

11282
5
2y.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE MEDICINA**

**FORMAS MOLECULARES DE HORMONAS HIPOFISARIAS
DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA**

**TESIS QUE PRESENTA
ARTURO ZARATE TREVIÑO
PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



**UNIDAD DE INVESTIGACION CLINICA EN
ENFERMEDADES ENDOCRINAS
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL**

1991

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

	Pág.
■ Síntesis	1
■ Consideraciones Generales	5
■ Prolactina	8
■ Hormona de Crecimiento	27
■ Gastrina	31
■ Conclusiones	43
■ Referencias	50
■ Agradecimiento	65

SINTESES

ANTECEDENTES. En términos generales se sabe que las hormonas de naturaleza proteica existen en varias isoformas moleculares que están provistas de diferentes características: a) fisicoquímicas, b) inmunológicas, c) actividad sobre el receptor celular, d) vida media en la circulación y, e) potencia biológica. Este conocimiento se ha ampliado al demostrar que el medio hormonal en un momento dado es capaz de modificar la síntesis y secreción de las variantes moleculares hormonales que después aparecen en la circulación. La mayor parte de estudios se ha realizado con hormonas adenohipofisarias y también se ha podido demostrar que un factor que determina las características de las isohormonas es su contenido de carbohidratos, en particular de ácido siálico, cuya incorporación en la molécula hormonal está a su vez determinada por el "mieleu" endocrino. De esta manera se establece un mecanismo de "feedback" de fina sintonización.

OBJETIVO DEL ESTUDIO E HIPOTESIS. Se pretende conocer la interrelación de la concentración de varias hormonas hipofisarias con el estado fisiológico hormonal en la mujer embarazada y durante la lactancia. Asimismo se busca conocer la interdependencia de la producción y secreción de hormonas adenohipofisarias durante el embarazo, parto y lactancia tanto en la madre como en su hijo. Se incluye

dentro de los objetivos el análisis de una hormona que se produce tanto en la hipófisis como en el tubo digestivo y que tiene relevancia durante la lactancia.

Los objetivos anteriores permiten formular la hipótesis que consiste en establecer si las hormonas adenohipofisarias y sus variantes moleculares guardan una relación interdependiente con el medio ambiente hormonal cambiante.

METODOLOGIA. En el estudio se incluyeron mujeres que voluntariamente aceptaron formar parte del análisis antes de un embarazo, durante el parto y en la lactancia. Asimismo, permitieron que se estudiaran los recién nacidos y los lactantes. La concentración de las hormonas en varios líquidos biológicos se determinó mediante el método de radioinmunoanálisis del tipo "doble anticuerpo" y para separar las variantes moleculares se utilizó como herramienta la cromatografía por gel utilizando una columna de vidrio. Para el análisis estadístico se aplicó la *t* de student para muestras pequeñas.

RESULTADOS. Se encontró que la secreción de las hormonas estudiadas (prolactina, hormona de crecimiento y gastrina) tiene cierta relación con la etapa gestacional y la lactancia. La concentración hormonal del recién nacido y del lactante también muestran una relación con el estudio fisiológico. La proporción de las formas moleculares, en

particular de la prolactina, varía con la etapa fisiológica y en cuanto a la producción de gastrina existe un alto nivel dinámico en el feto y en el recién nacido cuando se establece la lactancia.

CONCLUSIONES. El rápido cambio del medio hormonal que ocurre durante la gestación determina la cantidad y distribución de las formas moleculares de algunas hormonas adenohipofisarias. Como resultado de lo anterior es posible que se establezca una adaptación hormonal la cual a su vez permite que las hormonas ejerzan su acción biológica que condiciona los requerimientos fisiológicos. Las hormonas lactogénicas como son la prolactina y la hormona de crecimiento muestran una sintonía precisa y los datos de esta tesis confirman los resultados de experimentos previos por otros investigadores. En particular resaltan los datos sobre la glucosilación de la prolactina determinada por el efecto de los estrógenos y posiblemente de otras hormonas circulantes. En cuanto a la síntesis y secreción de gastrina por la madre y el recién nacido no existe una amplia información y por ello parece interesante que nuestros resultados, aunque preliminares, sugieren que esta hormona desempeña una función relevante tanto para la preparación como para el mantenimiento de la lactancia. Los recién nacidos tienen una concentración apreciable de gastrina, tal vez como resultado del estímulo constante que se establece por la deglución de líquido amniótico y más

adelante por la succión del pezón. Es indudable que se requiere ampliar los estudios sobre la respuesta a la alimentación y al desarrollo del tubo digestivo en el lactante. Por otra parte es necesario profundizar en la proporción de las formas moleculares de gastrina que se producen en el feto y en el recién nacido.

CONSIDERACIONES GENERALES

En un tiempo se dió por hecho que todas las hormonas tenían una estructura molecular fija e inmutable la cual les confería las propiedades tanto biológica como inmunológica (1-2). Gracias a esta supuesta propiedad las hormonas estaban poseídas de una alta especificidad y podían ser reconocidas sin cuestionamiento por el receptor celular (3-4). Estos conceptos básicos se han ido modificando paulatinamente hasta aceptarse que las hormonas ni son específicas ni uniformes en su acción. Es decir la hormona es politropa, polivalente y ubicua (5-9). Como si lo anterior fuera ya una extravagancia, además se ha podido demostrar que las hormonas de naturaleza proteica tienen una característica adicional: son heterogeneas desde el punto de vista molecular (10-12). Las hormonas proteicas y en particular las que pertenecen a la familia de las hormonas lactogénicas -hormona de crecimiento, prolactina y lactógeno placentario- son paradigma de la heterogeneidad molecular.

Gracias a los métodos analíticos de separación, como son la cromatografía y la electroforesis en sus variantes, se ha podido determinar que tales hormonas se presentan en varias formas, lo cual se basa en su peso molecular, y que cada una de ellas está provista de diferente actividad biológica; además su estructura se modifica con relación a las va-

riables condiciones fisiológicas (13-16). Se piensa que en cada hormona proteica existe una forma de mayor actividad biológica, la que en general está constituida por una cadena lineal de aminoácidos y es un monómero; a partir de esta estructura básica se pueden formar dímeros, agregados de complejos moleculares, y adicionalmente fragmentos de las mismas variantes (Tabla 1).

TABLA 1.- HORMONAS GLICOPROTEICAS

HETERODIMEROS
DOS CADENAS PEPTIDICAS
OLIGOSACARIDOS UNIDOS A CADENAS
HETEROGENEIDAD MOLECULAR
CARGA DEPENDE DE SEGMENTO SACARIDC

Además de lo anterior, se puede producir un proceso de glucosilación (Tabla 2) de la molécula lo cual confiere a la hormona un mayor peso molecular y una diferente característica biológica (17-18).

**TABLA 2.- EFECTO DE LOS CARBOHIDRATOS
 SOBRE LA HORMONA GLUCOPROTEICA**

ACTIVA LA SEÑAL DE TRASDUCCION
REGULA SU METABOLISMO CIRCULATORIO
ESTABILIZA LA ESTRUCTURA PROTEICA
DETERMINA UNION AL RECEPTOR
REGULA ACTIVIDAD BIOLOGICA

Este último fenómeno tiene relevancia porque en un tiempo se pensó que las hormonas lactogénicas, por definición, no

eran glucosiladas y que el proceso de glucosilación era exclusivo de otra familia de hormonas hipofisarias: las gonadotropinas y la tirotropina; así como de la hormona coriónica con actividad gonadotrópica pero producida por la placenta de manera predominante. La glucosilación es posible cuando existe una secuencia de aminoácidos ASN--LEV-SER y la cadena azucarada se anexa al aminoácido asparagina que posee una cadena lateral con un grupo hidroxilo (19). La glucosilación es un proceso postraduccional, aunque el mecanismo que lo regula es desconocido (19). Lo importante desde el punto de vista funcional es que la glucosilación resta actividad biológica a la hormona (Fig. 1).

