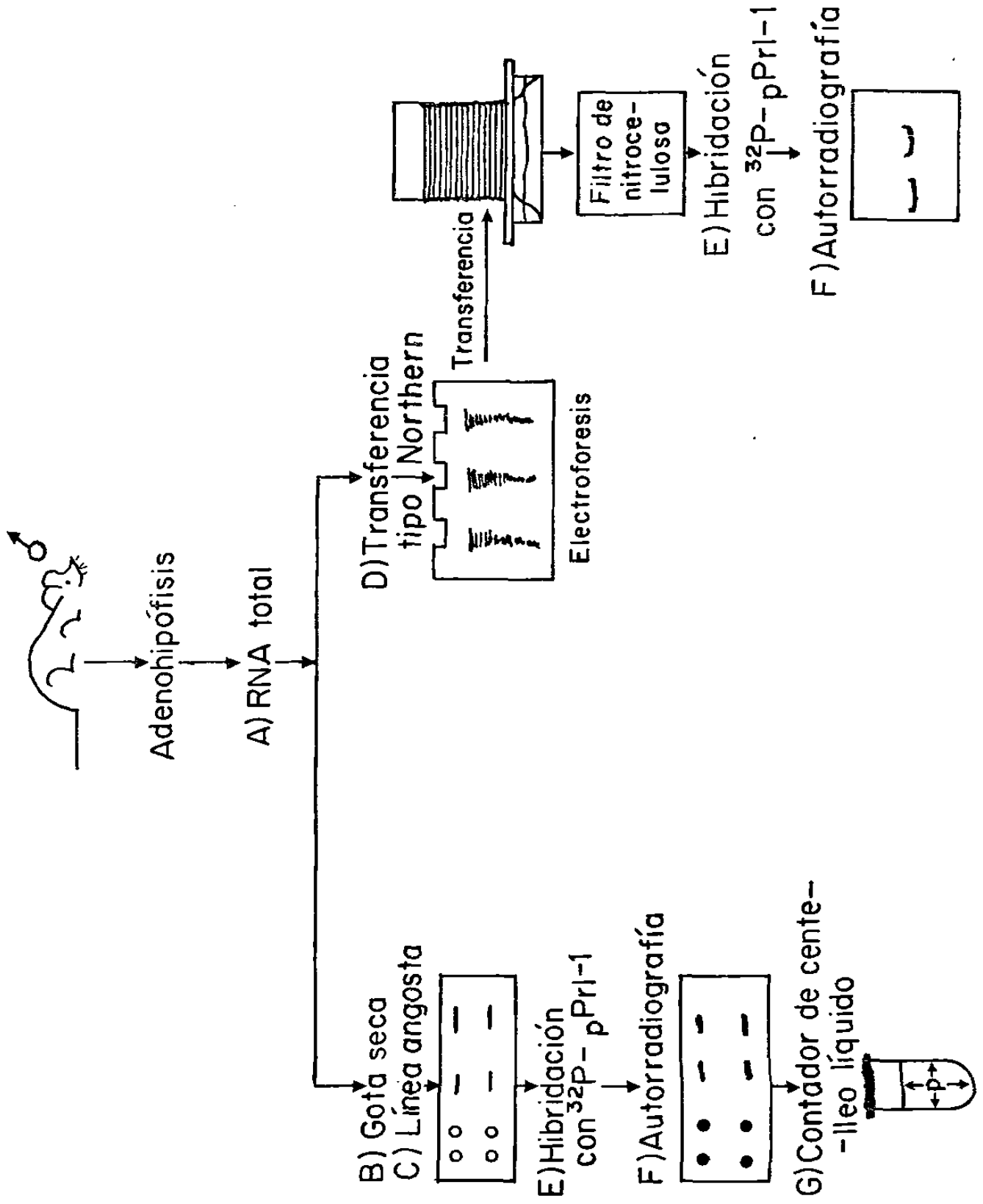


FIG. 2 PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL PARA LA DETECCION DEL RNAm DE LA PRL.

## V.d. TECNICAS.

### V.d.1. Obtención y caracterización del RNA de las adenohipófisis.

#### 1.1. Obtención de las adenohipófisis.

Inmediatamente después de sacrificar al animal por dislocación cervical, se extrajo la hipófisis y se enjuagó en solución SSC 1X enfriada en hielo. Se separó la neurohipófisis de la adenohipófisis, y la adenohipófisis se colocó dentro de un tubo Eppendorf que enseguida se pasó a hielo seco. En un mismo Eppendorf se juntaron de 5-7 adenohipófisis de ratas tratadas de manera similar. Las adenohipófisis se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

#### 1.2. Extracción del RNA.

Técnica descrita por Chomzynski y Sacchi en 1986 (10).

1.- En un tubo homogenizador tipo Potter-Elvehjem se agregaron 500  $\mu\text{l}$  de solución D y en ella se homogenizaron las adenohipófisis con un mínimo de 10 golpes.

2.- El homogenizado se pasó a un tubo Eppendorf de 1.5 ml de capacidad y se agregaron los siguientes reactivos:

a) Acetato de sodio 2 M, 50  $\mu\text{l}$  y se agitó por inversión.

b) Fenol saturado con  $\text{H}_2\text{O-DEP}$ , 500  $\mu\text{l}$  y se agitó por inversión.

c) Reactivo de Sevag, 500  $\mu\text{l}$  y se agitó vigorosamente en un agitador tipo vortex por 10 seg.

3.- La mezcla se dejó reposar por 10 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 10 000 X g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . (Centrifuga refrigerada Sorvall IEC, rotor de ángulo fijo 872). Habiéndose separado la mezcla en la fase fenólica y la fase acuosa, se pasó la fase acuosa a otro tubo Eppendorf y se le agregaron 2 volúmenes de etanol al 96%.

4.- La solución se dejó reposar por un tiempo mínimo de 1 hora a  $-20^{\circ}\text{C}$ . se centrifugó a 10 000 X g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$  y descartando el sobrenadante se le agregó al precipitado 7  $\mu\text{l}$  de solución D y 2 volúmenes de etanol al 96%.

5.- Nuevamente la solución se dejó en reposo por un mínimo de una hora a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 10 000 X g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El sobrenadante se descartó y a la pastilla después de resuspenderse en 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O-DEP}$  se le agregó 100  $\mu\text{l}$  de  $\text{LiCl}$  4M.

6.- La solución se dejó un mínimo de 4 horas a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se centrifugó a 10 000 X g por 20 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El precipitado se lavó 3 veces con etanol al 75% y se dejó secar a  $4^{\circ}\text{C}$ . Finalmente la pastilla se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O-DEP}$  o solución de solubilización.

7.- Una alícuota de 5  $\mu\text{l}$  se separó para evaluar la cantidad de RNA, su integridad y pureza. El resto se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### 1.3. Cuantificación del RNA y determinación de su grado de contaminación proteínica.

Técnica descrita en Maniatis y cols. en 1982 (30).

1.- En una celdilla de 1 cm de paso de luz se mezcló 1 ml de H<sub>2</sub>O-DEP con 5  $\mu$ l de la solución de RNA. Se midió la absorbancia a 230, 260 y 280 nm.

2.- La concentración de RNA se obtuvo aplicando la fórmula:  
(Absorbancia a 260 nm)(40)(201)= mg/ml

Donde:

40= cantidad de RNA en mg/ml que da una absorbancia de 1.

201= factor de dilución de la solución de RNA.

3.- El grado de contaminación proteínica se determinó por medio de la relación:

$$\frac{\text{Absorbancia a 260}}{\text{Absorbancia a 280}} = A$$

donde un valor de A entre 1.8 a 2.0 indica un grado aceptable de pureza de RNA.

### 1.4. Evaluación de la integridad del RNA y contaminación con DNA

Para constatar la integridad de las moléculas de RNA así como la ausencia de DNA contaminante se sometió el producto de la extracción a una electroforesis en un gel de agarosa-urea-ácido. Por lo que concierne a la integridad del RNA se observó en el gel una relación de fluorescencia de las bandas ribosomales 28 S y 18 S de 2:1 y nítida la banda 5 S. Además se constató la ausencia de fluorescencia difusa al fondo del gel, lugar donde viajan los RNAs muy pequeños, productos de degradación. Referente a la contaminación con DNA tampoco se detectó fluorescencia arriba de la banda ribosomal 18 S.

Electroforesis de RNA en condiciones desnaturalizantes en gel de agarosa-urea-ácido.

Técnica descrita por Rosen y cols. en 1975 (49).

1.- A 1.5 g de agarosa, se le añadieron 60 ml de urea 10 M y 30 ml de H<sub>2</sub>O-DEP, se calentó la mezcla en baño maría hasta disolver la agarosa y se dejó enfriar aproximadamente hasta 60 °C. Se añadieron enseguida 10 ml de buffer de citratos 0.25 M pH 3.5 y se homogenizó la mezcla.

2.- La solución se vació en el molde para el gel (preferentemente en ensamble de cortina) y se mantuvo a 4°C hasta que solidificó (3-4 horas mínimo).

3. Las muestras se prepararon de la siguiente manera:

RNA a 1ug/ $\mu$ l.....	10 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O- DEP.....	10 $\mu$ l
Urea 10 M.....	30 $\mu$ l
Azul de bromofenol al 0.05%.....	5 $\mu$ l

4.- Las muestras se calentaron por 10 minutos a 60°C y se pasaron inmediatamente a hielo por 10 minutos.

5.- La electroforesis se llevó a cabo primeramente a 40 volts, mientras entraron las muestras de las casillas al gel. Posteriormente la corriente se subió a 80 volts y se mantuvo hasta que el azul de bromofenol migró 3/4 partes la longitud del gel. El gel se sumergió en una solución de bromuro de etidio (1 ug/ml en tris HCl 50 mM pH 7.6 y los RNAs se visualizaron por iluminación con luz ultravioleta.

## V.d.2. Fijación de RNA total a papel de nitrocelulosa

### 2.1. Fijación en mancha. Técnica manual.

Técnica descrita por Amorese en 1986 (3) en Maniatis y cols. en 1982 (30).

1.- La cantidad de RNA total a fijar se determinó según el experimento y se diluyó en SSC 4 X a un volumen que generalmente fue de 5  $\mu$ l. Las muestras se calentaron por 10 minutos, a 60 °C y se pasaron inmediatamente a hielo por 10 minutos.

2.- Por otra parte, el papel de nitrocelulosa previamente cuadrículado (1.0 X 1.0 cm) se sumergió por 5 minutos, primero en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y después en SSC 20 X. Finalmente se dejó secar entre 2 filtros Whatman.

3.- La aplicación de los 5  $\mu$ l de las soluciones de RNA se realizó gota a gota conforme se iban secando. Este proceso se aceleró colocando por debajo del papel una fuente luminosa y con la ayuda de una secadora para pelo.

4.- Terminada la aplicación y una vez seco el papel de nitrocelulosa se introdujo por 2 horas en un horno a 80 °C y bajo vacío.

### 2.2. Fijación en mancha. Empleando el " Vacusystem" (ABN).

1.-Se realizó el punto 1 de la técnica de aplicación manual.

2.- Los filtros de respaldo y el papel de nitrocelulosa se mojaron por 5 minutos primero en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y luego en SSC 20 X. No se dejaron secar.

3.- Se montó el aparato según las indicaciones de la casa comercial (ABN) y se procedió a fijar el RNA.

4.- Se realizó el punto 4 de la técnica de aplicación manual.

### 2.3. Electroforesis de RNA en gel de agarosa-formamida-formaldehido.

Técnica descrita en Maniatis y cols. en 1982 (30).

1.- Se preparó un gel de agarosa al 1.5% de la siguiente manera:

a) Tres g de agarosa se disolvieron en 100 ml de agua bidestilada estéril y se mantuvieron en un baño de agua a 60 °C.

b) Por otra parte se preparó una solución de formaldehido 4.4 M y buffer de fosfatos 2X (apéndice i 6.2).

Las soluciones a) y b) se mezclaron y mantuvieron a 60°C Finalmente se vaciaron en un molde para electroforesis en gel horizontal.

2.- Las muestras de RNA se desnaturalizaron de la siguiente manera:

Formamida al 50%..... 2.22 volúmenes

Formaldehido 37%..... 0.77 volúmenes

Buffer de fosfatos 10 X..... 0.44 volúmenes

RNA (5 µg).....1.00 volumen

Se incubaron 5 minutos a 60 °C y se pasaron inmediatamente a hielo por 10 minutos.

3.- Al momento de realizar la electroforesis se adicionaron 4 µl de colorante (apéndice i 1.1)

4.- En cada ensayo se incluyó además de las muestras del experimento, una muestra de RNA de hígado de rata como testigo negativo en la hibridación. Distante 1 ó 2 carriles de las muestras por transferir se colocó otra muestra de hígado de rata que sirvió para registrar la movilidad electroforética de los transcritos.

5.- La electroforesis se realizó en buffer de fosfato 1X y a un voltaje de 3-4 volts/cm del gel. Una vez que las muestras entraron de las casillas al gel se puso a reciclar el buffer.

6.- La electroforesis se detuvo cuando el colorante migró 3/4 partes la longitud del gel. La muestra de RNA colocada distante de las muestras por transferir se tiñó siguiendo los siguientes pasos.

a) Cinco lavados de 30 minutos en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril

b) Dos lavados de 30 minutos en acetato de amonio 0.1 M y β-mercaptoetanol al 0.01 %.

c) Una hora en bromuro de etidio.

d) Cuarenta y cinco minutos en solución de acetato de amonio 0.1 M y β-mercaptoetanol al 0.01 %.

7.- El gel se visualizó en luz UV y se registró la separación de las bandas 28S, 18S y 5S del RNA ribosomal.

8.- La otra parte del gel se lavó 5 minutos en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y 1 hora en SSC 20 X y se procedió con la transferencia tipo Northern.

### 2.4. Electroforesis de RNA en gel de Glioxal.

Técnica descrita por Miller en 1987 (41).

1.- Se preparó un gel de agarosa al 1.5 % en buffer de fosfato de sodio 10 mM para una cámara horizontal y se dejó reposar 1 hora.

2.- Se añadió a un tubo Eppendorf, 5 µg de RNA contenidos en 3 µl de H<sub>2</sub>O-DEP o buffer de solubilización y 7 µl del reactivo de glioxal/DMSO. Las muestras se calentaron 1 hora a 50°C y se pasaron inmediatamente a hielo. Justo antes de someterla a la electroforesis, se añadió 1 µl de colorante.

3.- En cada ensayo se incluyó además de las muestras del experimento, las de hígado de rata referidas en el punto 4 del inciso 2.3.

4.- La electroforesis se realizó en buffer de fosfatos 0.01 M a un voltaje de 3-4 volts/cm del gel. Una vez que las muestras entraron de las casillas al gel se puso a recircular el buffer. La electroforesis se detuvo cuando el colorante corrió 3/4 partes la longitud del gel.

5.- El fragmento del gel conteniendo el RNA destinado para registrar la movilidad electroforética de los transcritos se tñó en bromuro de etidio (apéndice i: 7.6) y se visualizó bajo luz UV.

6.- Con la otra parte del gel se procedió a realizar la transferencia tipo Northern.

## 2.5. Transferencia tipo Northern.

Modificación a la técnica descrita por Thomas en 1980 (55).

1.- Con la ayuda de 2 varillas se sostuvo un rectángulo de vidrio en la parte superior de un recipiente que contenía SSC 20 X. Se estableció un puente salino dejando reposar sobre el rectángulo un papel Whatman 3MM cuyos extremos se sumergieron en el SSC 20 X. El puente estuvo completamente humedecido y libre de burbujas.