VIAS DE LA SEÑAL CELULAR EN HORMONAS GLICOPROTEICAS

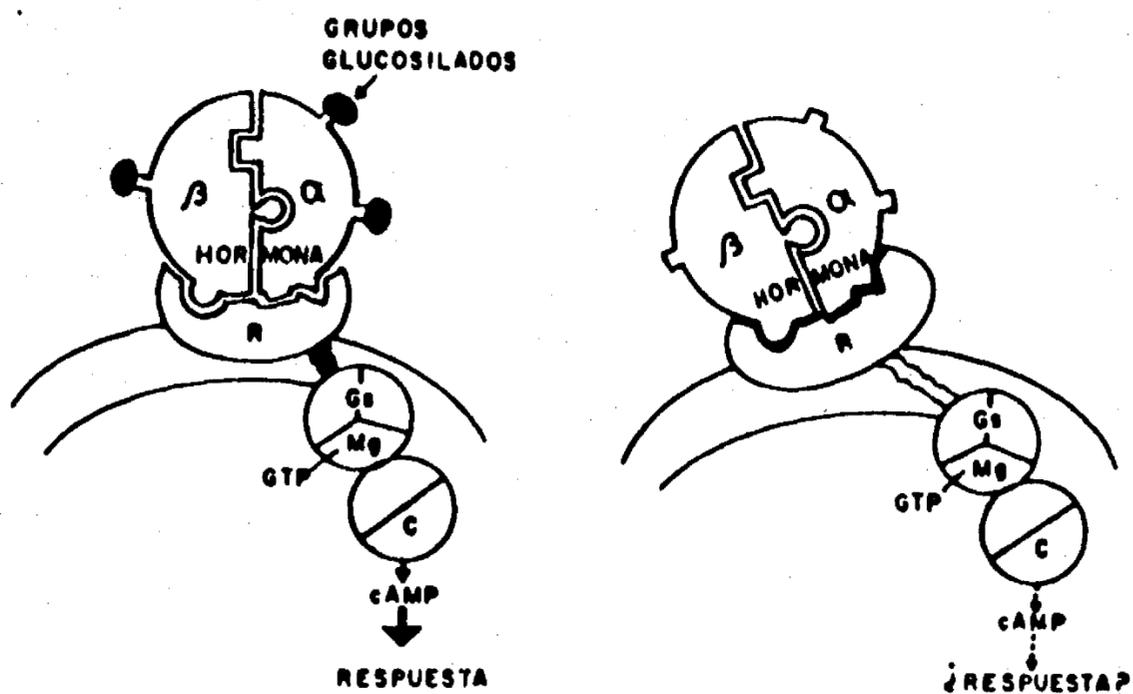


Fig. 1 Representación esquemática del mecanismo de transmisión de la señal bioquímica que se genera por una hormona glicoproteica (modificado de Sarlam, MR: FASEB 3:1915, 1989).

Con base en todos estos conceptos se ha concluido que la regulación en la formación de las múltiples variedades moleculares de una hormona es de fundamental trascendencia para la función de la hormona y que por consiguiente debe estar sujeta a un control endocrino de autoregulación (20-25). A su vez la regulación de las proporciones en que se encuentran circulando las formas moleculares de las hormonas por el medio interno puede contribuir al ajuste de la función hormonal por medio de la secreción de cada una de las variantes hormonales. Con base en los conocimientos anteriores y los estudios previos utilizados en el laboratorio de mi Unidad de Investigación (26-29) se decidió ampliar las investigaciones en tres hormonas de naturaleza polipeptídica. El modelo experimental seleccionado es el periodo embarazo-lactancia y su principal acompañante que es el recién nacido y más adelante el lactante.

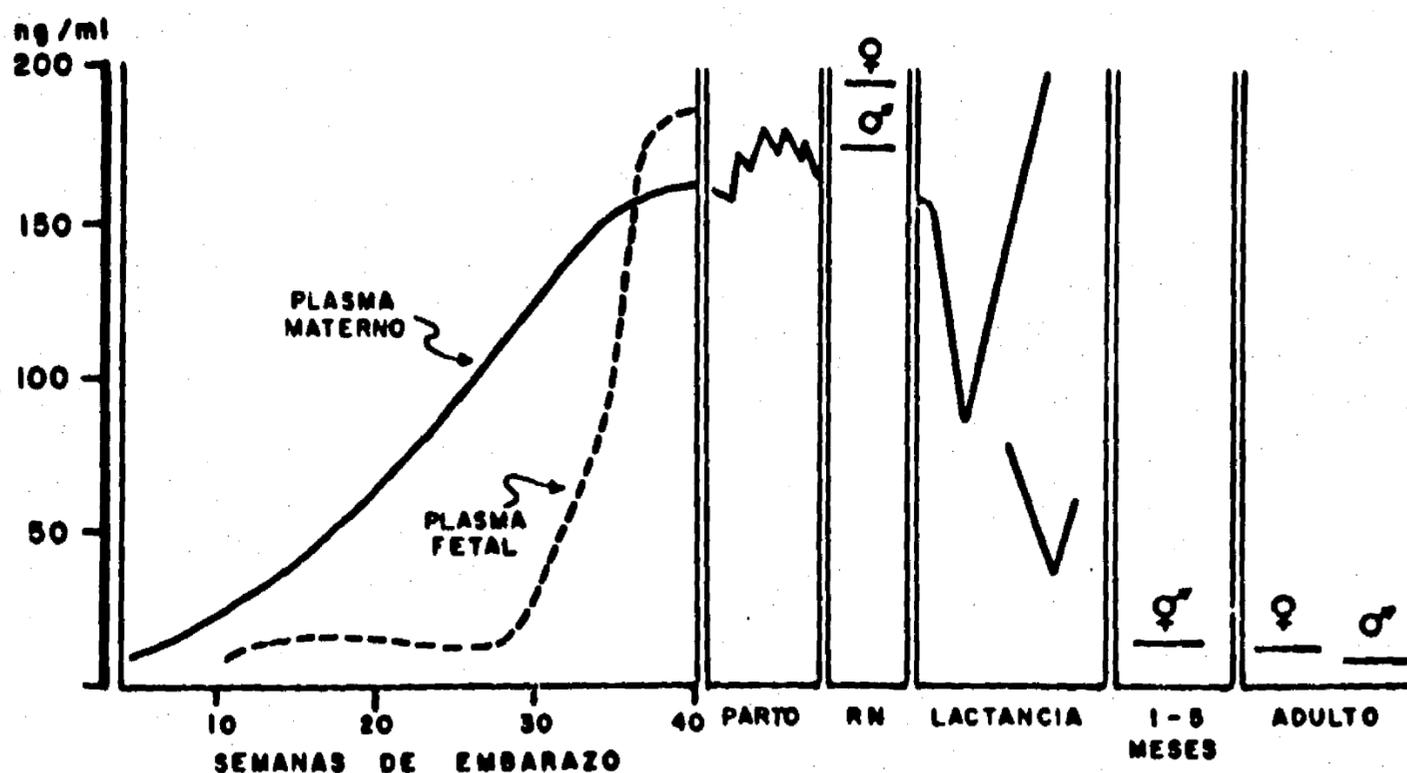
PROLACTINA

En 1932, en el laboratorio de Riddle se tenía como dogma que la hipófisis producía una hormona con propiedades lactogénicas -la prolactina- y que colateralmente esta misma hormona era capaz de inducir "crecimiento tisular" (30). Por otra parte en el laboratorio de Evans se pensaba que la hormona de crecimiento era el componente más

abundante del lóbulo anterior de la hipófisis y que además poseía propiedades lactogénicas (31). Estos conceptos antagónicos fueron motivo de acrimoniosas discusiones por varios años y ahora se sabe que ambos grupos de investigación tenían parcialmente razón. Todavía en 1971 el concepto más aceptado era que en el humano una sola hormona tenía a su cargo la responsabilidad de ambas funciones: la de crecimiento y la lactogénica. Cada vez que se intentaba aislar de la adenohipófisis un extracto hormonal provisto exclusivamente de actividad lactogénica, al final sólo se obtenía hormona de crecimiento y no había manera de aislar a la elusiva prolactina de Riddle. Sin embargo se contaba con varias observaciones que apoyaban la existencia de una hormona única con propiedades lactogénicas la cual era diferente a la hormona de crecimiento. A este respecto, existían informes clínicos de pacientes con el síndrome de amenorrea y copiosa galactorrea sin que se encontrara una elevación de la hormona de crecimiento en la circulación (32). Por otra parte, en algunos enanos con deficiencia de hormona de crecimiento se podía demostrar, mediante ensayos biológicos, la presencia de actividad mamotrópica y lactogénica (32-34). También se informaron casos de acromegalia con franca elevación en la circulación de la hormona de crecimiento, en quienes no se demostraba que se asociaba una actividad biológica de prolactina mediante ensayos que medían la actividad lactotópica en suero en el buche del

pichón que en ese tiempo se consideraba como el análisis más confiable (35). Finalmente, el grupo de Friesen en Canadá, logró estandarizar un método de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo utilizando prolactina obtenida del mono y anticuerpos contra prolactina obtenida de oveja que permitía la determinación precisa y exacta de la prolactina contenida en los líquidos biológicos (36). De esta manera, en el humano se demostró definitivamente la existencia de la prolactina y que esta hormona variaba en su concentración con relación a las condiciones fisiológicas (Fig. 2).

NIVELES DE PROLACTIN EN DIFERENTES ETAPAS DE LA VIDA



(Mod. de Boyer y Col.)

Fig. 2 De una manera esquemática se muestran las variaciones en la concentración de prolactina a lo largo de la vida (Zárate et al. Endocrinología Ginecológica y del Embarazo, La Prensa Médica Mex, 1982, pp 72).