2.- El gel se colocó sobre el papel Whatman 3MM y sobre él una membrana de nitrocelulosa del mismo tamaño del gel, previa y brevemente humedecida en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y SSC 20 X. Las burbujas entre el gel y el papel filtro de nitrocelulosa fueron eliminadas cuidadosamente.

3.- El extremo de la parte superior izquierda tanto del gel como del filtro de nitrocelulosa se cortaron y fueron punto de referencia para la posición de la primera muestra.

4.- Tres tiras de papel Whatman del mismo tamaño del gel humedecidas en H<sub>2</sub>O bidestilada estéril y SSC 20 X se colocaron sobre el papel filtro de nitrocelulosa; se continuó sobreponiendo 100 servilletas, una placa de vidrio y finalmente un peso de 0.5 Kg

5.- La transferencia se llevó a cabo generalmente por 20 horas y a temperatura ambiente. Durante ese tiempo las toallas absorbentes humedecidas se cambiaron periódicamente por toallas nuevas y secas.

6.- La membrana de nitrocelulosa se retiró y se colocó



entre 2 tiras de papel Whatman a temperatura ambiente hasta que se secó. Finalmente la membrana se introdujo por 2 horas a un horno a 80°C y con vacío.

### V.d.3. Detección del RNAm de la PRL.

#### 3.1. Rastreador molecular: pPrl-1.

El plásmido pPrl-1 conteniendo el DNA complementario (DNAc) de la PRL de rata fué donado al Dr. Hugo Barrera por el Dr. Richard Maurer del Departamento de Fisiología y Biofísica de la Universidad de Iowa, USA.

El plásmido se caracterizó por medio de cortes con enzimas de restricción. Las reacciones enzimáticas se realizaron en un volumen de 10 µl donde se digerían generalmente 250 ng de DNA. Las reacciones se prepararon añadiendo en el siguiente orden a) una alícuota de H<sub>2</sub>O previamente calculada a fin de que el volumen de la reacción fuera de 10 µl, b) la alícuota de buffer para que su concentración final fuera 1X, c) el DNA y d) de 1 a 2 Unidades de enzima/µg de DNA.

Las enzimas con las cuales se realizó la caracterización pPrl-1 fueron EcoRI, BamHI, BglII, PstI (apéndice ii). Para registrar la movilidad electroforética del plásmido superenrollado se preparó una mezcla de DNA sin ninguna enzima y como marcador de peso molecular se cortó pBR322 con AluI. Las reacciones se detuvieron añadiendo a la mezcla de la reacción 1/5 de su volumen de amortiguador tipo III 6X. Los productos de los tratamientos se sometieron a electroforesis de agarosa al 1.2 % en buffer TAE 1X. El gel se tiñó con bromuro de etidio (apéndice i 9.6) y se observó en el transiluminador de luz UV.

Habiéndose corroborado la identidad del plásmido, al concondar los cortes enzimáticos con lo informado por Gubbins en 1980 (16), se procedió a preparar a pPrl-1 a gran escala, transformando con él a *Escherichia coli* cepa HB101.

#### 3.2. Transformación de *E. coli* cepa HB101 con pPrl-1.

Modificación a la técnica descrita en Maniatis y cols en 1982. (30).

##### Producción de bacterias calcio competentes.

1.- De un cultivo madre de *E. coli* HB101 se sembró una caja de petri con agar Luria Bertoni (L-B) con tetraciclina (15 µg/ml) y se incubó a 37 °C toda la noche.

2.- Al día siguiente se tomó una colonia de la caja y con ella se inocularon 20 ml de caldo L-B. El cultivo se dejó crecer a 37 °C con agitación continua toda la noche.

3.- Con 4 ml de este cultivo se inocularon 200 ml de caldo L-B con tetraciclina (15 µg/ml). Inmediatamente se extrajeron 4 ml y se emplearon para ajustar el espectrofotómetro a cero de

absorbancia en una longitud de 550 nm.

4.- El cultivo se dejó crecer a 37°C con agitación vigorosa (230 rpm) y cuando alcanzó una absorbancia de 0.3 (celdilla de 1 cm de paso de luz) se detuvo su crecimiento pasándolo a hielo. De aquí en adelante el procedimiento se realizó a 4°C.

5.- Posteriormente el cultivo se centrifugó pasándolo a 500 X g por 10 minutos a 4°C (centrifuga refrigerada Sorvall IEC, rotor de ángulo fijo No 872). El sobrenadante se descartó y las bacterias resuspendidas en 80 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1M. se dejaron en reposo por 30 minutos.

6.- La suspensión bacteriana se centrifugó nuevamente, se descartó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 4 ml de CaCl<sub>2</sub>.

7.- Una alícuota de 100 µl de la suspensión bacteriana se apartó, manteniéndola en hielo.

8.- El resto de las bacterias se incubaron 24 horas a 4°C. Al día siguiente se les añadió 1 ml de glicerol estéril al 100%. La suspensión se fraccionó en tubos Eppendorf en alícuotas de 100 µl, se congelaron en un baño de CO<sub>2</sub> sólido y etanol y finalmente se almacenaron a -70°C.

9.- Con la alícuota del inciso 7 y con pBR322 se realizó una transformación.

10.- Habiendo confirmado la capacidad de competencia de las bacterias para la transformación, inmediatamente después de su preparación y después de su congelamiento, se procedió a realizar su transformación con pPrl-1.

#### Transformación de *E. coli*

1.- Doce de las alícuotas de *E. coli* HB 101 preparadas por tratamiento con CaCl<sub>2</sub> se dejaron descongelar en hielo. Por otra parte se diluyeron los plásmidos pPrl-1 y pBR322 a 1 µg/ml.

2.- En tubos Eppendorf por separado se mezclaron 10 µl del plásmido conteniendo 0.1, 1 y 10 ng de pPrl-1 con 20 µl de la suspensión bacteriana. Se dejaron reposando 1 hora en hielo, debiendo entre tanto agitarlos suavemente cada 10 minutos. Se incluyeron en paralelo transformaciones con el vector pBR322 y con el buffer TE sin DNA.

3.- Al final de la incubación los tubos se pasaron a un baño de agua a 37°C (choque térmico) por 1 minuto y se les agregó 200 µl de L-B sin antibiótico. Se incubaron a 37°C por 30 minutos y se sembraron en cajas de petri con tetraciclina (15 µg/ml). Las cajas se incubaron invertidas a 37°C por 12 horas.

4.- La eficiencia de la transformación se calculó contando el número de colonias para cada una de las cantidades de DNA.

#### **3.3. Obtención de DNA plasmídico a pequeña escala.**

Modificación a la técnica descrita por Birnboim and Doly en 1979 (6).

1.- Cuatro de las colonias obtenidas por transformación con pPrl-1 se inocularon cada una en tubos de ensaye conteniendo 4 ml

de caldo L-B con tetraciclina (15 ug/ml) y se incubaron por 18 horas a 37°C con agitación continua.

2.- Las bacterias de tres ml de cultivo se empastillaron en un tubo Eppendorf de 1.5 ml mediante 2 centrifugaciones sucesivas a 16 000 X g por un minuto. El sobrenadante se descartó y las pastillas se conservaron. Al resto del cultivo, después de adicionarle glicerol esteril a una concentración final de 40 %, se almacenó a -20°C.

3.- Las pastillas se congelaron por 30 minutos a -20 °C, se descongelaron a temperatura ambiente y se pasaron a hielo.

4.- A cada pastilla bacteriana se le agregó:

a) Solución I, 100 µl. Se resuspendió inmediatamente y se dejó reposar por 30 minutos a 0°C.

b) Solución II, 200 µl. Se agitó suave e inmediatamente y se dejó reposar por 5 minutos a 0°C.

c) Solución III, 150 µl. Se mezcló suave e inmediatamente por inversión durante unos segundos y se dejó reposar 1 hora a 0°C.

5.- Los tubos se centrifugaron por 5 minutos. El sobrenadante se pasó a otro tubo y se le agregó:

a) Fenol saturado con Tris-HCl 0.1 M pH 8.0, 200 µl. Se agitó suavemente en un agitador tipo vortex.

b) Reactivo de sevag, 200 µl. Se volvió a agitar en el vortex.

6.- Los tubos se centrifugaron nuevamente por 5 minutos. Se recuperaron los sobrenadantes en otro tubo Eppendorf, y agregándoseles 2 1/2 volúmenes de etanol al 96%, se dejaron reposar de 2 a 3 minutos a temperatura ambiente.

7.- Los tubos se centrifugaron por 2 minutos y se decantó el etanol. Las pastillas después de resuspenderse en 100 µl de solución IV, se reprecipitaron añadiendo 2 volúmenes de etanol al 96%.

8.- Cada precipitado se compactó por centrifugación, se lavó con etanol al 70% y se secó por centrifugación al vacío (evaporador centrífuga Savant).

9.- Cada pastilla se disolvió en 48 µl de TE 1X y 2 µl de RNAasa (10 mg/ml). Las soluciones se incubaron a 37°C por 30 minutos y se guardaron a 4°C.

10.- Posteriormente, se confirmó la identidad del plásmido por medio de cortes con enzimas de restricción y electroforesis en gel de agarosa.

### 3.4. Obtención de DNA plasmídico a gran escala.

Técnica descrita en Maniatis y cols. en 1982 (30).

#### Crecimiento de bacterias.

1.- Con una sola colonia portando el plásmido pPrl-1 se inocularon 20 ml de medio L-B con tetraciclina (15 µg/ml). El cultivo se dejó crecer toda la noche a 37°C con agitación continua.

2.- Los 20 ml del cultivo se transfirieron a 1 litro de medio M-9 con tetraciclina (15  $\mu$ g/ml) y se tomaron inmediatamente 5 ml del medio para con ella ajustar el espectrofotómetro a cero de absorbancia a una longitud de 550 nm (celdilla de 1 cm de paso de luz).

3.- El medio M9 se incubó a 37°C con agitación (230 rpm), se registró su absorbancia a la 1, 1.5 y 2 horas hasta que el cultivo alcanzó una densidad óptica entre 0.3 y 0.4 (celdilla de 1 cm de paso de luz). En ese momento se agregaron 250 mg de cloranfenicol y se continuó la incubación de la misma manera por 12 horas más.

4.- El crecimiento bacteriano se detuvo pasando el matraz a un baño de hielo. Las bacterias se colectaron por centrifugación a 7 500 X g (Centrifuga refrigerada IEC-B 20 A, rotor IEC No 872 de ángulo fijo) por 10 minutos. las cuales después de decantado el sobrenadante, se congelaron a -20°C.

#### Preparación de un lisado claro.

1.- La pastilla bacteriana se descongeló a temperatura ambiente y colocada en hielo se le añadió:

a) Solución de sacarosa al 25% en Tris-HCl pH 8, 6.25 ml. La pastilla se resuspendió perfectamente con la ayuda de una pipeta de 10 ml.

b) Solución de lisozima (2 mg/ml), 1.5 ml. El frasco se agitó por rotación continua por 5 minutos.

c) EDTA 0.5M, 1.25 ml. El frasco, se agitó por rotación continua por 2 minutos.

d) Solución de Tritón X-100, 10 ml y mientras se añadió se agitó el frasco por rotación. Se continuó con el mezclando por 15 minutos más. En esta etapa la solución se tornó de lechosa a traslúcida.

2.- El lisado bacteriano se sometió a ultracentrifugación a 94 000 X g por 30 minutos a temperatura ambiente (Ultracentrífuga Bekman L5-50E a 30 000 rpm en un rotor 60 Ti). El sobrenadante se transfirió a un tubo cónico Falcon de plástico de 50 ml con tapón de rosca. Se tuvo cuidado de no transferir DNA cromosomal el cual se apreció como una porción gelatinosa de la pastilla.

#### Aislamiento de DNA plasmídico

1.- Al sobrenadante del lisado bacteriano se le agregó:

a).-El suficiente TE 1X para completar 20 ml.

b).- CsCl<sub>2</sub>, 0.95 g por mililitro de lisado y se disolvió con agitación suave. De aquí en adelante se trabajó en oscuridad parcial y el tubo Falcon se protegió de la luz envolviéndolo con papel aluminio.

2.- El sobrenadante se transfirió a un tubo de sellado rápido para el rotor VTI 50 de Beckman. Lo anterior se realizó con la ayuda de una pipeta Pasteur. Al tubo se le agrgó 1 ml de bromuro de etidio (10 mg/ml en TE) y se llenó el tubo con aceite mineral. Finalmente el tubo se selló con el aparato Beckman. El tubo se balanceó con el de otro plásmido preparado paralelamente.

3.- Los tubos balanceados se colocaron en el rotor VTi 50. y

se centrifugaron a 230 000 X g (Ultracentrifuga Beckman L-5 50 E a 40 000 rpm) por 18 horas a 25°C.

4.- Al término de la centrifugación los tubos se observaron con una lámpara de luz UV de onda larga a fin de detectar la banda de DNA tanto del plásmido como la del cromosoma. El tubo se puncionó en su parte superior y se procedió a coleccionar el DNA del plásmido (banda inferior) con una aguja ancha (18 G) insertada en una jeringa de 5 ml

5.- La solución extraída se colocó en un tubo graduado de 15 ml cubierto con papel aluminio. El bromuro de etidio se removió añadiendo un volumen igual de alcohol isoamílico, agitando vigorosamente y centrifugando a 3 000 rpm a fin de separar ambas fases. Las extracciones se repitieron hasta que se eliminó en el alcohol isoamílico, el color que delata la presencia del bromuro de etidio.

6.- La solución se dializó por 2 horas contra 2 litros de TE 1X, se trató con RNAasa (20 µg/ml) por 30 minutos a 37°C y con proteinasa K (100 µg/ml) en presencia de SDS al 0.2% por 1 hora a 37°C.

7.- El DNA se sometió a extracciones sucesivas con fenol-sevag y luego sevag solo. Posteriormente se propició la precipitación del DNA añadiendo a la fase acuosa NaCl a una concentración final de 0.2 M y 2.5 volúmenes de etanol al 96 % frío. El tubo se guardó por un mínimo de 2 horas a -20°C.

8.- El DNA se coleccionó por centrifugación y se lavó con etanol al 70 %. Las trazas de etanol se removieron por desecación mediante centrifugación al vacío (evaporador-centrífuga Savant).

9.- El DNA se resuspendió en 1 ml de buffer TE y su concentración se determinó espectrofotométricamente, registrando la absorbancia a 260 nm de una alícuota de 10 µl de DNA diluida en 1 ml de TE. La concentración se calculó con la fórmula:

$$\text{Concentración de DNA} = (\text{D.O. a } 260 \text{ nm})(50)(101) = A \text{ (mg/ml)}$$

donde:

50= cantidad de DNA que da una absorbancia de 1.0 a 260 nm con un celdilla de 1 cm de paso de luz.

101= la dilución que se acostumbra realizar en la celdilla del espectrofotómetro a una alícuota de la solución de DNA cuya concentración se desea conocer.

### 3.5. Marcaje radiactivo.

Técnica descrita por Feinberg en 1984 (13).

El plásmido se marcó radiactivamente por la técnica de "Marcaje de DNA por Oligonucleotidos al Azar", empleando un equipo comercial (Amersham) cuyo instructivo indicó el siguiente procedimiento:

Linearización del plásmido

1.- Un  $\mu\text{g}$  de pPr1-1 se sometió a la acción de las endonucleasas de restricción de EcoRI o BamHI. Se tomaron 200 ng de la mezcla y se corroboró la linearización del plásmido. El resto del DNA (800 ng) se precipitó agregando 1/2 volumen de acetato de amonio 7.5 M y 2 volúmenes de etanol al 96%. El DNA se dejó precipitar toda la noche a  $-20^{\circ}\text{C}$  y se empastilló por centrifugación por 10 minutos en la microcentrífuga Eppendorf.