Por fin, la prolactina adquirió su carta de naturalización y con ello se consiguió despejar y aclarar una serie inmensa de incógnitas en el área de la endocrinología. En los siguientes años se vino una catarata de publicaciones sobre la función de la prolactina en casi todas las especies zoológicas. Desde entonces se sabe que en el humano en particular la prolactina circula en pequeñas cantidades tanto en los individuos del sexo masculino como femenino pero que durante el embarazo (Fig. 3) la concentración aumenta 10 a 20 veces y que esta elevada producción se mantiene durante la lactancia (37-40).

SERUM PROLACTIN LEVELS DURING PREGNANCY AND LACTATION

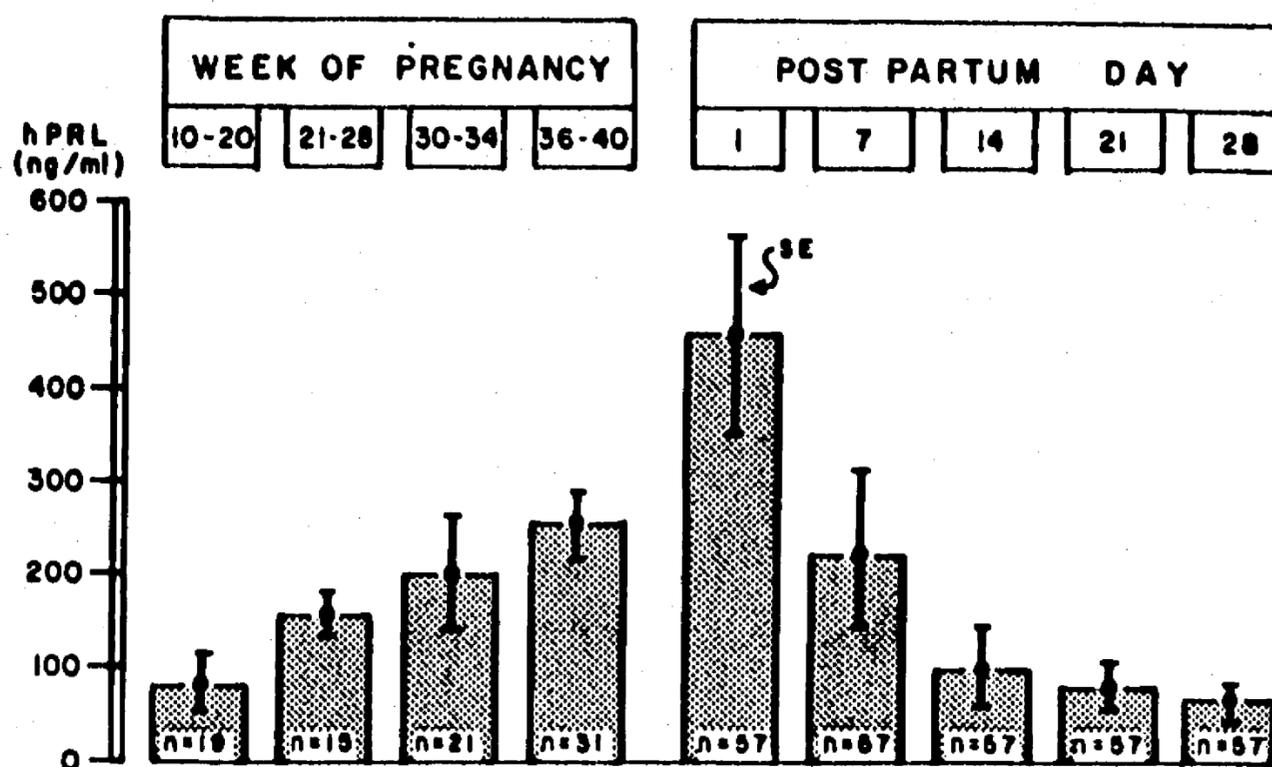


Fig. 3 Niveles de prolactina en la circulación materna que muestran una elevación conforme avanza la gestación y un descenso paulatino después del parto, aunque haya lactancia (Sorla et al. Ann D'Endocr 38:55, 1977).

El amamantamiento con la succión repetida del pezón es el estímulo más energético para la producción y secreción de prolactina y por consiguiente de leche (Fig.4) (41-43).

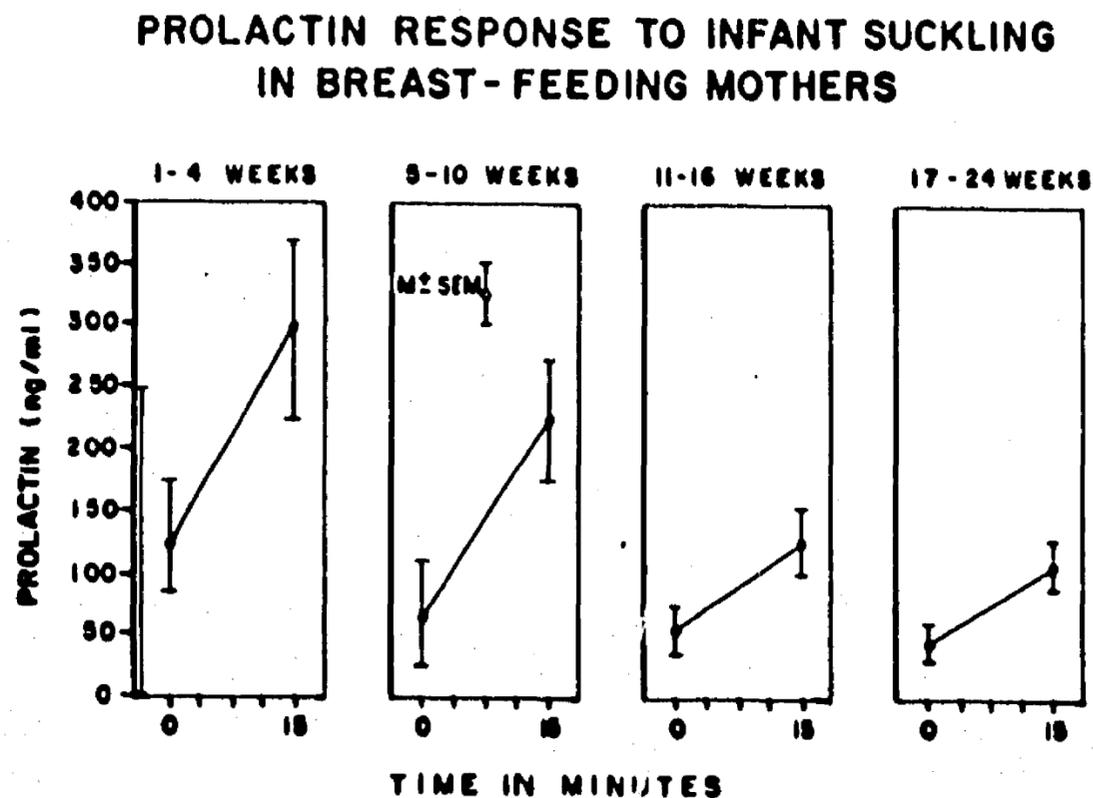


Fig. 4 Los niveles de prolactina (PRL) se midieron en la sangre de la madre, antes y después de 30 minutos de estar amamantando a su hijo. La secreción de PRL como respuesta a la succión del pezón va decreciendo progresivamente (Zárate et al. J Clin Endocrinol Metab 43:301, 1976).

Fuera del embarazo, una elevación en la concentración de prolactina produce, tanto en el hombre como en la mujer, cambios importantes en el área reproductiva la cual se puede expresar como trastorno menstrual, amenorrea, galactorrea, esterilidad e impotencia (44-46). A este respecto varios estudios demostraron que el tumor más frecuente de la hipófisis produce prolactina y consecuentemente se pudieron explicar una variedad de trastornos

clínicos y así mismo se encontraron drogas que inhibiendo la producción y la secreción de la prolactina se constituían en la base para los tratamientos farmacológicos de tales tumores y de los estados que cursaban con hiperprolactinemia (47-50). Por lo tanto, con la suma de todas estas observaciones se aclaró que la secreción de prolactina depende de un factor hipotalámico de tipo "inhibidor" que curiosamente es un neurotransmisor: "la dopamina" y que variaciones en la cantidad de esta pequeña molécula determinan la cantidad de prolactina que se produce por las células mamotrópicas de la adenohipófisis y que posteriormente se vierte a la circulación (51-52). Con este fundamento se buscaron agentes farmacológicos que tuvieran una actividad dopaminérgica y de esta manera se lograra manipular farmacológicamente la secreción de la prolactina. La tarea fue exitosa y así surgió una prolija familia de agentes "dopaminérgicos" los que después han servido como modelo para diseñar una gran variedad de estimuladores e inhibidores de la secreción de diferentes hormonas. Al mismo tiempo, la purificación de la prolactina permitió diseñar métodos de laboratorio para medirla con toda precisión en los líquidos biológicos lo cual ha tenido una repercusión seminal para entender varios procesos fisiológicos y de ayuda importante a la clínica endocrinológica. Paulatinamente se fueron acumulando observaciones que permitieron desentrañar una serie de enigmas tanto fisioló-