2.- La pastilla se secó por centrifugación al vacío y se resuspendió en 320  $\mu\text{l}$  de TE con la finalidad de obtener una concentración final de DNA de 2.5 ng/ $\mu\text{l}$ .

Marcaje radiactivo del plásmido.

1.- El DNA linearizado se desnaturalizó calentándolo por 2 minutos en baño de agua en ebullición; posteriormente se pasó inmediatamente a hielo. La mezcla de la reacción se preparó de la siguiente manera:

Solución de DNA lineal (2.5 ng/ $\mu\text{l}$ ).....10  $\mu\text{l}$   
Solución buffer.....10  $\mu\text{l}$   
Primer.....5  $\mu\text{l}$   
H<sub>2</sub>O ultrapura (la apropiada para un volumen final de 50  $\mu\text{l}$ ).  
<sup>32</sup>P-dCTP (3 000 Ci/mmol).....5  $\mu\text{l}$   
Fragmento Klenow de la DNA polimerasa.....2  $\mu\text{l}$

La reacción se incubó por 30 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  o toda la noche a temperatura ambiente y se detuvo agregando 5  $\mu\text{l}$  de EDTA 0.2M

Separación de la sonda radiactiva de el <sup>32</sup>P-dCTP no incorporado.

1.- Dos g de Sephadex G-50 (medium) se hidrataron en 150 ml de TE 24 horas antes de realizar el marcaje.

2.- En el fondo de una jeringa de 1 ml se colocó un tapón de fibra de vidrio tratada con silicón y en ella se empacó una columna con el Sephadex.

3.- La columna se cargó con la muestra y se recolectó en tubos Eppendorf 5 fracciones de 100, 250, 100, 100 y 100  $\mu\text{l}$  cada una.

4.- De cada una de las fracciones de elución se tomaron 5  $\mu\text{l}$  y se fijaron en un pedazo de papel fitro de nitrocelulosa o de fibra de vidrio. Cada pedazo de papel se introdujo en un vial de líquido de centelleo y se llevaron a un contador de centelleo líquido.

5.- El plásmido eluyó en los tubos 2 y 3. Se reunieron ambas

alícuotas y se calcularon las cuentas totales.

Cálculo de la actividad específica del DNA marcado

1.- Un  $\mu\text{l}$  de la muestra de la reacción se pasó a un tubo Eppendorf conteniendo 9  $\mu\text{l}$  de TE 1X.

2.- De este tubo se tomaron 5  $\mu\text{l}$  y se fijaron en un disco de fibra de vidrio. Las cuentas aquí fijadas correspondieron a las cuentas totales.

3. A los otros 5  $\mu\text{l}$  se les agregó:

a) DNA acarreador, 50  $\mu\text{l}$

b) TCA al 10% frío: 2 ml

Se agitó en un agitador tipo vortex y se dejó enfriar por 10 a 15 minutos en hielo.

4.- El DNA precipitado se recuperó por filtración en un disco de fibra de vidrio, el cual se lavó 3 veces con TCA al 10%, 2 veces con etanol al 70% y 1 vez con etanol al 96%.

5.- El filtro se dejó secar y se introdujo a un vial con líquido de centelleo que se llevó a un contador de centelleo líquido. Las cuentas aquí fijadas correspondieron a las incorporadas al plásmido.

6.- Se calcularon los siguientes parámetros:

I) Porcentaje de incorporación

$$\frac{\text{Cuentas incorporadas (paso 5)} \times 100}{\text{Cuentas totales (paso 2)}} =$$

II) Cantidad total de DNA sintetizado en ng = (A)=

$$\frac{\# \text{ total de } \mu\text{Ci añadidos} \times 13.2 \times \% \text{ de incorporación} + 25}{\# \text{ de tipos de dNTPs añadidos} \times \text{promedio de la actividad específica de los dNTPs añadidos.}}$$

asumiendo en la nueva cadena de DNA sintetizada un 25% de contenido para cada uno de los dNTP

\*ng de DNA colocados para la reacción

III) Cantidad de radiactividad incorporada= (B)=

$$\text{Total de } \mu\text{Ci añadidos} \times 2.2 \times 10^4 \times \% \text{ de incorporación}$$

IV) Actividad específica del DNA=

$$\frac{B \times 10^3}{A} \text{ dpm}/\mu\text{g}$$



### 3.6. Hibridación.

Técnica descrita por Whal y cols. en 1976 (57).

#### Prehibridación

1.- El papel filtro de nitrocelulosa con RNA fijado y horneado se colocó dentro de una bolsa de plástico sellada por 3 de sus lados.

2.- En la bolsa se añadió la solución de prehibridación. El volumen añadido estuvo determinado por el tamaño del papel de nitrocelulosa. Para un tamaño de filtro de 8.5 X 11 generalmente empleamos de 5-6 ml.

3.- El cuarto lado de la bolsa se selló teniendo especial cuidado en eliminar las burbujas.

4.- Las bolsas se dejaron por un mínimo de 4 horas, generalmente toda la noche, en un baño de agua a 42°C con agitación continua.

#### Hibridación.

1.- Una alícuota del plásmido radiactivo (de 10 a 20 X 10<sup>6</sup> cpm) se calentó en un baño de agua hirviendo por 2 minutos e inmediatamente se pasó a hielo.

2.- La bolsa se abrió por una esquina y se retiró la solución de prehibridación. La sonda se mezcló con la solución de hibridación y se introdujo a la bolsa. El volumen de la solución de hibridación para un tamaño de filtro de nitrocelulosa de 8.5 X 11 cm fué de 3-4 ml.

#### Lavados

1.- Terminado el tiempo de hibridación se eliminó la solución de la bolsa, y reunidos los filtros de nitrocelulosa en una bandeja de plástico se lavaron de la siguiente manera:

2.- Dos lavados rápidos a temperatura ambiente con 300 ml de una solución de SSC 2X y SDS 0.1%

3.- Dos lavados de 15 minutos a temperatura ambiente con 300 ml de una solución de SSC 2X y SDS 0.1%.

4.- Cuatro lavados de 30 minutos a 50°C con 300 ml de una solución de SSC 0.1X y SDS 0.1%

5.- Los filtros de nitrocelulosa se dejaron secar a temperatura ambiente entre 2 papeles Whatman.

### 3.7. Autorradiografía.

Una vez secos los filtros de nitrocelulosa se expusieron a una película virgen de rayos X con pantalla amplificadora. El tiempo de exposición dependió de la vida media del <sup>32</sup>P.

#### V.d.4. Cuantificación del RNAm de la PRL

El RNAm de la PRL se cuantificó midiendo la radiactividad fijada en el filtro de nitrocelulosa por la técnica de mancha.

Para ello las áreas de filtro donde se había fijado el RNA se recortaron y se introdujeron a un vial que contenía 5 ml de líquido de centelleo. Finalmente, los viales se llevaron a un contador de centelleo líquido.

#### V.d.5. Evaluación de los resultados.

1.- Los autorradiogramas que se obtuvieron de las transferencias tipo Northern, la fijación de RNA en mancha y la fijación en línea los evaluamos por apreciación visual.

2.- Las cifras de radiactividad retenidas en los diferentes filtros se sometieron a las pruebas estadísticas de análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey (62). Las cpm se normalizaron asignando en cada experimento el valor de 1 a uno de los valores del grupo testigo tratado con aceite y calculando sobre esta base al resto de las cpm su correspondiente valor. Así para cada grupo informamos la media ( $\bar{X}$ ) de su incremento de RNAm de PRL y su desviación estándar (D.E.).

## VI. RESULTADOS

### VI.a. PREPARACION DEL RASTRADOR MOLECULAR.

El perfil electroforético de las digestiones de pPrl-1 con algunas endonucleasas de restricción confirmó su identidad:

- 1) BglIII linearizó el plásmido cortando una vez en el inserto mas no el vector.
- 2) EcoRI linearizó el plásmido cortando una vez en el vector mas no en el inserto.
- 3) BamHI linearizó el plásmido cortando una vez en el vector mas no al inserto.
- 4) PstI liberó un fragmento de aproximadamente 800 pb que migró en el gel entre los marcadores de peso molecular de 650 y 910. PstI libera el inserto que se sabe es de 735 pb.
- 5) BglIII + EcoRI liberó un fragmento entre 900 pb y 1500 pb. Esta combinación de enzimas libera un fragmento que dependiendo de la orientación del vector debe ser de 1004 pb o 1220 pb.

La eficiencia de la transformación de *E. coli* cepa HB 101 con pBR322 fué de  $1.6 \times 10^4$  colonias/ $\mu$ g de DNA y con pPrl-1 fue de  $1.06 \times 10^4$  colonias/ $\mu$ g de DNA. Ambas eficiencias de transformación se consideraron bajas ya que generalmente con esta cepa bacteriana y con pBR322 se obtienen eficiencias de  $2 \times 10^6$  colonias/ $\mu$ g de DNA (30). De una colonia transformada con pPrl-1 se realizó el procedimiento de producción de DNA plasmídico a gran escala. Con este procedimiento y cultivando 1 l de medio se obtuvieron 540  $\mu$ g de DNA plasmídico que con amortiguador TE se ajustaron a una concentración final de 0.5  $\mu$ g/ $\mu$ l (Figura 1).

### VI.b. EXPERIMENTO I. EFECTO DE UNA DOSIS DE TFP.

De la extracción de RNA del grupo de ratas tratadas con  $E_2$  se purificaron 166  $\mu$ g, del que recibió TFP se obtuvieron 181  $\mu$ g y del que recibió  $E_2$  + TFP se recuperaron 91  $\mu$ g. El RNA aislado a partir del grupo testigo que recibió aceite mostró indicios de degradación (tabla 5). La relación de la absorbancia 260/280 fué de 1.7, lo cual indicó un grado aceptable de pureza del RNA (tabla 5). La integridad de los preparados de RNA se corroboró al apreciar en el gel de agarosa-urea-ácido las bandas correspondientes a RNA ribosomal 28 S y 18 S con una intensidad de fluorescencia de 2:1. La ausencia de DNA se constató por la ausencia de fluorescencia arriba de la banda 28 S. (Figura 3).

Para la detección del RNAm de la PRL por la técnica de fijación en mancha en su modalidad "manual" se analizaron 8, 6, 4 y 2  $\mu$ g de cada uno de los preparados de RNA. Se incluyó además

**TABLA 5. EVALUACION DE LOS RNAs PURIFICADOS A PARTIR DE LAS ADENOHIPOFISIS DE LAS RATAS DEL EXPERIMENTO I.**

Grupo	Tratamiento	Dosis/Día <sup>a</sup> μg (TFP)	Producción <sup>b</sup> μg	Pureza <sup>c</sup>	Integridad <sup>d</sup>
1	Aceite	-	-	-	-
2	E <sub>2</sub>	-	166	1.7	+
3	TFP	21	181	1.7	+
4	E <sub>2</sub> + TFP	21	91	1.7	+

<sup>a</sup>. la dosis por día del grupo tratado con E<sub>2</sub> fué de 20 μg

<sup>b</sup>. en μg de RNA recuperado

<sup>c</sup>. valorada por la relación de absorbancia 260/280 nm.

<sup>d</sup>. <+> indica integridad y <-> indica degradación de los transcritos.

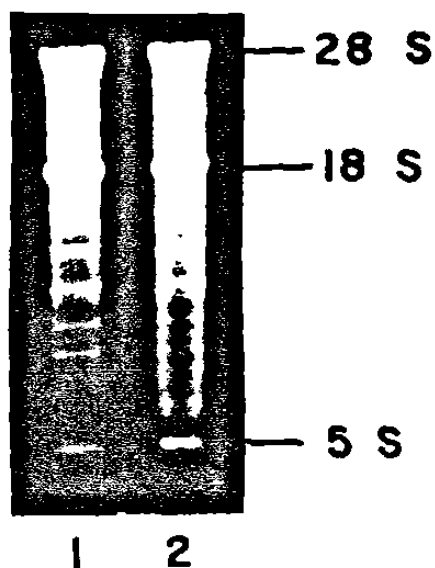


Figura 3. Ejemplo del perfil electroforético de RNAs recuperados de las adenohipófisis de las ratas del experimento I. Los RNAs se extrajeron por la técnica de isotiocianato de guanidina/cloruro de litio, se separaron en gel de agarosa-urea-ácido, se tificaron con bromuro de etidio y se visualizaron por iluminación con luz U.V. Las imágenes corresponden a los RNAs de los animales tratados con 17  $\beta$ -estradiol (1) y trifluoperazina (2).

como testigo negativo de hibridación a RNA de hígado de rata. En el autorradiograma se observó que conforme disminuyó la cantidad de RNA fijado fué menor la señal autorradiográfica en la película de rayos X. La comparación de los tres tratamientos en cada una de las alícuotas reveló que el  $E_2$  indujo los niveles de RNAm de PRL más altos y la TFP los niveles más bajos. Cuando la TFP se administró conjuntamente con el  $E_2$  los niveles de RNAm de PRL fueron intermedios a los grupos antedichos. El RNA de hígado no dió señal (figura 4).

El análisis de los transcritos por la técnica de "Northern" se realizó desnaturalizando las muestras con glioxal y separándolas por electroforesis en gel tipo cortina vertical. Se procesaron 7.5  $\mu$ g de RNA de los grupos de ratas tratadas con  $E_2$ , TFP y  $E_2$  + TFP y se incluyó como testigo negativo de hibridación a RNA del hígado de rata. El autorradiograma reveló que los niveles de RNAm de PRL fueron mayores en el grupo de ratas tratadas con  $E_2$ , en segundo término el de las ratas tratadas con  $E_2$  + TFP y por último, el de aquellos tratadas con TFP. El RNA de hígado de rata, no dió señal de hibridación. (Figura 5).

#### VI.c. EXPERIMENTO IIa. EFECTO DE CINCO DOSIS DE TFP.

De las adenohipófisis de los 10 grupos de ratas del experimento IIa se obtuvo RNA en suficiente cantidad, adecuada pureza e integridad. De 9 de ellos se purificaron más de 120  $\mu$ g y en uno 71  $\mu$ g. La relación de la absorbancia 260/280 nm varió entre 1.5 y 1.6 (Tabla 6). Este valor es cercano al óptimo e indica un grado aceptable de la pureza del RNA. Con el análisis de las muestras en gel de agarosa-urea-ácido se constató la integridad y ausencia de DNA (figura 6).

La evaluación del contenido del RNAm de PRL se llevó a cabo por las técnicas de fijación en mancha y transferencia tipo Northern. La primera de ellas se realizó una vez en su modalidad "manual" y dos con la ayuda del aparato comercial (Vacusystem, ABN). En los tres ensayos se fijaron por duplicado 5  $\mu$ g de RNA de cada uno de los grupos y del testigo negativo de hibridación (RNA de hígado de rata). En los autorradiogramas se observó que los grupos de ratas tratadas con aceite y solución salina presentaron un nivel similar de RNAm de PRL. El grupo tratado con  $E_2$  dió los niveles más altos de RNAm de PRL. Finalmente los grupos que recibieron dosis de TFP sola y conjunta con el  $E_2$  dieron niveles similares a los grupos tratados con solución salina y aceite. Una vez más, con el RNA de hígado de rata no se obtuvo señal (Figura 7).

El conteo de la radiactividad unida a cada una de las áreas donde se fijó RNA por la técnica en mancha concordó con la apreciación visual de los autorradiogramas. El análisis estadístico de la  $X^2$  DE (Tabla 7) del incremento de RNAm de PRL con

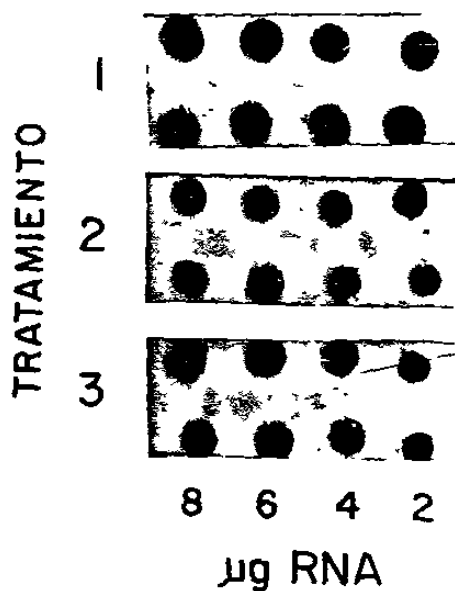


Figura 4. Autorradiograma de la hibridación en mancha de los RNAs del experimento I y  $^{32}\text{P}$ -pPrl-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento I que incluyó a los RNAs de las adenohipófisis de ratas sometidas a los tratamientos con  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (1), trifluoperazina (TFP) (2), y  $\text{E}_2$  + TFP (3). La hibridación se realizó usando como rastreador molecular a pPrl-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

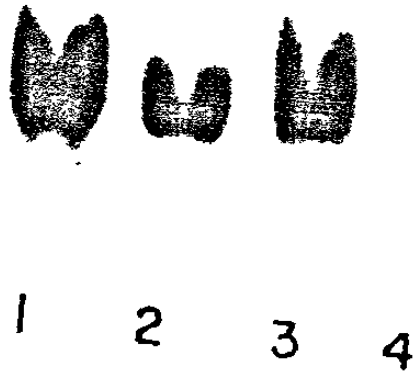


Figura 5. Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento I y  $^{32}\text{P}$ -pPrl-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento I que incluyó a los RNAs de las adenohipófisis de las ratas sometidas a los tratamientos con 17  $\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (1), trifluoperazina (TFP) (2) y  $\text{E}_2$  + TFP (3). Se incluyó también RNA de hígado de rata (4). En cada carril se resolvieron 7.5  $\mu\text{g}$  de los RNAs que se desnaturalizaron con glixal. La electroforesis fué vertical en gel de agarosa, la transferencia a papel de nitrocelulosa y la hibridación con pPrl-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.



TABLA 6. EVALUACION DE LOS RNAs PURIFICADOS A PARTIR DE LAS ADENOHIPOFISIS DE LAS RATAS DEL EXPERIMENTO IIa.

Grupo	Tratamiento	Dosis/día <sup>a</sup> μg (TFP)	Producción <sup>b</sup> μg	Pureza <sup>c</sup>	Integridad
1	aceite	-	124	1.5	+
2	solución salina	-	189	1.5	+
3	E <sub>2</sub>	-	163	1.5	+
4	TFP	12	125	1.5	+
5	TFP	48	114	1.4	+
6	TFP	96	71	1.3	+
7	E <sub>2</sub> + TFP	12	200	1.5	+
8	E <sub>2</sub> + TFP	24	183	1.6	+
9	E <sub>2</sub> + TFP	36	153	1.5	+
10	E <sub>2</sub> + TFP	48	170	1.4	+

<sup>a</sup>. la dosis/día del grupo tratado con E<sub>2</sub> fué de 20 μg.

<sup>b</sup>. en μg de RNA recuperado.

<sup>c</sup>. valorada por la relación de absorbancia 260/280 nm.

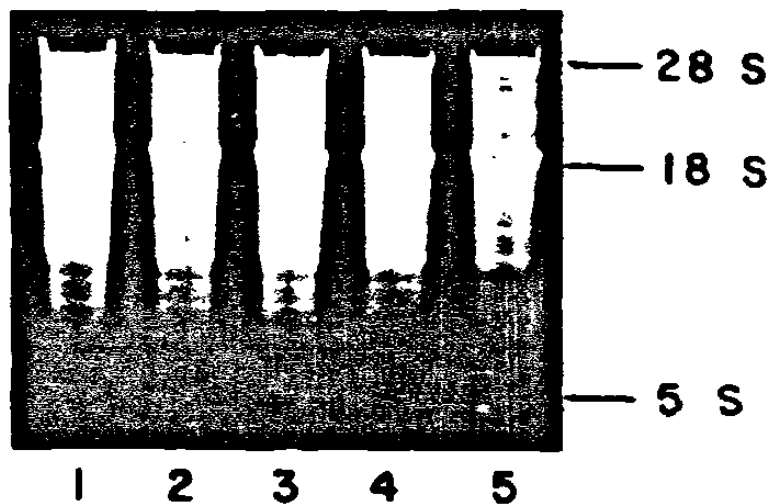


Figura 6. Ejemplo del perfil electroforético de RNAs recuperados de las adenohipófisis de las ratas del experimento IIa. Los RNAs se extrajeron por la técnica de isotiocianato de guanidina-cloruro de litio, se separaron en gel de agarosa-urea-ácido, se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Las imágenes corresponden a los animales tratados con aceite (1), las dosis de trifluoperazina (TFP) de 12, 48 y 96  $\mu\text{g}/\text{día}$  (2, 3 y 4) y 17  $\beta$ -estradiol + TFP de 48  $\mu\text{g}/\text{día}$  (5).

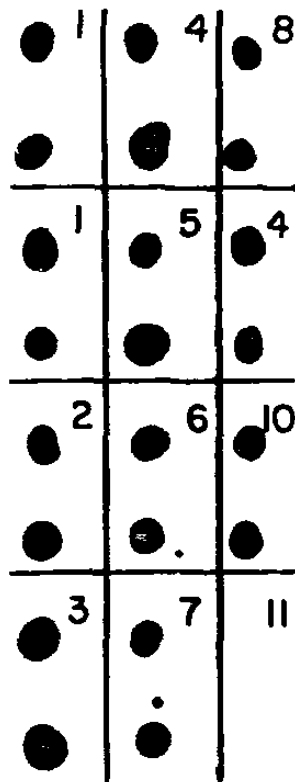


Figura 7. Autorradiograma de la hibridación en mancha entre los RNAs de adenohipófisis del experimento IIa y  $^{32}\text{P}$ -pPrl-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento IIa que incluyó a ratas sometidas a los tratamientos con aceite (1), solución salina (2),  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (3), las dosis de  $\text{E}_2$  + las 4 dosis de trifluoperazina (TFP) de 12, 24, 36 y 48  $\mu\text{g}/\text{día}$  (4, 5, 6 y 7) y las 3 dosis de TFP de 12, 48 y 96  $\mu\text{g}/\text{día}$  (8, 9 y 10). Se incluyó también RNA de hígado de rata (11). Cinco  $\mu\text{g}$  de RNA total se fijaron a papel de nitrocelulosa y se hibridaron con pPrl-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

TABLA 7. VALORES CUANTITATIVOS DEL INCREMENTO DEL RNAm DE PRL DE RATA DEL EXPERIMENTO IIa

Grupo	Tratamiento	Dosis/Día* µg (TFP)	Incremento <sup>δ</sup>		n
			X	DE	
1	aceite	-	1.01	0.026	3
2	solución salina	-	0.93	0.15	3
3	E <sub>2</sub>	-	2.10	0.18	3
4	E <sub>2</sub> + TFP	12	0.98	0.17	3
5	E <sub>2</sub> + TFP	24	1.12	-	2
6	E <sub>2</sub> + TFP	36	1.58	-	2
7	E <sub>2</sub> + TFP	48	0.97	0.12	3
8	TFP	12	0.93	0.18	3
9	TFP	48	0.97	0.18	3
10	TFP	96	0.61	-	1

\*. Valores calculados a partir de las cpm detectadas en los filtros de nitrocelulosa con RNA fijado en mancha y en donde se tomó como base de 1 a una de las cpm del grupo tratado con aceite.

cada una de las dosis indicó una diferencia significativa entre el valor de la X del grupo tratado con E<sub>2</sub> y el del resto de los grupos (p < 0.01) (Figura 8).

La transferencia tipo Northern se realizó por duplicado (figura 9 y 10). En una, las muestras se desnaturalizaron por la técnica de formamida-formaldehído y en la otra por la técnica de glioxal.

En la transferencia donde se desnaturalizaron las muestras con formamida/formaldehído se tomaron 5.0 µg de RNA de cada uno de los grupos y de hígado de rata. La resolución electroforética se realizó en gel horizontal. En el autorradiograma se apreció que los niveles de RNAm de PRL fueron similares en las ratas tratadas con solución salina y aceite y superiores en las tratadas con E<sub>2</sub>. Los RNAs de los grupos de ratas tratados con TFP más E<sub>2</sub> presentaron niveles de RNAm de PRL similares a los grupos tratados con solución salina, mientras que los animales tratados únicamente con TFP mostraron niveles ligeramente inferiores a éstos últimos (Figura 9).

Para la transferencia tipo Northern donde las muestras se desnaturalizaron con glioxal, se procesaron 5.0 µg de RNA de cada grupo, excepto para las dosis de TFP de 24 y 96 µg/día (estos RNAs se habían ya agotado), y se separaron en un gel de agarosa en posición horizontal. En general los niveles de RNAm de PRL detectados fueron similares a los del experimento donde el RNA se desnaturalizó con formamida-formaldehído (Figura 10).

#### EXPERIMENTO IIb. EFECTO DE CINCO DOSIS DE TFP.

La extracción de RNA total de las 8 adenohipófisis de ratas de cada uno de los grupos del experimento IIb rindió entre 120 y 200 µg. La pureza se consideró óptima al obtener valores de relación de absorbancia mayores de 1.8 (Tabla 8). También se consideró aceptable su integridad al visualizar en el gel de agarosa urea-ácido, las bandas de RNA ribosomal 28 S y 18 S, nítidas y en la proporción adecuada.

El efecto de TFP sobre los niveles de RNAm de PRL obtenidos por medio de la técnica de transferencia tipo Northern reveló que los grupos de ratas tratadas con aceite y solución salina presentaron niveles similares de RNAm de PRL. La TFP ocasionó un incremento de ellos conforme se aumentó la dosis. Para la dosis de TFP de 12 µg/día los niveles fueron similares a los basales; para la dosis de 96 µg/día fueron intermedios entre los basales y los del grupo que recibió E<sub>2</sub>. Los transcritos para PRL de las ratas que recibieron E<sub>2</sub> más una de las cuatro dosis de TFP (12, 24, 36, y 48 µg/día) también se incrementaron con la dosis. Para las dosis de TFP de 12 y 24 µg/día los niveles detectables de RNAm de PRL fueron similares a los basales, para la dosis de 36

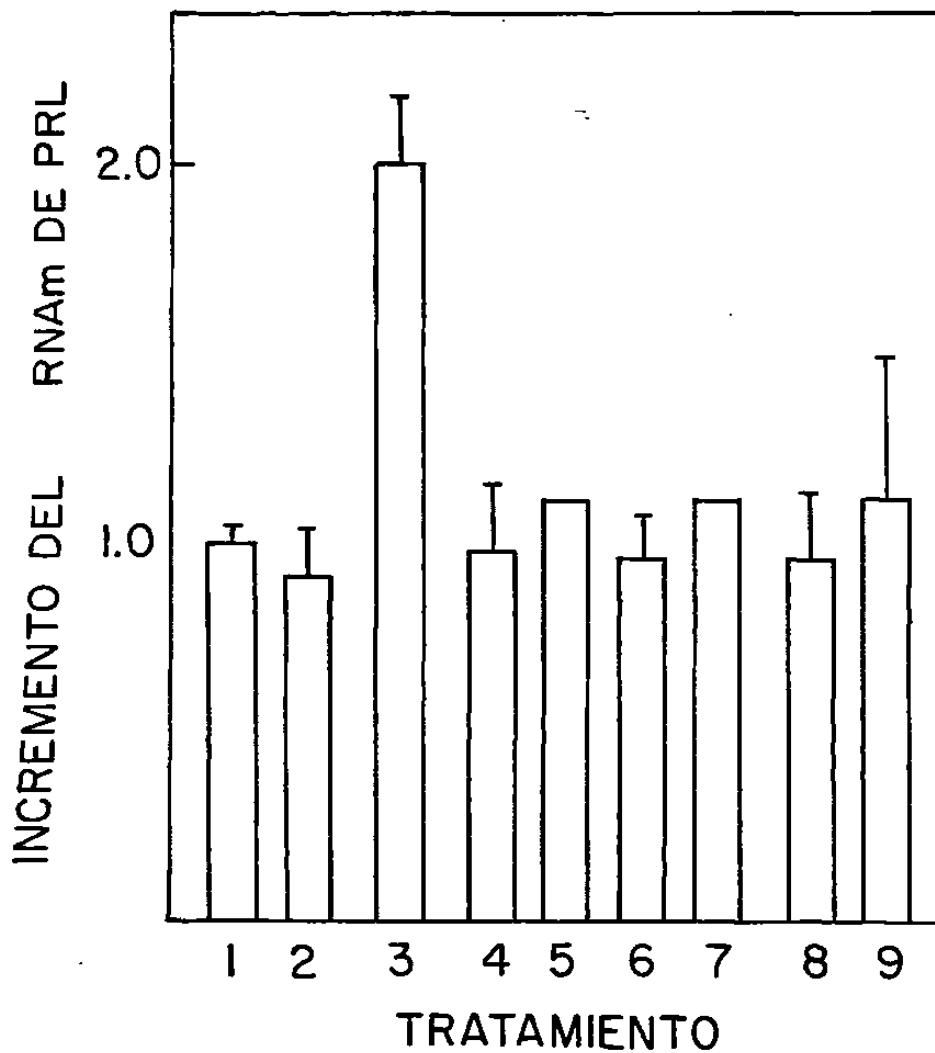


Figura 8. Gráfica de la cuantificación del RNAm de PRL de rata del experimento IIa mediante espectrofotometría en centelleo líquido. Incremento de los RNAm de PRL en ratas macho Sprague-Dawley sometidas a los tratamientos del experimento IIa con aceite, solución salina (2), 17  $\beta$ -estradiol (3), las 3 dosis de trifluoperazina (TFP) de 12, 48 y 96  $\mu\text{g}/\text{día}$  (4, 5 y 6), y  $\text{E}_2$  + las 4 dosis de TFP de 12, 24, 36 y 48  $\mu\text{g}/\text{día}$  (7, 8, 9 y 10). El incremento se calculó a partir de las cpm de 5.0  $\mu\text{g}$  de RNA fijados en mancha, hibridados con  $^{32}\text{P}$ -pPri-1 y llevados a un contador de centelleo líquido. Se tomó como base de 1 a una de las cpm del grupo tratado con aceite.