gicos como clínicos, en los cuales el nivel de prolactina circulante no era aparentemente congruente con los datos clínicos. Esto llama aún más la atención porque la determinación de prolactina por RIA es tan precisa que no cabe duda que la cifra obtenida en el laboratorio es confiable; pocas determinaciones hormonales traducen con tanta correlación la situación clínica (53-55). Así un nivel en la sangre por arriba de 20 ng/ml está señalando una anormalidad, excepto durante el embarazo y la lactancia, estados en que la hiperprolactinemia es fisiológica. Otras condiciones que pueden modificar la secreción de prolactina son el ejercicio, el sueño, la actividad sexual, la ingestión de alimentos, el estrés, la manipulación del pezón mamario y todas aquellas drogas que alteran la concentración de dopamina en la vecindad de la hipófisis como son los tranquilizantes, sulpirida, metoclopramida, etc. (56). Una observación adicional fue el hecho que podían encontrarse estados de hiperprolactinemia sin que se acompañaran de manifestaciones clínicas como sería la galactorrea y los trastornos menstruales, pero también se observó lo contrario, que se presentaban cuadros clínicos sin acompañarse de elevaciones de la prolactina en la circulación (57-60). Para congeniar estos hallazgos se propuso que la prolactina, al igual que lo que ya se había demostrado con la hormona de crecimiento, podía circular en varias formas moleculares, todas ellas detectadas por el

RIA, pero con distinta actividad biológica (Tabla 3) (57-62).

TABLA 3.- ISOHORMONAS DE PROLACTINA

FORMAS	PESO MOLECULAR
"BIG-BIG"	100
"BIG"	50
GLUCOSILADA	26
MONOMERO ("LITTLE")	22-23
MOLECULAS PEQUEÑAS	8-16

CIFRAS APROXIMADAS EN KILODALTONES

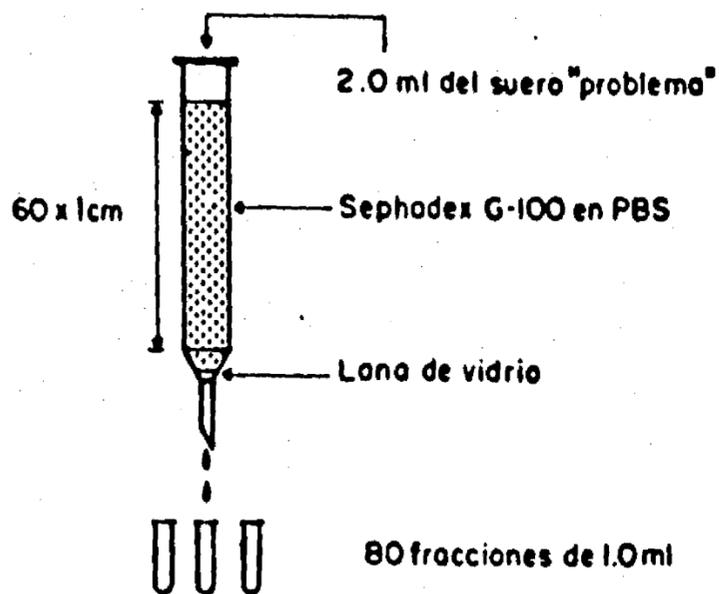
Mediante la utilización de métodos de cromatografía, filtración en gel, cromatografía por afinidad, electroforesis y electroenfoque se ha podido demostrar que efectivamente la prolactina (de aquí en adelante enunciada como PRL) se encuentra circulando y en la hipófisis misma en formas moleculares de diferente peso (59-62). Por otra parte mediante técnicas de bioensayos se pudo demostrar que la isohormona más activa es la molécula de 191 aminoácidos con un peso aproximado de 22KD la cual representa el 80% de la actividad biológica; además constituye el 60% de la PRL circulante. Se encontraron otras dos moléculas más grandes, de 50 y 100KD, que son dímeros o agregados moleculares desprovistos de actividad biológica pero que conservan su propiedad inmunológica y participan de la inmuno-

reactividad total para PRL (50-52). A estas macromoléculas se les denominó "big-big PRL" y "big PRL" respectivamente. Más recientemente se encontró una forma glicosilada de aproximadamente 26KD que parece ser el monómero de 22KD con un radical glicosado (63). Esto es posible gracias a que la PRL tiene una secuencia de aminoácidos en la que en un fragmento se encuentra en el orden: ASN-LEU-SER, a partir de la posición 31 de la estructura primaria. Aquí se pega la cadena lateral azucarada en la asparagina (63-64). Se ha podido establecer que la forma glicosilada de PRL constituye aproximadamente 10 a 15% del total de PRL circulante, pero que tiene una potencia biológica menor a la del monómero de 20KD. En igual forma se han podido detectar formas moleculares más pequeñas cuyo significado fisiológico no se ha podido esclarecer (65). Utilizando la cromatografía en columna y empacada con un gel se ha podido estudiar la concentración proporcional de las formas moleculares de PRL en mujeres normales antes y después de conseguir el embarazo, así como en el periodo posparto con el fin de especificar indirectamente las variaciones que ocurren en condiciones fisiológicas.

Pacientes. Para poder realizar este estudio se obtuvo la aprobación del Comité de Ética del Instituto Mexicano del Seguro Social. A los pacientes voluntarios se les tomaron muestras de sangre venosa del antebrazo en ayunas entre las

8.00 y 9.00 horas, después de haber permanecido en reposo cuando menos durante 15 minutos. La muestra de sangre se dejó coagular a la temperatura ambiente para así separar el suero y luego completar la separación mediante centrifugación. Las muestras se almacenaron en el congelador a una temperatura de 20C hasta el momento del análisis.

Cromatografía por afinidad en gel. (Fig. 5) Se utilizaron columnas de vidrio de 60 cm x 1 cm las cuales fueron empacadas con Sephadex G-100 y equilibradas con amortiguador de fosfatos 0.1 M que contenía 0.1% de suero de albúmina bovina (BSA) a un pH de 7.4 y en una temperatura de 4C. El mismo amortiguador se utilizó para la elución de la columna.



100 μ l de cada fracción para RIA de prolactina

Fig. 5 De una manera esquemática se representa técnica de la cromatografía en columna empacada con gel y los pasos relevantes de la filtración.

La columna se calibró con marcadores de peso molecular ya conocido como fueron el azul dextrán (mol wt 200KD), albúmina bovina (mol wt 65KD), ovoalbúmina (45KD), anhidrasa carbónica (22KD), citocromo C (12KD), PRL marcada con I 125 (22KD) y el yoduro de sodio-125 (Fig. 6).

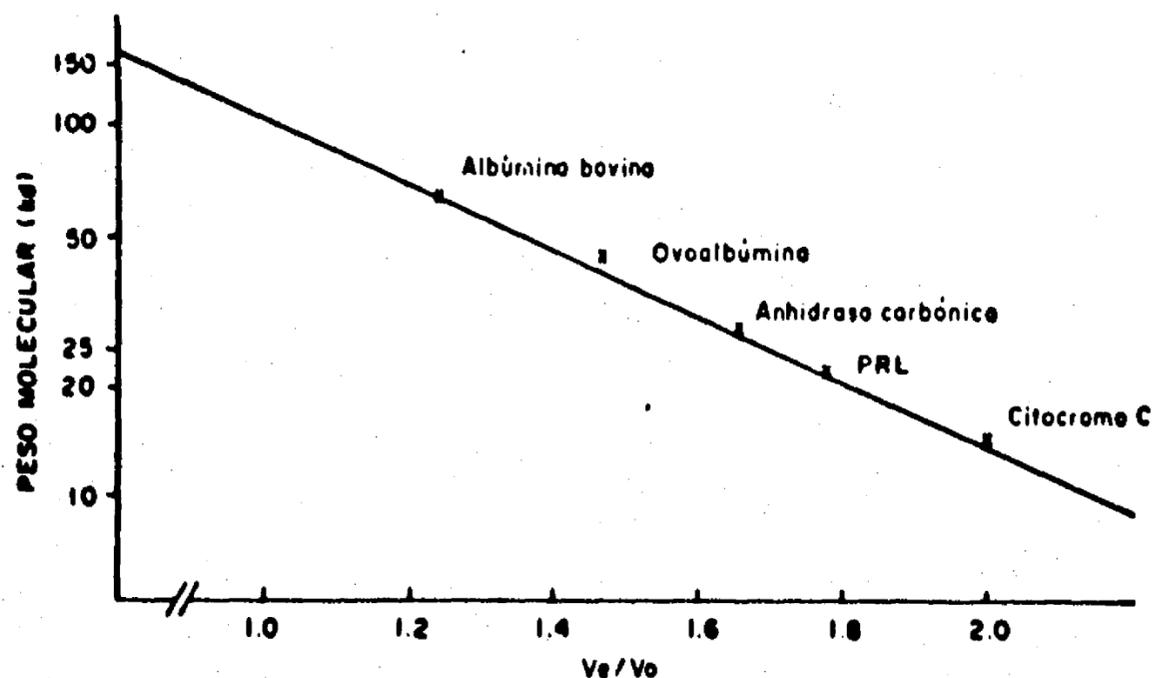


Fig. 6 Se representa la curva de peso molecular obtenida mediante una cromatografía de varias proteínas que sirven como marcadores. Se grafica la relación entre el valor de V_e/V_o (V_e : elevación de cada marcador, V_o : volumen de vacío del sistema) contra el peso molecular (Kilodaltones) de cada proteína.