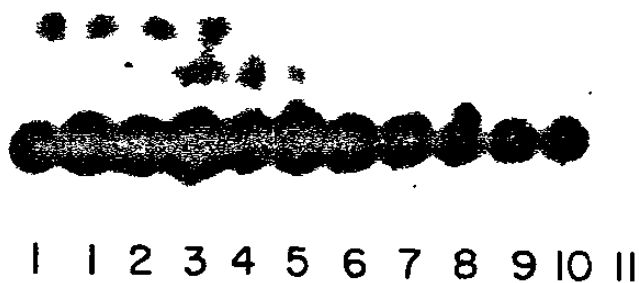


Figura 9. Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IIa y  $^{32}\text{P}$ -pPrl-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento IIa que incluyó a ratas sometidas a los tratamientos con aceite (1), solución salina (2),  $17\beta$ -estradiol (3),  $\text{E}_2$  + 4 dosis de trifluoperazina (TFP) de 12, 24, 36 y 48  $\mu\text{g}/\text{día}$  (4, 5, 6 y 7) y las 3 dosis de TFP de 12, 48 y 96  $\mu\text{g}/\text{día}$  (8, 9 y 10). Se incluyó también RNA de hígado de rata (11). En cada carril se resolvieron 5.0  $\mu\text{g}$  de los RNA que se desnaturalizaron con formamida/ formaldehído. La electroforesis fue horizontal, la transferencia a filtro de nitrocelulosa y la hibridación con pPrl-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

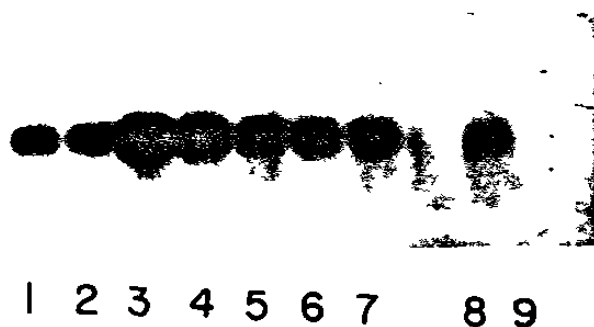


Figura 10. Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IIa  $^{32}\text{P}$ -pPr1-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento IIa que incluyó a ratas sometidas a los tratamientos con aceite (1), solución salina (2),  $17\ \beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (3), la dosis de  $\text{E}_2$  + 4 dosis de trifluoperazina (TFP) de 12, 24, 36 y 48  $\mu\text{g}/\text{día}$  (4, 5, 6 y 7) y la dosis de TFP de 48  $\mu\text{g}/\text{día}$  (8). Se incluyó también RNA de hígado de rata (9). En cada carril se resolvieron 5.0  $\mu\text{g}$  de RNA total que se desnaturalizaron con glioxal. La electroforesis fué horizontal, la transferencia a filtro de nitrocelulosa y la hibridación con pPr1-1 marcado con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.



TABLA 8. EVALUACION DE LOS RNAs PURIFICADOS A PARTIR DE LAS ADENOHIPOFISIS DE LAS RATAS DEL EXPERIMENTO IIB

Grupo	Tratamiento	Dosis/Día <sup>a</sup> μg (TFP)	Producción <sup>b</sup> μg	Pureza <sup>c</sup>	Integridad
1	aceite	-	192	1.9	+
2	solución salina	-	130	1.8	+
3	E <sub>2</sub>	-	184	1.9	+
4	TFP	12	107	1.8	+
5	TFP	48	179	1.9	+
6	TFP	96	128	1.9	+
7	E <sub>2</sub> + TFP	12	156	1.8	+
8	E <sub>2</sub> + TFP	24	172	1.9	+
9	E <sub>2</sub> + TFP	36	156	1.9	+
10	E <sub>2</sub> + TFP	48	128	1.9	+

<sup>a</sup>. la dosis/día de los grupos tratados con E<sub>2</sub> fué de 20 μg.

<sup>b</sup>. en μg de RNA recuperado.

<sup>c</sup>. valorada por la relación de absorbancia 260/280 nm.

$\mu\text{g}/\text{día}$  intermedios a los basales y los observados con el  $\text{E}_2$ ; no así para la dosis de TFP de  $48 \mu\text{g}/\text{día}$ , en la que se observaron similares a los del  $\text{E}_2$  (figura 11).

#### VI.d. EXPERIMENTO III. EFECTO DE CINCO DOSIS DE $\text{W}_7$ .

La extracción de RNA total de las 5 adenohipófisis de ratas de cada uno de los grupos experimentales fué de alrededor de  $100 \mu\text{g}$  (tabla 9). La pureza de los transcritos se consideró óptima al obtenerse valores de relación de absorbancia de 260/280 entre 1.8 y 2.0. Su buena integridad quedó manifiesta al observar los transcritos nítidos y en la proporción adecuada en el gel de agarosa-urea-ácido.

El efecto de diferentes dosis de  $\text{W}_7$  se analizó por la técnica de transferencia tipo Northern y reveló que los grupos tratados con aceite y solución salina no presentaron diferencia en los niveles de RNAm de PRL y que el  $\text{E}_2$  los incrementó notablemente. Las diferentes dosis de  $\text{W}_7$  (9.4, 37.5 y  $75 \mu\text{g}/\text{día}$ ) causaron en las ratas un nivel de transcritos similar al de los grupos tratados con aceite y solución salina. Finalmente, la administración conjunta del  $\text{E}_2$  y de cada una de las dosis de  $\text{W}_7$  (9.4, 18.7, 28.1 y  $37.5 \mu\text{g}/\text{día}$ ) causaron en las ratas niveles comparativamente iguales al de los grupos tratados con aceite y solución salina (figura 12).

#### VI.e. EXPERIMENTO IV. EFECTO DE UNA DOSIS DE MTC.

El RNA que se extrajo de cada uno de los conjuntos de adenohipófisis de las ratas del experimento IV, reunió los requisitos para el análisis del RNAm de PRL. La extracción de RNA total de cada grupo rindió entre  $150$  y  $250 \mu\text{g}$ . La pureza se consideró aceptable al obtenerse valores de la relación de absorbancia de 260/280 nm de 1.7 (Tabla 10). Los transcritos se visualizaron íntegros y en la proporción adecuada en el gel de agarosa-urea-ácido.

Los RNAs se fijaron a filtros de nitrocelulosa con ayuda del aparato "vacusystem", tanto en su forma en mancha como en su forma en línea:  $5 \mu\text{g}$  de RNA se fijaron por la primera técnica y  $3 \mu\text{g}$  por la segunda. También se analizó el RNA por la técnica de transferencia tipo "Northern". En ella  $5 \mu\text{g}$  de cada uno de los grupos se desnaturalizaron por la técnica de glioxal y se separaron en gel de agarosa horizontal. En los autorradiogramas obtenidos por las 3 técnicas (Figura 13, 14 y 15) se observó que el  $\text{E}_2$  y la MTC incrementaron los niveles basales de RNAm de PRL. Sin embargo, el efecto de la MTC fué menor al del  $\text{E}_2$ . El  $\text{E}_2$  más la MTC administradas conjuntamente incrementaron los niveles de RNAm de PRL más de lo que causó el  $\text{E}_2$ .

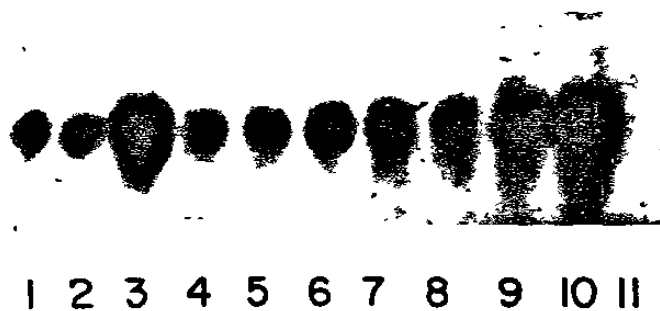


Figura 11. Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IIB y  $^{32}\text{P}$ -pPr1-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento IIB que incluyó a las ratas sometidas a los tratamientos con aceite (1), solución salina (2), 17  $\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (3), las 3 dosis de trifluoperazina (TFP) 12, 48 y 96  $\mu\text{g}/\text{día}$  (4, 5 y 6) y  $\text{E}_2$  + 4 dosis de TFP 12, 24, 36 y 48  $\mu\text{g}/\text{día}$  (7, 8, 9 y 10). Se incluyó también RNA de hígado de rata (11). En cada carril se resolvieron 5.0  $\mu\text{g}$  de RNA total que se desnaturalizaron con glioxal. La electroforesis fué horizontal, la transferencia a filtro de nitrocelulosa y la hibridación con pPr1-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

TABLA 9. EVALUACION DE LOS RNAs PURIFICADOS A PARTIR DE LAS ADENOHIPOFISIS DE LAS RATAS DEL EXPERIMENTO III.

Grupo	Tratamiento	Dosis/Día <sup>a</sup> μg (W <sub>7</sub> )	Producción <sup>b</sup> μg	Pureza <sup>c</sup>	Integridad
1	aceite	-	192	1.9	+
2	solución salina	-	130	1.8	+
3	E <sub>2</sub>	-	184	1.9	+
4	W <sub>7</sub>	9.8	107	1.9	+
5	W <sub>7</sub>	37.5	116	1.9	+
6	W <sub>7</sub>	75.0	96	1.8	+
7	E <sub>2</sub> + W <sub>7</sub>	9.8	140	1.9	+
8	E <sub>2</sub> + W <sub>7</sub>	18.7	134	1.9	+
9	E <sub>2</sub> + W <sub>7</sub>	28.1	144	1.9	+
10	E <sub>2</sub> + W <sub>7</sub>	37.5	94	2.0	+

<sup>a</sup>. la dosis/día de los grupos tratados con E<sub>2</sub> fué de 20 μg.

<sup>b</sup>. en μg de RNA recuperado.

<sup>c</sup>. valorada por la relación de absorvancia 260/280 nm.

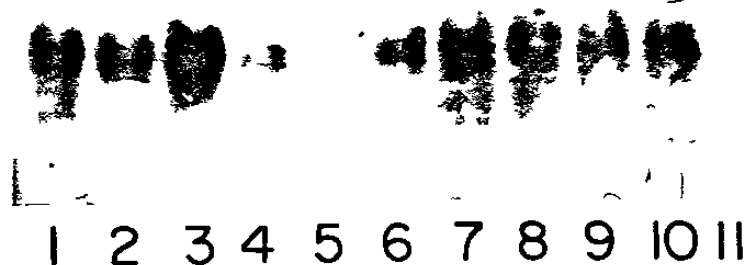


Figura 12. Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento III y  $^{32}\text{P}$ -pPr1-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento III que incluyó a las ratas sometidas a los tratamientos con aceite (1), solución salina (2), 17  $\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (3), las 3 dosis de  $\text{W}$  de 9.8, 37.5 y 75  $\mu\text{g}/\text{día}$  (4, 5 y 6) y  $\text{E}_2$  + las 4 dosis de  $\text{W}$  de 9.8, 18.7, 28.1 y 37.5  $\mu\text{g}/\text{día}$  (7, 8, 9 y 10). Se incluyó también hígado de rata (11). En cada carril se resolvieron 5  $\mu\text{g}$  de RNA total que se desnaturalizaron con glioxal. La electroforesis fué horizontal, la transferencia a filtro de nitrocelulosa y la hibridación con pPr1-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

TABLA 10. EVALUACION DE LOS RNAs PURIFICADOS A PARTIR DE LAS ADENOHIPOFISIS DE LAS RATAS DEL EXPERIMENTO IV.

Grupo	Tratamiento	Dosis/día <sup>a</sup> µg (MTC)	Producción <sup>b</sup> µg	Pureza <sup>c</sup>	Integridad
1	solución salina	-	154	1.7	+
2	E <sub>2</sub>	-	252	1.7	+
3	MTC	99	142	1.7	+
4	E <sub>2</sub> + MTC	99	204	1.7	+

<sup>a</sup>. la dosis/día de los grupos tratados con E<sub>2</sub> fué de 20 µg.

<sup>b</sup>. en µg de RNA recuperado.

<sup>c</sup>. valorada por la relación de absorbancia a 260/280 nm.

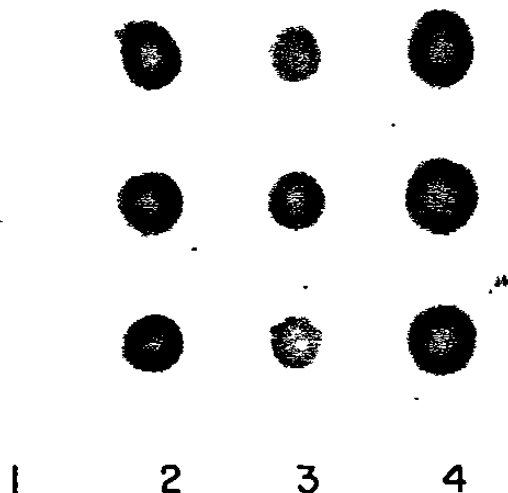


Figura 13. Autorradiograma de la hibridación en mancha entre los RNAs de las adenohipófisis de ratas del experimento IV y  $^{32}\text{P}$ -pPr1-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento IV que incluyó a ratas sometidas a los tratamientos con solución salina (1),  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (2), metoclopramida (MTC) (3) y  $\text{E}_2$  + MTC (4). Cinco  $\mu\text{g}$  de RNA total/alícuota se fijaron a filtro de nitrocelulosa y se hibridaron con pPr1-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

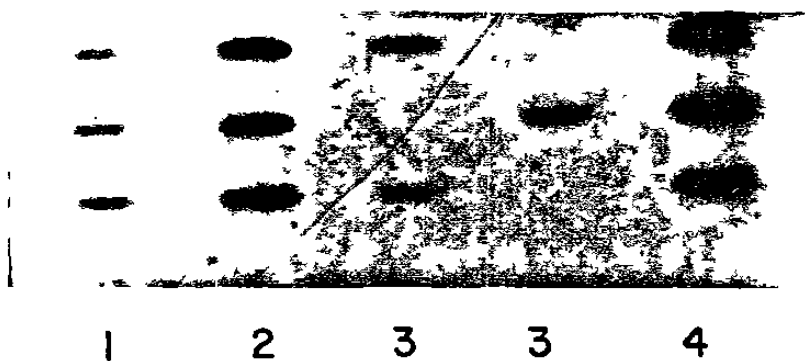


Figura 14. Autorradiograma de la hibridación en línea entre los RNAs de las adenohipófisis de ratas del experimento IV y  $^{32}\text{P}$ -pPr1-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento IV que incluyó a ratas sometidas a los tratamientos con solución salina (1),  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (2), metoclopramida (MTC) (3) y  $\text{E}_2$  + MTC (4). Tres  $\mu\text{g}$  de RNA total se fijaron a filtro de nitrocelulosa y se hibridaron con pPr1-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

1020091096





1 2 3 4 5

Figura 15. Autorradiograma de la hibridación tipo Northern del experimento IV y  $^{32}\text{P}$ -pPr1-1. Se muestra el autorradiograma resultante del experimento IV que incluyó a ratas sometidas a los tratamientos con solución salina (1),  $17\beta$ -estradiol ( $\text{E}_2$ ) (2), metoclopramida (MTC) (3) y  $\text{E}_2$  + MTC (4). Se incluyó también RNA de hígado de rata. En cada carril se resolvieron  $5.0\ \mu\text{g}$  de RNA total que se desnaturalizaron con glioxal. La electroforesis fue horizontal, la transferencia a filtro de nitrocelulosa y la hibridación con pPr1-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP.

El análisis estadístico de la  $X^2$  DE del incremento de RNAmde PRL (tabla 11) indicó un incremento significativo al ocasionado tanto por el  $E_2$  como por el  $E_2$  más la MTC ( $p < 0.01$ ) y no significativo al inducido por la MTC. Este mismo estudio estadístico indicó un incremento significativo al promovido por la administración conjunta del  $E_2$  + la MTC sobre el dado por el  $E_2$  ( $p < 0.01$ ) (figura 16).

TABLA 11. VALORES CUANTITATIVOS DEL INCREMENTO DE RNAm DE PRL DE RATA DEL EXPERIMENTO IV.

Grupo	Tratamiento	Dosis/día <sup>a</sup> μg (TFP)	Incremento <sup>b</sup>		n
			X	DE	
1	solución salina	-	1.0	0.23	3
2	MTC	99	1.53	0.30	3
3	E <sub>2</sub>	-	4.07	0.97	3
4	E <sub>2</sub> + MTC	99	6.28	0.46	3

<sup>a</sup>. la dosis/día de los grupos tratados con E<sub>2</sub> fué de 20 μg.