El azul dextrán señala el V_o del sistema y $^{125}\text{I Na}$ el V_t . La columna se recalibró en intervalos regulares y la recuperación de la inmunorreactividad de PRL a su paso por la columna fue entre 90 y 98%. Las muestras de suero se concentraron en filtros Amicon B-15 (W:R: Grace Co., Danver, MA, USA) hasta obtener 3 ml (1 ml del suero se diluyó con agua hasta obtener 3 ml en las muestras obtenidas de las embarazadas y lactantes). De esta manera se aplicaron las

muestras de 3 ml a la columna y el flujo se ajustó a 4.5 ml/hr y se colectaron fracciones de 1 ml mediante un colector de fracciones automático (Multiracc 2111, LKB, Bromma, Finlandia). Las 60 fracciones de cada columna se mantuvieron refrigeradas a 4°C hasta su análisis para determinar la concentración de prolactina. Toda esta metodología ha sido publicada previamente (66). Las formas moleculares de PRL separadas por la filtración en gel se identificaron con base en su volumen de elución y la constante partición (K_{av}); el peso molecular se calculó sobre la curva de calibración, la distribución de la inmunorreactividad de PRL se calculó como un porcentaje de la inmunorreactividad total.

Cromatografía de afinidad con Concanavalina A-Sepharosa. Un sistema no competitivo de cromatografía por afinidad se utilizó para disociar la PRL-glicosilada (G-PRL) de concanavalina A-Sepharosa de acuerdo con el método de Matssura & Chen (67). Para lo anterior se utilizó Concanavalina A-Sepharosa (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden) la cual se equilibró con amortiguador de acetatos 0.1 M y pH 6.0 a una temperatura ambiente. Para la cromatografía se utilizó una columna de vidrio de 5.0 x 0.5 cm a la cual se le aplicaron las fracciones 35-42 de la filtración en gel que contenían la forma monomérica de PRL (22 y 26KD). De esta manera la fracción no ligada se recabó nuevamente y se le determinó la concentración de PRL. Por

otro lado la fracción glicosilada se eluyó con ND40H 1 M e inmediatamente neutralizada con amortiguador de acetato hidroxilado, antes del radioinmunoanálisis de PRL (Tabla 4).

TABLA 4.- PORCENTAJE DE INMUNOREACTIVIDAD A PROLACTINA DESPUES DEL ANALISIS CROMATOGRAFICO CON CONACANAVALINA A

MOL WT (KD)	CONCANAVALINA A - SEFAROSA	
	ELUIDA %	LIGADA %
26	36	64
22	65	35

Radioinmunoanálisis de PRL. La concentración de PRL se determinó por duplicado en las muestras de suero y en los eluados de la columna mediante una técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo utilizando reactivos generosamente donados por Hormone Distribution Program del Instituto de Salud de los EUA (NIDDK). El límite de detección del análisis fue 0.5 $\mu\text{g}/\text{l}$ y la gráfica logit-log para calcular la cantidad de PRL en la muestra fue proporcional al PRL que se agregó hasta 200 $\mu\text{g}/\text{l}$. Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron menor a 8 y 10% respectivamente cuando tres regiones de la curva estándar fueron evaluadas (67).

RESULTADOS

Mujeres con función ovárica normal. En seis mujeres con

menstruaciones regulares y con ciclos ovulatorios las cuales fueron estudiadas en la mitad de la fase folicular del ciclo menstrual se pudo demostrar la existencia en la circulación de varias formas de PRL que correspondieron con las zonas de inmunoreactividad detectadas en la cromatografía (Fig. 7).

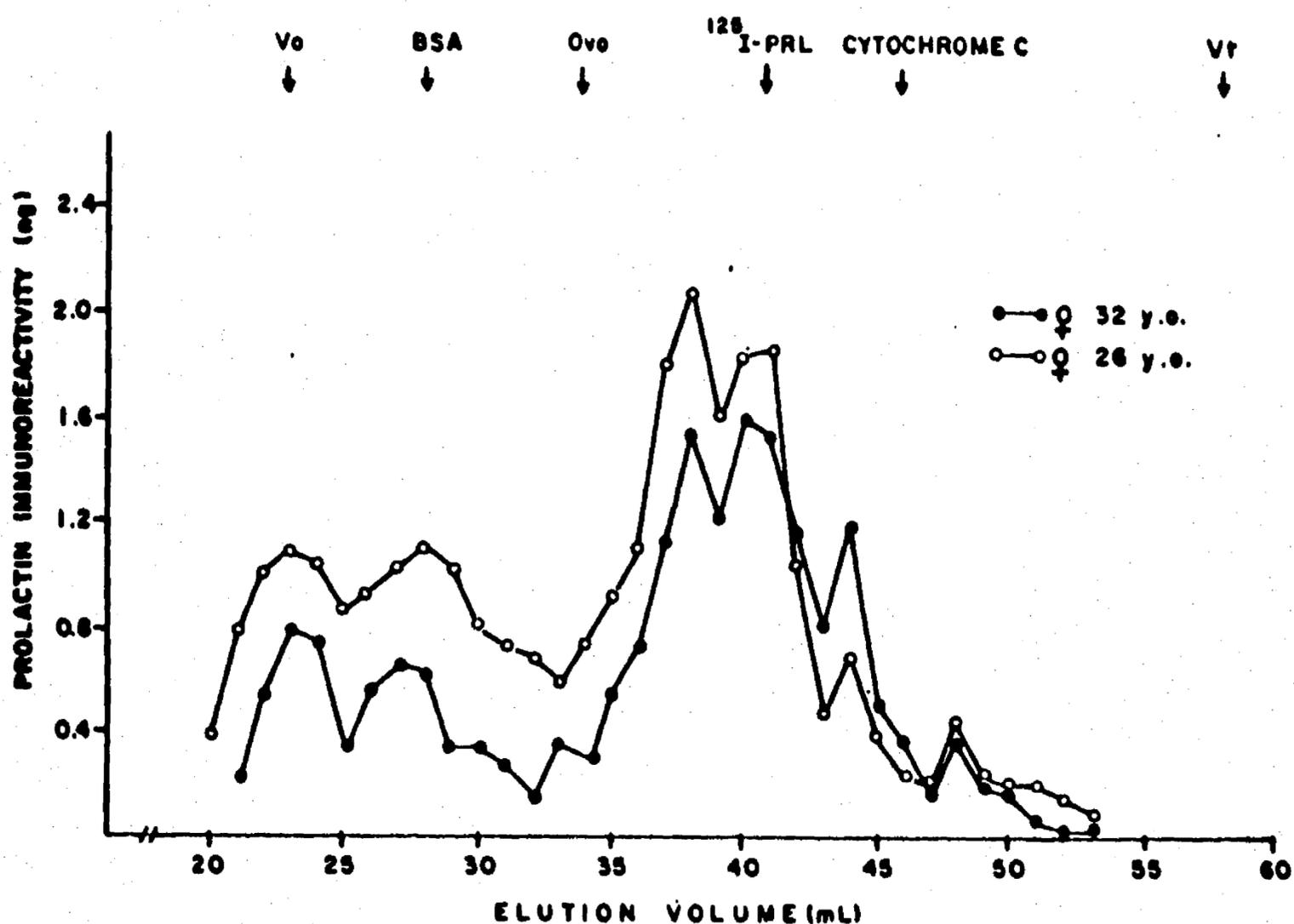


Fig. 7 Filtración en gel de muestras de suero obtenidas de dos mujeres con función ovárica normal. Las flechas indican los marcadores del peso molecular. Se nota con claridad la proporción elevada de las formas moleculares grandes de prolactina en el lado izquierdo de la gráfica. Las formas monoméricas están al centro y además se observa la presencia de formas pequeñas que corresponde a la serie de fracciones 45-50. (J. Endocrinol Invest (1991). En Prensa).