<sup>b</sup>. valores calculados a partir de las cpm detectadas en los filtros de nitrocelulosa con RNA fijado en mancha y en donde se tomó como base de 1 a una de las cpm del grupo tratado con solución salina.

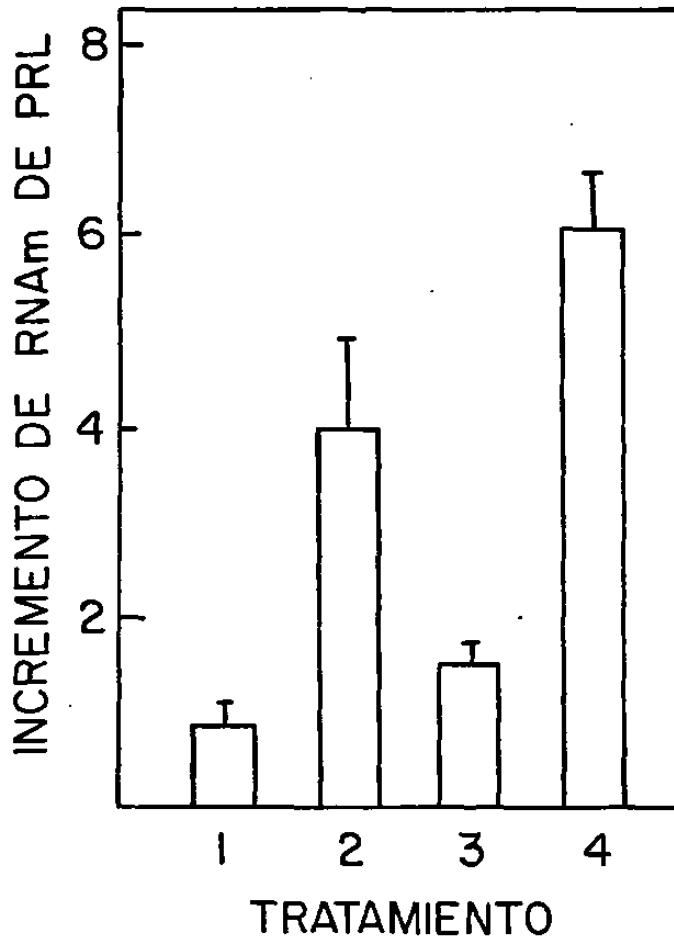


Figura 16. Gráfica de la cuantificación del RNAm de la PRL de rata del experimento IV mediante espectrofotometría en centelleo líquido. Incremento del RNAm de la PRL en ratas macho Sprague-Dawley sometidas a los tratamientos con solución salina (1),  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ) (2), metoclopramida (MTC) (3), y  $E_2$  + MTC (4). El incremento se calculó a partir de las cpm de  $5.0\ \mu\text{g}$  de RNA fijados en mancha e hibridados con pPrl-1 marcado radiactivamente con  $^{32}\text{P}$ -dCTP. Se tomó como base de 1 a una de las cpm del grupo tratado con solución salina

## VII. DISCUSION Y CONCLUSIONES.

En los experimentos I, IIa y IV evaluamos el RNAm de la PRL las 3 técnicas de fijación de RNA: tipo Northern, en línea y en mancha y corroboramos que las tres dan resultados similares.

En el experimento IIa realizamos una transferencia tipo Northern por la técnica de desnaturalización de RNA con formamida/formaldehído y otra por la técnica de glioxal y ambos procedimientos dieron resultados similares. Las líneas observables en la parte superior del autorradiograma resultante de la hibridación tipo Northern por la técnica con formamida/formaldehído corresponden a transcritos nucleares, y con ello se corroboró la mayor eficiencia de esta técnica (8). Siendo nuestro interés la detección de los transcritos maduros de la PRL y habiendo proporcionado ambas técnicas resultados similares para este parámetro se empleó en lo sucesivo la técnica con glioxal. Esta técnica es menos laboriosa y no requiere formaldehído (reactivo tóxico e irritante) (8).

En el experimento IIa y IV realizamos un análisis cuantitativo mediante la medición de la radiactividad unida al RNA fijado en mancha. De esta valoración fué importante confirmar que entre los valores de los grupos testigos negativos (ratas tratadas con aceite y solución salina) no hubo diferencia significativa y si entre éstos y el grupo testigo positivo (ratas tratadas con  $E_2$ ). La importancia radicó en que ellos fueron puntos de referencia en la valoración del efecto de la TFP, W, y MTC.

El experimento IIa se repitió a fin de corroborar y completar los resultados. Los resultados de ambos experimentos si bien no concordaron totalmente, no fueron contradictorios. En ambos, el grupo de ratas tratadas con aceite y solución salina presentaron similares los niveles de RNAm de PRL y el grupo tratado con  $E_2$  marcadamente más elevados. Igualmente, en ambos experimentos, la TFP no fué capaz de disminuir los niveles basales de RNAm de PRL, aunque en el segundo experimento se detectó un efecto inductor al aumentar la dosis. La TFP bloqueó la acción del  $E_2$  en ambos experimentos: sin embargo en el IIa el bloqueo fué con todas las dosis y en el IIb disminuyó al ellas aumentar, llegando a ser nulo a la última. Dado que hubo menos problemas técnicos al repetir este estudio, consideramos más confiables los resultados del experimento IIb y sobre ellos basamos nuestras conclusiones.

Los grupos de ratas tratadas con aceite y solución salina presentaron similares los niveles de RNAm de PRL. De ninguna de estas sustancias hay informes de efecto sobre la producción de PRL, por lo que a éstos niveles los consideramos los basales.

El nivel de transcritos para PRL que presentó el grupo de ratas tratadas con  $E_2$  fué notoriamente más alto que el basal. En el animal intacto y en cultivo de células adenohipofisarias, está demostrado que el  $E_2$  incrementa la producción de la PRL promoviendo la duplicación del lactotrofo (2) y la transcripción del gen (36, 42). Las ratas hembras son más susceptibles al  $E_2$ , sin embargo, en ambos sexos se aumenta de 3 a 5 veces la síntesis de la PRL, después de 3 a 4 días de tratamiento (50). Decidimos emplear ratas macho Sprague-Dawley, con el objeto de eliminar cualquier posibilidad de influencia estrogénica. El incremento de RNAm de PRL así inducido en las ratas macho fué similar al informado en las ratas hembras Sprague-Dawley ovariectomizadas (36).

Ninguna de las dosis de  $W_7$  modificaron los niveles basales de RNAm de PRL y el efecto del  $E_2$  fué bloqueado totalmente por ellas. En el animal intacto, no hay datos sobre la acción del  $W_7$  a nivel de la producción de PRL. No obstante, el efecto antiestrogénico del  $W_7$  pudiera deberse a su propiedad de inhibir la CaM. Este efecto del  $W_7$  recuerda al del tamoxifen (fármaco antiestrogénico *in vivo* e *in vitro*) el cual, además de actuar compitiendo por el receptor estrogénico (44), posee la capacidad de inhibir CaM (26).

Las mismas concentraciones molares de  $W_7$  se ensayaron con la TFP. Con este fármaco se aumentaron los niveles basales de RNAm de PRL a un nivel no superior a los inducidos por el  $E_2$ . La TFP es un fármaco antidopaminérgico (19) así como inhibidor de CaM (56). La DA es capaz de inhibir la transcripción del gen de la PRL (34, 35), por lo cual, fué lógico que este fármaco antidopaminérgico promoviera el aumento de los transcritos para PRL. Quedó fuera de nuestro alcance determinar si la propiedad de la TFP de inhibir CaM influyó en la magnitud del incremento de los transcritos. La TFP a las dosis de 12 y 24  $\mu\text{g}$  bloqueó totalmente el efecto del  $E_2$ , a la dosis de 36  $\mu\text{g}$ , parcialmente y no tuvo efecto a la dosis de 48  $\mu\text{g}$ . El mecanismo de acción del  $E_2$  para estimular la producción de PRL no está aún detallado, sin embargo, se postula que además de actuar en el lactotrofo (14, 36) interviene y modifica el sistema dopaminérgico. Así pues, se informa que bajo la influencia del  $E_2$  los receptores dopaminérgicos en la adenohipófisis están disminuidos (25). Bajo estas circunstancias, en el sistema portal, los niveles de DA en el sistema portal están disminuidos y aumentados los de la TRH (14, 21). Un dato más, es que las células lactotrópicas son más sensibles a la TRH cuando la acción de la DA es bloqueada (33). Sobre el mecanismo de acción intracelular del  $E_2$ , se sugiere la participación de CaM. Las evidencias provienen partir de células adenohipofisarias y de otros tipos de células blanco para los estrógenos (45, 51) y en donde de la inhibición de CaM ha redundado en un efecto antiestrogénico. Nosotros asumimos que en los resultados del presente trabajo la TFP bloqueó la acción del

$E_2$ , por su interacción con CaM, y que esta propiedad influyó en la menor manifestación de su propiedad antidopaminérgica. Los resultados con MTC, fármaco antidopaminérgico y no inhibidor de CaM, apoyan nuestra suposición. Una dosis molar de MTC menor a las de la TFP estimuló los niveles basales de PRL y potenció los inducidos por el  $E_2$ .

El  $W_7$  y la TFP no solo actúan inhibiendo a fosfodiesterasas de AMPc dependientes de CaM y a otras fosfatasas y cinasas nucleares y citoplasmáticas dependientes de CaM (4, 38, 59), sino también presentan acciones a nivel de membrana que modifican el nivel de calcio intracelular (18, 52, 53). Ambos fármacos son similares en su potencia para inhibir CaM, pero el  $W_7$  es más específico por tener menor solubilidad lipídica (18). Así pues, consideramos que en la diferencia del efecto de estos fármacos sobre los niveles de RNAm de PRL basales y los inducidos por el  $E_2$ , no solo contribuyó la reconocida acción antidopaminérgica de la TFP, sino también la diferencia de especificidad de acción intracelular.

En cultivo primario de células adenohipofisarias de rata, el  $W_7$  y la TFP disminuyeron los niveles basales de PRL y bloquearon el efecto inductor del  $E_2$  (32). En este modelo experimental, resulta más factible involucrar a la CaM en el mecanismo de acción intracelular del  $E_2$ . En el animal intacto, la influencia hipotalámica dificulta determinar la magnitud con que la inhibición de la CaM en el lactotrofo contribuyó en los resultados y la magnitud del efecto de estos fármacos sobre otras células con influencia directa o indirecta ya en la fisiología del lactotrofo o en los mecanismos de regulación de su producción.

No obstante, pese a estas limitaciones que nos impiden ser conclusivos es claro el efecto antiestrogénico del  $W_7$  y la TFP sobre los niveles de RNAm de PRL.

## VIII. PERSPECTIVAS.

El hacer evidente un evento molecular en un modelo *in vivo*, como lo es en ratas, tiene especial relevancia por la proyección que a la fisiología del mamífero o del hombre pudiera hacerse. El hecho de que inhibidores de CaM hayan bloqueado el efecto estimulador del  $E_2$  en la producción de transcritos para PRL está acorde con la hipótesis de que la CaM está participando en el mecanismo de acción intracelular del  $E_2$ . Si bien, la demostración de esta hipótesis requiere aún de ensayos en modelos donde se controlen mejor las condiciones experimentales, los resultados que aportamos justifican la realización de experimentos que den en este modelo, mayor certeza a la participación de CaM. Opciones que sugerimos: son i) Emplear fármacos aún más específicos para inhibir CaM. ii) Hacer estudios en nucleos aislados de células adenohipofisarias provenientes de ratas tratadas de una manera similar o igual a la nuestra, tal como ensayar si la adición de CaM revierte el efecto inhibitor de estos fármacos. iii) Paralelamente se podría detectar por medio de electroforesis en 2 dimensiones el grado de fosforilación del receptor estrogénico.

Está establecido que el  $E_2$  estimula la producción de PRL actuando directamente en el lactotrofo y modificando por vía hipotalámica el sistema dopaminérgico y la liberación de la TRH (14, 21). Lograr constatar, en un modelo *in vivo*, el mecanismo de acción intracelular del  $E_2$  y de los genes que, además de la PRL son por él afectados, ayudaría en la determinación de la magnitud con que cada una de las diversas vías de acción del  $E_2$  aumentan la producción de la PRL.

De entre las alteraciones de las hormonas hipofisarias la hiperprolactinemia es la más frecuente. Las etiologías hasta ahora determinadas se han identificado en el sistema dopaminérgico (19). Sin embargo, persiste aún la hiperprolactinemia idiopática y se ignora lo que determina el establecimiento de un prolactinoma (21). La respuesta y solución a estos problemas se dará con el estudio de la regulación de la síntesis y secreción de la PRL y con la detección de las alteraciones en los estados patológicos. Como modelo de investigación de esta patología se ha tomado a líneas celulares de origen tumoral (11) y al tumor inducido en ratas Fisher, por medio de la administración crónica de  $E_2$ .

La CaM siendo una proteína ampliamente distribuida entre los organismos eucarióticos en sus diferentes tipos celulares, se ha involucrado en una diversidad de funciones celulares. Su participación es indispensable en el proceso del ciclo celular (17, 54). Los informes en diversas líneas tumorales sobre



alteraciones cualitativas y/o cuantitativas de la CaM son pocos y algunos contradictorios (9, 17). No obstante, algunos estudios preclínicos se han realizado empleando fármacos con la propiedad de inhibir CaM y se han obtenido resultados prometedores (17).

Así pues, el claro efecto bloqueador de la TFP y el  $W_7$  a la acción estimuladora del  $E_2$  sobre los niveles de RNAm de PRL motiva a hacer ensayos, en el modelo del tumor hipofisario, inducido en ratas Fisher, empleando éstos u otros fármacos con la propiedad de inhibir CaM. Obtener resultados positivos en este modelo involucrarían a mensajeros intracelulares (CaM) en la fisiopatología del prolactinoma. El pronóstico de esta patología se podría modificar con la utilización de dichos fármacos.

## BIBLIOGRAFIA

1. Adler, D. 1986. The anterior pituitary-grafted: A valid model of chronic hyperprolactinemia. *Endocr Rev.* 73:303-318.
2. Amara, J. Ch. Itallie and P. Dannies. 1987. Regulation of prolactin regulation and cell growth by estradiol: Difference in sensitivity to estradiol occurs at level of messenger ribonucleic acid accumulation. *Endocrinology* 120:264-271.
3. Amorese, D. 1986. Non radioactive detection of RNA using the Blu Gene System. *Focus* 8:6-7.
4. Auricchio, F.; A. Migliaccio; G. Castoria; A. Rotondi; M. Domenico and M. Pagano. 1986. Activation-inactivation of hormone binding sites of the 17-beta oestradiol is a multiregulated process. *J Steroid Biochem* 24:39-43.
5. Ben, J. 1985. Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev.* 6:564-589.
6. Birnboim, H.C. and J. Doly. 1979. A rapid alkaline method extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1513.
7. Blank, S., Saunders, S.J., Marks, I.N., Novis, B.H. and Barbezat, G.O. 1980. Gastrointestinal and Hepatic Diseases. In *Principles and practice of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, edited by Avery, G. S. ADISS Press, Sidney and New York.
8. Bonner, W., 1987. General Methods for Isolation and Characterizing Nucleic Acids Autorradiograms: <sup>32</sup>P and <sup>33</sup>P. In *Methods in Enzymology: Guide to Molecular Cloning Techniques*, edited by Shelby, L., Berger., and Kimmel, R. Avademic Press Inc., London.
9. Bridges, A. J., and A.K. Ho. 1988. Calmodulin content in human prolactin secreting pituitary adenoma: an inverse relationship to serum prolactin levels. *Neurosci Lett* 90:224-228.
10. Chomeczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single step method of isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159.
11. Delbeke, D.; J. Scammell; A. Martínez-Campos and P. Dannies. 1986. Dopamine inhibits prolactin release when cyclic adenosine 3' 5'monophosphate are elevated. *Endocrinology* 118:1271-1277.
12. Duffy, B.; J-D. Vicent; H. Fleury; P. Pasquier; Gourdy and A.T. Vidal. 1979. Membrane effects of TRH and estrogen shown by intracelular recodin ,from pituitary cells. *Scince* 204:509-511.
13. Feinberg, A. 1983. A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to hight specific activity. *Anal Biochem* 132:6-13.

14. Guiguere, V., H. Meunier; R. Veilleux and F. Labrie. 1982. Direct effects of sex steroids on prolactin release at pituitary level. Interactions with dopamine, Thyrotropin releasing hormone and Isobutylmethylxanthine. *Endocrinology* 111:857-862.
15. Goodman, L., and Gilman, A. 1975. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Ed. 5 McMillan Publishing Co., New York.
16. Gubbins, E.; R. Maurer; M. Lagrim; R. Erwins and J. Donelson. 1980. Structure of the rat prolactin gene. *J Biol Chem* 255:8655-8662.
17. Hait, W.N., and W.T. DeRosa. 1988. Calmodulin as a target for new chemotherapeutic strategies. *Cancer Invest* 6:499-511.
18. Hidaka, H., Y. Sasaki; T. Tanaka; T. Endo; S. Ohno; Y. Fuji and T. Nagata. 1981. N-(6-aminohexyl)-5-chloro-1-naphthalenesulfonamide, a calcium antagonist inhibits cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 78:4354-4357.
19. Hollister, L.R. 1978. *Psychiatric Disorders*. In: *Clinical Pharmacology*. Basic principles in therapeutics, edited by Melmon, K.L. and Morelli, F.M. McMillan Publishing Co. Inc., New York.
20. Imura, H. 1985. *The pituitary gland*. Raven Press, New York.
21. Jones, E.F. 1989. Hyperprolactinemia and female infertility. *J Reprod Med* 34:117-126.
22. Judd, S.L.; L. Lazarus and G. Smythe. 1976. Prolactin secretion by metoclopramide in man. *J Clin Endocrinol Metab* 43:313-317.
23. Kato, Y. 1985. Regulation of prolactin secretion. In: *The pituitary gland*, edited by Imura, I. Raven Press, New York.
24. Kauppila, A.; P. Chatelain; S. Kirkinens and A. Rvokonen. 1977. Isolated of prolactin deficiency in a woman with puerperal alactogenesis. *J Clin Endocrinol Metab* 64:309-312.
25. Kawashima, M.; M. Kamiyoshi and K. Tanaka. 1987. Presence of estrogen receptors in the hen hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 120:582-588.
26. Lam, H.P. 1984. Tamoxifen is a calmodulin antagonist in the activation of cAMP phosphodiesterase. *Biochem Biophys Res Commun* 118:27-32.
27. Lamberts, S.; T. Verleum; L. Hofland and R. Oosterom. 1986. Differences in the interaction between dopamine and estradiol of prolactin release by cultured normal and tumorous human pituitary cells. *J Clin Endocrinol Metab* 63: 1342-1347.
28. Lenin, B. 1985. *Gennes*. Ed. 2. John Wiley & Sons, New York.
29. Leong, D.; L. Frawley and J. Neil. 1983. Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Annu Rev Physiol*

- 48:127-133.
30. Maniatis, T., T. Fritsch, E. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor, USA.
  31. Martínez de la Escalera, S.; J. Guthrie and R. Weiner. 1988. Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP: Stimulation via Ca/protein kinase C pathway. *Neuroendocrinology* 47: 38-45.
  32. Martínez-Campos, A.; J.F. Amara and P.S. Dannies. 1986. Antiestrogens are partial estrogen agonists for prolactin production in primary pituitary cultures. *Mol Cell Endocrinol* 48: 127-133.
  33. Martínez-Campos, A.; Moctezuma, O. and Larrea, F. 1984. Interaction of estrogens with dopamine and calcium in the regulation of PRL release. *In vivo*. In: Prolactin secretion: A multidisciplinary approach, edited by Mena, F. and Valverde, R-C. Academic Press, Florida.
  34. Maurer, R. 1980. Dopaminergic inhibition of prolactin synthesis and prolactin messenger RNA accumulation in cultured pituitary cells. *J Biol Chem* 255:8092-8097.
  35. Maurer, R. 1981. Transcriptional regulation of the prolactin gene by ergocryptine and cyclic AMP. *Nature* 294:94-97.
  36. Maurer, R. 1982. Estradiol regulates the transcription of the prolactin gene. *J Biol Chem* 257:2133-2136.
  37. McNelly, A.P., M. Howie; A. Houston; A. Cook and Y Boyle. 1982. Fertility after childbirth. Adequacy of postpartum luteal phases. *Clin Endocrinol* 17:609-615.
  38. Means, R. 1988. Molecular Mechanisms of action of calmodulin. *Recent Progress in Hormone Research* 44:-223-262.
  39. Merrit, E. and Tomlinson. 1983. The possible role of calmodulin in the inhibition of prolactin secretion by dopaminergic antagonists. *Life Sci* 33:889-893.
  40. Migliaccio, A.; A. Rotondi and F. Auricchio. 1984. Calmodulin-stimulated phosphorylation of 17-beta estradiol receptor on tyrosine. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:5921-5925.
  41. Miller, K. 1987. Gel electrophoresis of RNA. *Focus* 9:14.
  42. Nogami, H. 1985. Estrogen induced prolactin mRNA accumulation in adult male rat pituitary as revealed by *in situ* hybridization. *Endocrinol Jpn* :625-634.
  43. Owenbach, D.; W. Rutter; N. Cooke; J. Martial and T. Shows. 1981. The prolactin is located in chromosome 6 in human. *Science* 212:815-816.
  44. Pierre, M.M.; Y. Berthois and E.V. Jensen. 1988. Binding of antiestrogens exposes an occult antigenic determinant in the human estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:2533-2537.
  45. Rao, M.C., H.C. Palfrey; N. Nash; A. Greisman; P.G.

- Jayatilak and G. Gibory. 1987. Effects of estradiol on calcium protein phosphorylation in the rat corpus luteum. *Endocrinology* 120:1010-1018.
46. Rasmussen, H. and H. Barret. 1984. Calcium messenger system and integrated view. *Physiol Rev* 64:938-984.
  47. Rig, L. A. Lein and S. Yen. 1977. Patern of increase in circulating prolactin levels during human gestation. *Am J Obstet Gynecol* 129:454-455.
  48. Robyn, C. 1983. Endocrinological aspects of breast physiology. In: *Endocrinology of cystic breast disease*, edited by Angeli, A., A., Bradlow, H. and Dogliotti. Raven Press, New York.
  49. Rosen, J.M.; S.L. Woo; J.V. Holder; A.R. Means and B.W. O'Mally. 1975. Preparation and preliminary characterization of purified ovoalbumin messenger RNA from the hen oviduct. *Biochemistry* 14:59-78.
  50. Shull, J.D. and J. Gorski. 1986. The hormonal regulation of prolactin gene expression an examination of mechanisms controlling prolactin synthesis and the possible relationship of estrogen to these mechanisms. *Vitam Horm* 43:197-249.
  51. Simmen, R.; B. Dunbar; V. Guerrero; J. Chafouleas; J. Clark and A. Means. 1984. Estrogen stimulates the transient association of calmodulin and myosin light chain kinase with the chicken nuclear matrix. *J Cell Biol* 99:588-593.
  52. Sletholt, K.; E. Havg; J. Gordeladze and K. Gautvik. 1987a. Effects of calmodulin antagonists on hormone release and cyclic AMP levels in GH<sub>3</sub> pituitary cells. *Acta Physiol Scand* 130:333-343.
  53. Sletholt, K. J. Gordelatze; E. Hervg and K. Gautvik. 1987b. Effects of trifluoperazine on prolactin release and cyclic AMP formation and degradation in GH<sub>3</sub> Ci pituitary cells. *Acta Endocrinol* 116:27-35.
  54. Tanaka, T.; 1988. Calmodulin-dependent calcium signal transduction. *Jpn J Pharmacol* 46:101-107.
  55. Thomas, P. 1980. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transfered to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77:5201-5205.
  56. Vogel, H. T. Andersson; W. Braunlin; T. Drakenberg and S. Forsen. 1984. Trifluoperazine binding to calmodulin a shift reagent <sup>43</sup>Ca NMR study. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1350-1356.
  57. Whalh, G.M.; M. Stern and G.R. Stark. 1976. Efficient transfer of large DNA fragments from agarose to diazobenzoyloximetyl paper and rapid hybridization by using dextran sulfate. *Proc Natl Acad Sci USA* 76:3683.
  58. White, B. 1985. Evidence for a role of calmodulin in the regulation of prolactin gene expression. *J Biol Chem* 290:1213-1217.
  59. White, B. and C. Bancroft. 1987. Ca/calmodulin regulation of prolactin gene expression. *Methods Enzymol*

- 139:655-667.
60. Yamamoto, K. 1985. Steroid receptor regulated transcription of specific genes and gene networks. *Annu Rev Genet* 19:209-252.
  61. Zar, J. 1974. *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, Inc., New Jersey.

## APENDICE i

### PREPARACION DE REACTIVOS Y SOLUCIONES

#### 1. Tratamiento de las ratas

##### 1.1. Aceite vegetal

##### 1.2. 17- $\beta$ estradiol.

Solución madre: 5 mg/ml. Se disolvieron 5 mg de 17  $\beta$ -estradiol en 10 ml de etanol al 96 %, se alicuotaron en tubos Eppendorf y se almacenaron a 4° C.

Solución de trabajo. 0.13 mg/ml. Se tomaron 1.3 ml de la solución madre y se aforaron a 50 ml con aceite vegetal.

##### 1.3. Trifluoperazina. Para las diferentes dosis de TFP se emplearon los preparados comerciales de Stelazine (Lab Smith Klein and French) de ampolletas de 1 ml a 1 mg/ml y de ámpulas de 10 ml de 2 mg/ml. A partir de las ampolletas de 1 ml se preparó la dilución de 0.028 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ y del vial de 10 ml las diluciones de 0.016, 0.032, 0.048 y 0.128 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ . El diluyente fué solución salina, las diluciones se realizaron al momento de iniciar el tratamiento de los animales y se guardaron en frascos oscuros a 4°C.

##### 1.4. W. Se disolvieron 10 mg de W en 6 ml de etanol y se aforó con solución salina a 100 ml. De esta solución se prepararon las diluciones de 0.0125, 0.025, 0.037, 0.05 y 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ utilizando como diluyente solución salina.

##### 1.5. Metoclopramida. Del preparado comercial de metoclopramida de 5 mg/ml (Lab Lepetit de México) se preparó la dilución de 0.13 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ con solución salina. La dilución se realizó al momento de iniciar el tratamiento con los animales y se guardó en frasco oscuro a temperatura ambiente.

#### 2. Obtención de las adenohipófisis.

##### 2.1. SSC 1X pH 7.0 tratada con DEP. NaCl 0.87% y citrato de sodio 0.44 %.

#### 3. Extracción de RNA.

En la extracción de RNA total todo el material de vidrio se horneó por 4 horas a 250 °C. El H<sub>2</sub>O y todas las soluciones a excepción de las que contenían tris se trataron con DEP al 0.1%. El émbolo del homogenizador tipo Potter se esterilizó en autoclave a 15 lb/pul<sup>2</sup>. Siempre se emplearon tubos Eppendorf y puntillas nuevas autoclaveadas.

- 3.1. Solución D. Contiene: Isotiocianato de guanidina 4M, citrato de sodio 0.25 mM pH 7, sarkosyl 0.5 % y  $\beta$ -mercapto-etanol al 0.72 %.
- 3.2. H<sub>2</sub>O-DEP. A 1000 ml de agua bidestilada estéril se le agregaron 1 ml de DEP, se incubó toda la noche y se inactivó el DEP en autoclave a 15 lb/pug<sup>2</sup> por 15 minutos.
- 3.3. Acetato de sodio 2 M tratado con DEP.
- 3.4. Sevag. Se disolvieron 49 ml de cloroformo y 1 ml de alcohol isoamílico.
- 3.5. Etanol absoluto.
- 3.6. Etanol al 75 %, diluido con agua-DEP
- 3.6. LiCl 4 M. tratado con DEP.
- 3.7. Buffer de solubilización. Consistió de SDS 0.1 %, EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM.
- 3.8. SDS al 1%.
- 3.9. Tris-HCl 0.5M pH 7.

#### 4. Electroforesis de agarosa-urea-ácido.

- 4.1. Urea 10 M: Se disolvieron 300 g de urea en un volumen final de 500 ml de H<sub>2</sub>O-DEP, se trataron por 30 minutos con carbón activado y se pasó por un filtro Whatman No. 2.
- 4.2. Citrato de sodio 0.25 mM pH 7.0. Se disolvieron 48.03 g de ácido cítrico, 6 g de NaOH en 1 l de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril. El pH se ajustó con NaOH 10 N.
- 4.3. Bromuro de etidio a 1  $\mu$ g/ml en tris-HCl. Se diluyeron 20  $\mu$ l de bromuro de etidio (10 mg/ml) en 200 ml de tris-HCl 50 mM pH 7.6.
- 4.4. Azul de bromofenol al 0.05 %: Contuvo 0.05 g de azul de bromofenol, 30 ml de glicerol y H<sub>2</sub>O-DEP cbp 100 ml.
- 4.5. Buffer de corrida: Citrato de sodio 0.025 mM pH 7.0. Se preparó a partir de buffer de citrato 0.25 M pH 7.

#### 5. Fijación de RNA en mancha a filtro de nitrocelulosa.

- 5.1. H<sub>2</sub>O-DEP.
- 5.2. SSC 20 X pH 7.0 tratado con DEP. Contuvo NaCl 17.53 %, citrato de sodio 8.82 % en H<sub>2</sub>O bidestilada. Se trató con DEP.