Las dos formas predominantes fueron las variedades monoméricas de 22 y 26KD, las que en forma conjunta constituía

del 45 al 50% de toda la actividad (Tabla 5).

TABLA 5.- FORMAS MOLECULARES DE PROLACTINA EN EL SUERO DE MUJERES CON FUNCION OVARICA NORMAL

	"BIG-BIG"	"BIG"	(26 K)	(22 K)	(16 K)
VE (ML)	23-26	28-31	35-38	39-42	43-48
KAV	0.02	0.20	0.40	0.48	0.6-0.7
MW (KD)	100	66-44	28-25	23-22	18-16

COEFICIENTE DE PARTICION ($KAV = \frac{VE - VO}{VT - VO}$) VE: TUBO DEL
PICO DE LA FRACCION HORMONAL; VO: VOLUMEN FINAL;

VT:125 I YODURO DE SODIO

También se detectaron las dos formas moleculares grandes de 50 y 100KD que daban aproximadamente 34% de la inmunoreactividad a PRL; la forma más grande (big-big PRL) se encontró en mayor proporción que la otra. Mediante la filtración en gel se pudo demostrar una área de inmunoreactividad eluyendo en la zona de un mol wt de 16KD. En un intento de verificar la presencia del monómero de 26KD se recromatografiaron las fracciones 35-38 y nuevamente se encontró un pico de inmunoreactividad claramente separado del estándar marcado de PRL que es 23KD (Fig. 8).

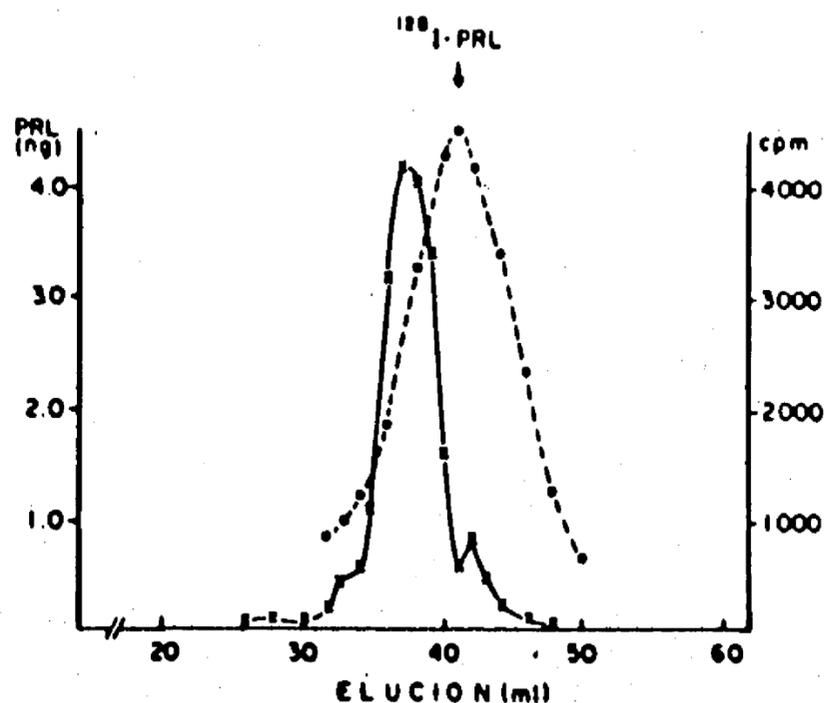


Fig. 8 Las fracciones del 34-38 del filtrado en gel por la columna fueron recromatografiadas con el objeto de disociar las dos variantes moleculares de prolactina, lo cual resultó en su separación. El estándar de prolactina (^{125}I -PRL) queda visible y corresponde a la variante no glicosilada.

Embarazo y lactancia. Se observó un aumento progresivo en la cantidad de PRL 22KD a medida que el embarazo transcurría, y dicho incremento persistió durante el periodo posparto y la etapa de lactancia. Por otra parte se encontró que la forma de 26KD era proporcionalmente mayor que la 22KD durante el segundo trimestre del embarazo, pero después decrecía durante el tercer trimestre y en el periodo posparto (Fig. 9).

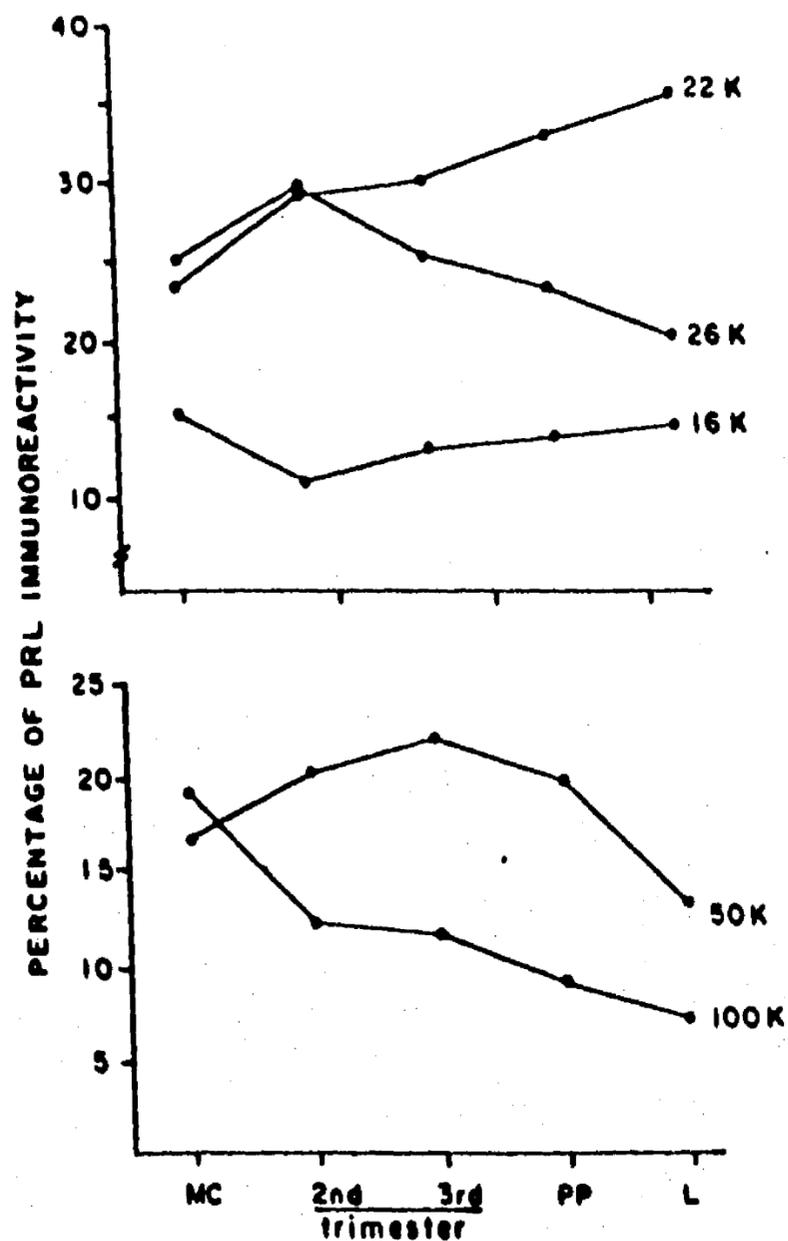


Fig. 9 Se muestra el porcentaje de Inmunoreactividad a prolactina en el ciclo menstrual (Mc), en segundo y tercer trimestres de la gestación, en el posparto inmediato (PP) y durante la lactancia (L). En el panel superior se encuentra la distribución de las formas monoméricas y la de bajo peso molecular, mientras que en el panel inferior se muestran las variantes poliméricas de prolactina (J. Endocrinol Invest (1991). En Prensa).

Las curvas de concentración de las formas mol grandes mostraron una tendencia divergente ya que la 100KD decreció continuamente durante el embarazo, mientras que la 50KD subió gradualmente con la gestación y descendió bruscamente en el posparto (Fig. 10).

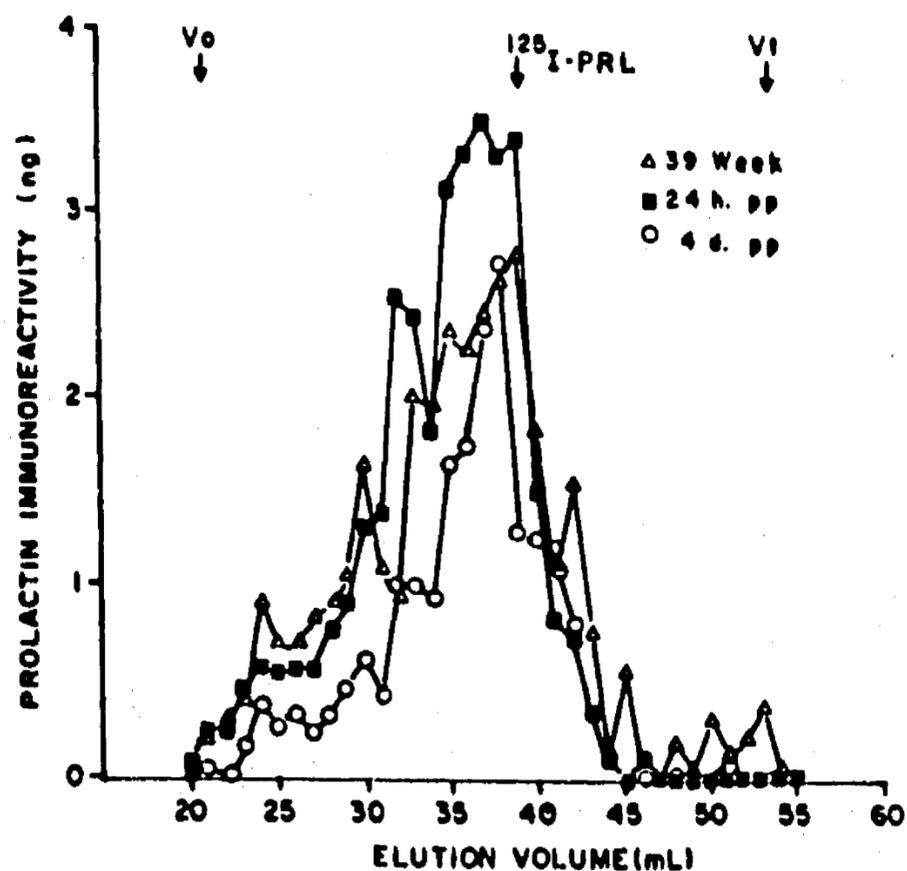


Fig.10 Perfil cromatográfico del suero de una persona durante el embarazo (39 semanas), posparto (PP) y cuando se encuentra en periodo de la lactancia (4 PP). Se nota claramente la proporción variable de las Isohormonas de prolactina.

Cantidades mínimas de estas moléculas grandes de PRL se siguieron detectando durante la lactancia y el amamantamiento no tuvo efecto sobre la proporción relativa de las formas moleculares. Tampoco se detectó algún efecto al estudiar las muestras de sangre tomadas antes y después de la succión del pezón por el recién nacido. En resumen se pudo constatar una variación entre la proporción relativa de las formas moleculares de PRL a medida que el embarazo progresaba así como después del parto y durante la lactancia (Tabla 6).

TABLA 6.- PORCENTAJE DE INMUNOREACTIVIDAD A PROLACTINA CON RELACION A LAS VARIEDADES MOLECULARES

	VARIEDADES DE PRL				
	BIG-BIG (100 K)	BIG (50 K)	GLICOSILADA (26 K)	PRL (22 K)	BAJO MOL WT (16 K)
PREOVULATORIA	19.4 ± 2.3	16.3 ± 1.9	24.6 ± 3.4	23.7 ± 2.9	14.8 ± 1.8
EMBARAZO					
2o. TRIMESTRE	11.7 ± 2.0	20.1 ± 2.3	30.3 ± 5.2	27.2 ± 2.3	10.4 ± 1.3
3er. TRIMESTRE	10.6 ± 1.9	23.1 ± 4.9	26.2 ± 3.7	30.5 ± 5.4	11.4 ± 4.2
POSPARTO	8.4 ± 2.0	21.5 ± 2.4	25.7 ± 1.7	33.4 ± 2.5	12.9 ± 2.1
LACTANCIA	7.0 ± 1.6	14.6 ± 2.5	22.5 ± 4.9	36.0 ± 1.2	14.1 ± 1.9
SIGNIFICADO ESTADISTICO*	NS	P < 0.02	P < 0.02	P < 0.005	NS

* COMPARANDO EL 2o. TRIMESTRE CON LACTANCIA

El estudio adicional mediante el uso de concanavalina A permitió distinguir las dos formas monoméricas de PRL y de esta manera se pudo constatar que siguen una curva diferente durante la gestación y la lactancia, predominando la variante 22KD al final de la gestación y durante la etapa de lactancia como se aprecia en la Fig. 9. En este estudio no se intentó determinar el mecanismo que determina las variaciones en la distribución proporcional de las formas moleculares de PRL, sólo se puede inferir indirectamente que tales cambios en la proporción de las isohormonas puede estar condicionado al milieu interior hormonal.

En la Tabla 7 se suman las principales conclusiones emanadas del estudio con respecto a la proporción de las formas moleculares de PRL.

TABLA 7.- CONCLUSIONES DEL ESTUDIO DE PROLACTINA

**CAMBIOS EN LAS FORMAS MOLECULARES DE PRL
DURANTE EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA**

**FORMAS GRANDES DISMINUYEN GRADUALMENTE
DURANTE LA GESTACION**

**26 KD-PRL AUMENTA HASTA LA MITAD DE LA
GESTACION Y LUEGO DISMINUYE**

**22 KD-PRL AUMENTA CON EL EMBARAZO,
POSPARTO Y LACTANCIA**

HORMONA DE CRECIMIENTO

La hormona de crecimiento (GH) es una hormona protéica de, una sola cadena lineal de 191 aminoácidos con dos puentes de disulfuro localizados dentro de la molécula. La GH es la hormona más abundante en la adenohipófisis y en el humano es estructuralmente diferente a la GH de otras especies zoológicas. Por contraste las otras hormonas hipofisarias (PRL, gonadotropinas y TSH) guardan ciertas similitudes biológicas e inmunológicas con sus congéneres de otras especies animales (68). Tanto la PRL como el lactógeno placentario (HPL) tienen una estructura muy semejante, así HPL tiene una secuencia de aminoácidos igual a la de PRL en casi un 85%. Mediante las técnicas de cromatografía como la filtración en gel y la electroforesis con gel se ha podido determinar de una manera incuestionable que la GH circula en diferentes formas moleculares (69).

La introducción en la metodología del dodecil sulfato durante la electroforesis permitió una separación completa de las moléculas de acuerdo con su peso molecular y carga eléctrica (70). De esta manera se ha podido establecer que la isohormona más abundante tanto en la hipófisis como en la circulación es la forma 22KD que constituye aproximadamente el 60% del total de GH. También se han detectado otras dos variantes de mayor peso molecular que parecen corresponder a dímeros de 45 y 60KD, así como agregados moleculares de 80 y 100KD, los que en forma trivial se denominan "big" y "big-big" GH (Tabla 8).

TABLA 8.- FORMAS MOLECULARES DE HORMONAS DE CRECIMIENTO

FORMA	ACTIVIDAD		PM (KD)	CARACTERISTICAS
	BIOLOGICA			
"LITTLE"	+	+	22	MONOMERICA
"BIG"	+	+	45 & 66	DIMEROS Y OLIGOMEROS
"BIG-BIG"	+		80 & 100	OLIGOMEROS

Cromatografía en gel. Se sigue la misma metodología que para el análisis de PRL descrito anteriormente.

Radioinmunoanálisis de GH. Las condiciones en nuestro laboratorio ya han sido detalladas previamente (70).

Proporción de formas moleculares de GH en mujeres normales.

La proporción de formas moleculares de GH durante la fase folicular del ciclo menstrual muestra un predominio de la 22KD aunque se encuentran en proporciones no despreciables las formas más grandes. La cromatografía por afinidad también mostró la presencia de formas moleculares pequeñas de GH en la zona de 16KD. Estas formas pequeñas no sufrieron cambios importantes en cuanto a su proporción, antes y durante la gestación, permaneciendo prácticamente constantes (Fig. 11).