#### 6. Electroforesis en gel de formamida-formaldehido.

- 6.1. Buffer de fosfato de sodio 10 X: Contuvo Na<sub>2</sub>HPQ 0.18 M. y NaH<sub>2</sub>PQ 0.002 M.
- 6.2. Formaldehido 4.4 M y buffer de fosfatos 2 X. Se preparó mezclando 35.73 ml de formaldehido al 37 % (12.3 M), 20 ml de buffer de fosfatos 10 X y 44.27 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada estéril.
- 6.3. Colorante: Contiene azul de bromofenol 0.4 %, xilene-cianol 0.4 %, glicerol al 50 % y EDTA 1 mM.
- 6.4. Buffer de corrida. Formaldehido 2.2 M en amortiguador de fosfatos 1 X. Se disolvieron 268 ml de formaldehido al 37 %,



- 150 ml de buffer de fosfatos 10 X y 1081 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada esteril.
- 6.5. Acetato de amonio 0.1 M. Se diluyeron 33.3 ml de acetato de amonio 3 M con 96.6 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada esteril.
- 6.6. Solución de bromuro de etidio. Consistió de bromuro de etidio 0.5 µg/ml, acetato de amonio 0.1 M y β-mercaptoetanol 0.01 M diluidos en agua bidestilada esteril.
- Ejemplo:
- |                                      |       |    |
|--------------------------------------|-------|----|
| bromuro de etidio                    | 15    | µl |
| acetato de amonio 3 M                | .10   | ml |
| β-mercaptoetanol 14.4 M              | 22.5  | µl |
| H <sub>2</sub> O bidestilada esteril | 289.7 | ml |
- 6.7. Solución de acetato de amonio 0.1 M y β-mercaptoetanol al 0.01M diluidos en agua bidestilada esteril.
- |                                      |       |    |
|--------------------------------------|-------|----|
| Acetato de amonio.3 M                | 10.0  | ml |
| β-mercaptoetanol 14.4 M              | 22.5  | µl |
| H <sub>2</sub> O bidestilada esteril | 289.7 | µl |
7. Electroforesis en gel de agarosa-glioxal.
- 7.1. Fosfato de sodio 1 M pH 7.0. Se disolvieron 39 ml de Na<sub>2</sub>HPQ 1 M y 61 ml de NaH<sub>2</sub>PQ 1M.
- 7.2. Glioxal deionizado. En jeringas de 3 ml se empacaron columnas de 2 cm de longitud con la resina Biorad AG-501 X 8 (D). A través de ellas se pasó en forma consecutiva glioxal al 40 % y se recolectó la elución en tubos Eppendorf. Las alícuotas se almacenaron a -20 °C.
- 7.3. Glioxal/DMSO. Se disolvieron 125 µl de DMSO, 42 µl de glioxal deionizado al 40 %, 3 µl de buffer de fosfatos de sodio 1 M pH 7.0.
- 7.4. Colorante. Se disolvieron 5 mg de azul de bromofenol, 5 mg de xilene cianol, 10 µl de buffer de fosfato de sodio 1 M pH 7.0 y 900 µl de H<sub>2</sub>O-DEP.
- 7.5. Buffer de electroforesis: Consistió de amortiguador de fosfato de sodio 0.01 M pH 7.0. el cual se preparó a partir del buffer de fosfato 1 M pH 7 y diluyéndolo con H<sub>2</sub>O bidestilada esteril.
- 7.6. Bromuro de etidio a una concentración de 5 µg/ml en H<sub>2</sub>O bidestilada.
8. Transferencia tipo Northern.
- 8.1. H<sub>2</sub>O bidestilada esteril
- 8.2. SSC 20 X pH 7.0. Consistió de NaCl 17.53 %, citrato de sodio 8.82% disueltos en H<sub>2</sub>O bidestilada esteril. Se esterilizó en autoclave.
9. Cortes con enzimas de restricción.
- 9.1. H<sub>2</sub>O ultrapura. Sistema de filtración MiliQ (Millipore).
- 9.2. TAE 1 X. Contiene tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.002 M. Se preparó a partir de TAE 50 X.

- 9.3. TAE 50 X. Se disolvieron 242 g de Tris-base, 57.1 ml de ácido acético glacial y 100 ml de EDTA 0.5 M pH 8.
- 9.4. Azul de bromofenol tipo III 6X. Contuvo azul de bromofenol al 0.25 %, xilene cianol al 0.25 %, glicerol 30 %, SDS al 0.6 % y EDTA 60 mM. en H<sub>2</sub>O-DEP.
- 9.5. EDTA 0.5 M pH 8. Se mezclaron 186.1 g de EDTA en 800 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada. El pH se ajustó con aproximadamente 20 g de NaOH (al ajustarse el pH se disolvió el EDTA). Se aforó con H<sub>2</sub>O bidestilada a 100 ml y se esterilizó en autoclave.
- 9.6. Bromuro de etidio. Consistió de una solución de 0.5 µg/µl en TAE 1X.

## 10. Transformación bacteriana.

- 10.1 Caldo Luria Bertoni (L-B). Contuvo bactotripton a al 1%, extracto de levadura al 0.5 %, NaCl al 1 %. Ajustado a pH 7.0 con NaOH 10 N y esterilizado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos. Se preparó disolviendo 10 g de bactotripton, 5 g de extracto de levadura y 10 g de NaCl.
- 10.2 Agar L-B. Contuvo lo mismo que el caldo más agar-agar al 1.5 %.
- 10.3 Agar y caldo L-B con tetraciclina. Después de esterilizar el medio se dejó enfriar aproximadamente a 50°C para posteriormente añadir tetraciclina a una concentración final de 15 µg/µl. Las cajas se almacenaron en oscuridad.
- 10.4 Solución madre de tetraciclina. Se disolvieron 12.5 mg de hidrocloreto de tetraciclina en una solución de metanol/H<sub>2</sub>O (50% v/v). La solución se esterilizó por filtración y se almacenó en oscuridad a -20 °C. Se debe utilizar en medios sin Mg<sup>2+</sup> tal como el L-B.

## 11. Técnica de obtención de DNA plasmídico a pequeña escala.

- 11.1 Solución I. Contuvo lisozima 2 mg/ml, glucosa 50 mM, EDTA 10 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8. Se preparó inmediatamente antes de usarse y se conservó a 0°C.
- 11.2 Solución II. Solución alcalina. Contiene SDS al 1% y NaOH 0.2 N. Se almacenó a temperatura ambiente. La solución es estable por una semana.
- 11.3 Solución III. Solución de alta concentración de sales. Contiene acetato de potasio 3 M, ácido acético 2 M.
- 11.4 Solución de acetato de sodio 0.1 M y tris HCl 50 mM pH 8.
- 11.5 Etanol al 96 %.
- 11.6 Etanol al 70 %.
- 11.7 RNAasa libre de DNAasa: Consistió de RNAasa pancreática de 10 mg/ml en tris-HCl 10 mM pH 7.5 y NaCl 15 mM. Antes de su uso la solución se calentó a ebullición en baño de agua por 15 minutos, se dejó enfriar lentamente a temperatura ambiente, se alicuotó y se almacenó a -20°C.
- 11.8 Fenol-saturado. Al fenol bidestilado se le agregó 8-hidroxiquinoleína a una concentración final de 0.1% (da un color amarillo a la solución). Se saturó varias veces con tris-HCl

0.1 M pH 8 y  $\beta$ -mercaptoetanol hasta que el pH de la fase acuosa fué mayor de 7.5. La solución es estable hasta 1 mes a 4°C.

12. Técnica para obtener DNA plasmidico a gran escala.
  - 12.1 Tris-HCl 1 M pH 8.
  - 12.2 EDTA 0.5 M pH 8. El pH se ajustó con NaOH 10 N.
  - 12.3 NaCl 5 M esterilizado a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.
  - 12.4 Acetato de sodio 0.3 M pH 5.2. Se disolvió la sal en H<sub>2</sub>O bidestilada y se ajustó el pH con ácido acetico glacial. La solución se esterilizó a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos
  - 12.5 SDS al 10%.
  - 12.6 Bromuro de etidio 10 mg/ml. Se diluyó 1 g de bromuro de etidio en 100 ml de agua bidestilada. solución se almacenó en un frasco oscuro.
  - 12.7 Amortiguador TE. Contuvo tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 1 mM pH 8. Se preparó diluyendo 10 ml de HCl 1 M y 2 ml de EDTA 0.5 M.
  - 12.8 Solución salina M9 10 X. Se disolvieron en el siguiente orden: 70 g de Na<sub>2</sub>PQ 70g, 30 g de KH<sub>2</sub>PQ, 5 g de NaCl, 10 g de NH<sub>4</sub>Cl y H<sub>2</sub>O destilada cbp 1000 ml. La solución se esterilizó a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.
  - 12.9 CaCl<sub>2</sub> 0.01 M. esteril.
  - 12.10 MgSO<sub>4</sub> 0.1 M esteril.
  - 12.11 Glucosa al 20 %. La solución se esterilizó por filtración o en autoclave. Se almacenó a 4°C.
  - 12.12 Casaaminoácidos al 20 %. Se preparó H<sub>2</sub>O destilada y se esterilizó en autoclave.
  - 12.13 Vitamina B<sub>1</sub> (Tiamina) 2 mg/ml. La solución se esterilizó por filtración y se almacenó a 4°C.
  - 12.14 Medio M9. Consistió de 840 ml de H<sub>2</sub>O bidestilada y 100 ml de solución salina M9-10X. La solución se esterilizó en autoclave y posteriormente se le agregó:  
10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.01 M, 10 ml de MgSQ 0.1 M, 20 ml de glucosa al 20 %, 20 ml de casaaminoácidos 20 % y 0.2 ml de tiamina 2 mg/ml.
  - 12.15 Solución de sacarosa al 25 %. La solución se almacenó por filtración y se almacenó a 4°C.
  - 12.16 Solución de lisozima (2 mg/ml). Se disolvieron 2 mg de lizocima por ml de sacarosa al 25% en tris-HCl 50 mM pH 8.
13. Marcaje radiactivo.
  - 13.1 Sephadex G-50. Aproximadamente a 3 g de Sephadex G-50 (medium) se le adicionó TE (tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8) y se dejó en reposo toda la noche a temperatura ambiente.
  - 13.2 Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM pH 8. Se preparó a partir de TE 1 M y EDTA 0.5 M
  - 13.3 Fibra de vidrio tratada con silicón, lavada con agua bidestilada y esterilizada a 15 lb/pulg<sup>2</sup> por 15 minutos.

- 13.4 TCA 50 %. Al frasco original con 500 g se le agregó directamente 454 ml de agua bidestilada. La solución se aforó a 614 ml y se almacenó a 4°C.
- 13.5 TCA 10 %. Se preparó a partir de la solución de TCA al 50 % diluyéndola con H<sub>2</sub>O bidestilada.
- 13.6 Líquido de centelleo: Se disolvieron 5 g de PPO. 0.3 g POPPOP g en 1 l de tolueno.

#### 14. Reactivos para hibridación y prehibridación.

- 14.1 Formamida deionizada. A un litro de formamida se le agregó 40 g de amberlita MB-1. La mezcla se dejó agitando toda la noche a 4°C, posteriormente se filtró en papel Whatman 3 MM y se almacenó a -20°C.
- 14.2 SSC 20 X pH 7.0 estéril. (Sección 8.2)
- 14.3 Denharts. Contuvo 1g de Ficoll, 1g de PVP, 1g BSA y H<sub>2</sub>O deionizada cbp 100 ml. La solución se esterilizó por filtración o esterilización y se almacenó a -20°C.
- 14.4 SDS al 10 %.
- 14.5 Fosfato de sodio 1 M pH 8.
- 14.6 Dextrán sulfato.

Los anteriores reactivos se mezclaron de la siguiente manera para preparar las soluciones de:

PREHIBRIDACION: 5 ml de Formamida, 2.5 ml de SSC 20 X, 0.5 ml de Denharts 100 X, 100 µl de SDS, 0.5 ml de fosfato de sodio 1 M pH 8 y 1.4 ml de agua destilada esteril.

HIBRIDACION: 4 ml de formamida, 2 ml de SSC 20 X, 0.4 ml de Denharts 100 X, 0.4 ml fosfato de sodio 1 M pH 8, 80 µl de SDS al 10%, 2ml de dextransulfato, H<sub>2</sub>O bidestilada 1.12 ml y un mínimo de 15 a 20 millones de cpm del rastrador molecular.

#### 15. Lavados

- 15.1 SSC 2X. SDS 0.1%. Se preparó a partir de las soluciones de SSC 20 X y SDS 10 %. diluyéndolas con H<sub>2</sub>O bidestilada esteril.
- 15.2 SSC 0.1 X. SDS 0.1%. Se preparó a partir de las soluciones de SSC 20 X y SDS al 10 % diluyéndolas con H<sub>2</sub>O bidestilada esteril.

APENDICE ii

MAPA DE RESTRICCIÓN DE pPr1-1

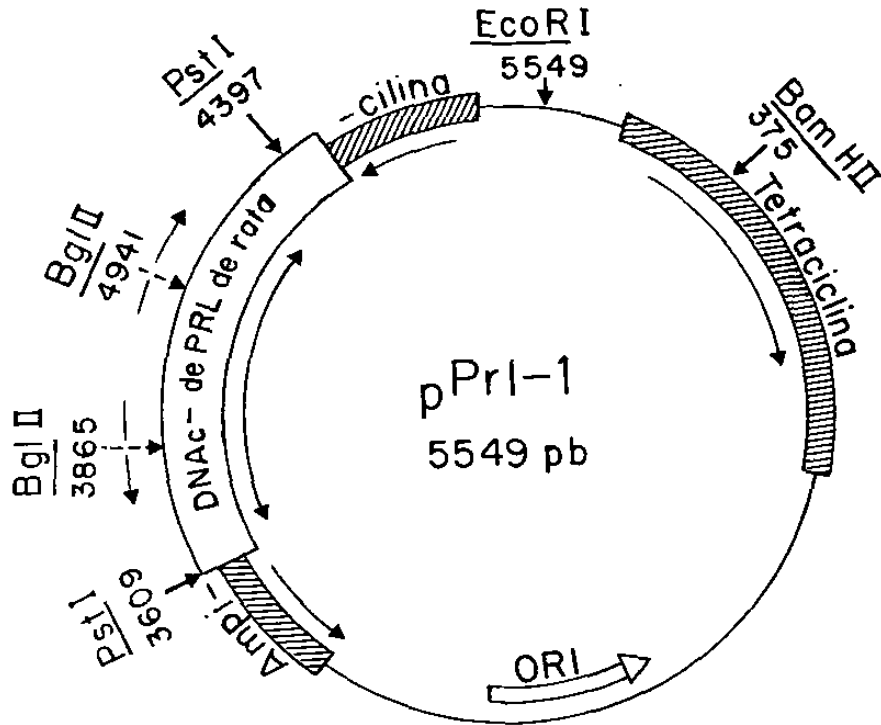


Figura 17. Mapa de restricción de pPr1-1. Se muestra en la figura de pPr1-1 el lugar de corte de las enzimas que se emplearon para su caracterización. Este plásmido está compuesto de pBR322 y el DNAc de la PRL de rata. El lugar de corte de Bgl II se marcó con línea punteada ya que no se determinó la dirección del inserto.

I. ENZIMAS QUE NO CORTAN A pPrl-1.

AsuII	BclIII	BsshII
BstEII	HpaI	KpnI
MluI	NcoI	NotI
NsiI	SfiI	SmaI
SnaBI	SstI	SstII
XbaI	XhoI	XmaI

II. ENZIMAS QUE CORTAN 1 VEZ A pPRL-1\*.

a) Acción sobre pBR-322

AatII (4286)	AvaI (1425)	BamHI (375)
EcoRI (4361)	EcoRV (185)	HindIII (29)
NruI (972)	PstI (3609)	PvuI (3735)
PvuII (2066)	Sall (651)	ScaI (3846)
SphI (562)		

b) Acción en el inserto.

BstXI (593)	StuI (507)	XhoII (532).
-------------	------------	--------------

III. ENZIMAS QUE CORTAN AL DNAC DE PRL DE RATA\*.

a) Con acción única.

AccI (195)	BanI (606)	BglII (532)
Bsp1286 (364)	BstXI (593)	Fnu4HI (471)
HgiAI (366)	HhaI (625)	HinPI (624)
HincII (644)	HphI (5)	MstI (625)
NlaIV (618)	RsaI (718)	StuI (507)
XhoII (532)		

b) Con acción doble.

BstNI (368, 502)	EcoRII (368, 504)
FokI (168, 545)	HaeIII (256, 507)
NciI (38, 144)	SfaNI (416, 657)

c) Con acción triple.

DpnI (388, 534)  
HpaII (38, 144, 327)  
MboI (336, 346)  
Sau3

\*.- se indica en paréntesis el lugar de acción, correspondiendo el cero al sitio de corte de EcoRI.