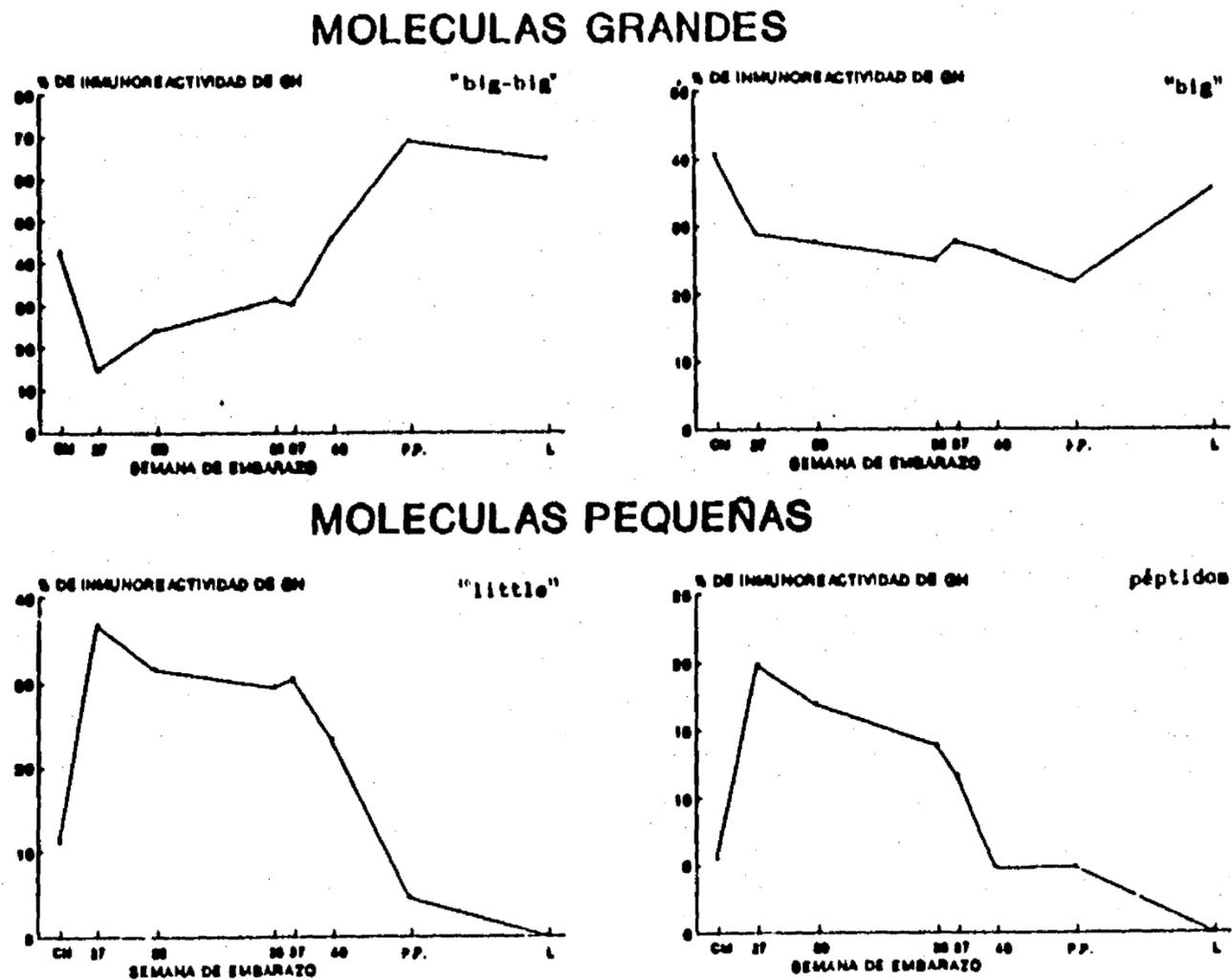


Fig. 11 Cambios en las formas moleculares de hormona de crecimiento con relación a la etapa gestacional, expresada en semanas. En la parte superior se registran las proporciones de inmunorreactividad de las formas poliméricas ("big-big" y "big") y en la parte inferior, la forma monomérica ("little") que es la que está provista de la mayor actividad biológica. El término "péptidos" se refiere a moléculas de menor peso, como ocurre en cromatografía de la prolactina.

La cantidad total de inmunoreactividad a GH en el suero de mujeres a lo largo del embarazo ya había sido estudiada en mi laboratorio y había mostrado que las cifras eran semejantes a las que se observan en mujeres no embarazadas, por abajo de 5 ng/ml (Fig. 12).

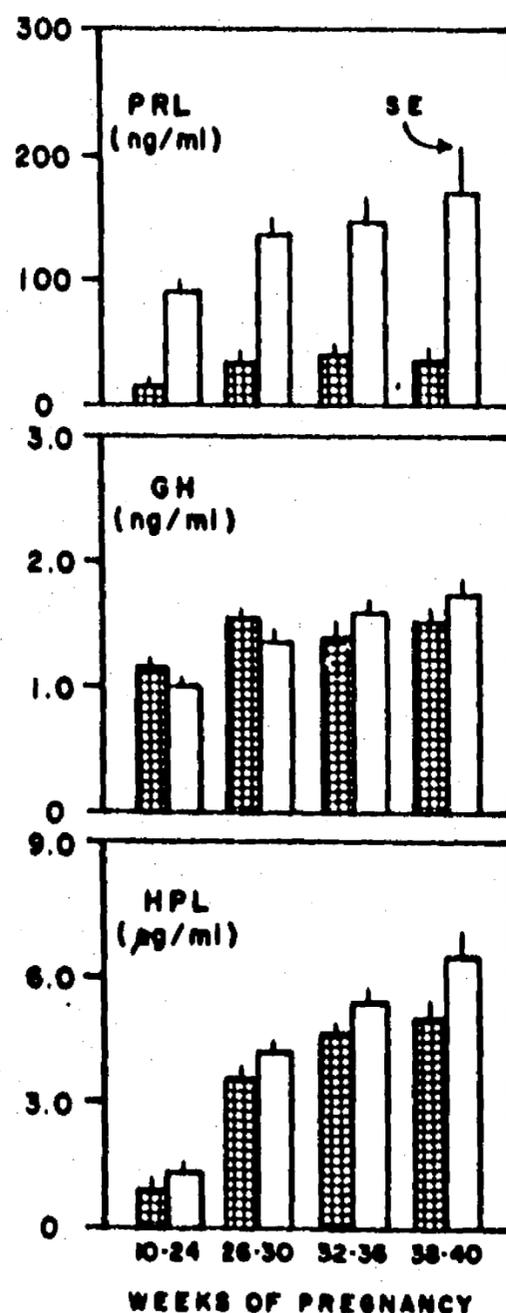


Fig. 12 Concentraciones de prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH) y lactógeno placentario (HPL), en la circulación de acuerdo con la semana de gestación. En columnas claras se muestra la concentración hormonal en embarazadas normales y las columnas rayadas representan los niveles en mujeres embarazadas que estaban recibiendo bromocriptina por padecer un prolactinoma (Canales et al. Fertl Steril 36:524, 1981).

El aumento en la proporción de la forma monomérica de 22KD a expensas de las formas grandes aún no tiene interpretación, pero también podría estar determinada por el ambiente hormonal que va cambiando durante la gestación y que en consecuencia señala la necesidad fisiológica de una mayor cantidad de la forma más activa para cumplir con los requerimientos metabólicos y procesos de crecimiento que van en relación con la progresión del embarazo. Para una mejor interpretación de los cambios en la proporción de las formas de GH es necesario obtener una mayor información de lo que ocurre con la otra hormona lactogénica, que es HPL (Tabla 9).

TABLA 9.- CAMBIOS EN LAS FORMAS MOLECULARES DE HORMONA DE CRECIMIENTO

MOLECULAS GRANDES AUMENTAN AL FINAL DE LA GESTACION Y LA LACTANCIA

MOLECULAS PEQUEÑAS DISMINUYEN AL FINAL DEL EMBARAZO Y LA LACTANCIA

GASTRINA

La gastrina (Ga) fue una de las primeras hormonas descubiertas y aunque inicialmente se pensó que era una hormona de síntesis exclusiva del tubo digestivo, en los últimos años se ha demostrado que es producida en otras partes del organismo como son la adenohipófisis y el sistema nervioso central (71-74). Estudios en el humano han podido concluir

que la Ga puede existir en varias formas moleculares (Tabla 10). La forma molecular más abundante es la "pequeña" que tiene una cadena lineal de 17 aminoácidos y un peso aproximado de 2116, pero también existe una variedad sulfatada de 21KD (Ga-17, II). La variante macromolecular tiene 34 aminoácidos y un peso de 3.8-3.9KD ya que no existe una forma sulfatada; además hay una forma molecular más pequeña de 13 a 14 aminoácidos. La Ga-17 es la más abundante y es producida en su mayor proporción en el antro gástrico; en cambio la Ga de mayor peso molecular se ha encontrado en la hipófisis tanto sana como cuando alberga un tumor (75).

TABLA 10.- NIVELES SANGUINEOS DE GASTRINA DURANTE LA ETAPA PERINATAL

NIVELES ALTOS EN EL SUERO DEL CORDON DEL RECIEN NACIDO

NIVELES ELEVADOS EN EL SUERO MATERNO

LA CONCENTRACION AUMENTA DURANTE LA ALIMENTACION CON EL PECHO

Material clínico. Se estudiaron seis mujeres que cursaban un embarazo normal y terminaron con un parto eutócico y un recién nacido normal. En los recién nacidos y en la leche se hicieron análisis hormonales. Las muestras de sangre se

tomaron de la vena antecubital y del cordón de acuerdo con cada caso en particular, siguiendo los protocolos específicos que se han seguido en estas circunstancias especiales (76). Además se colectaron muestras de líquido amniótico en el momento del parto. Las muestras de sangre se recogieron en tubos que contenían 0.1 ml de Trasylol (1000 unidades de kalikreina) con el objeto de inhibir las enzimas proteolíticas y a continuación se dejó coagular a temperatura ambiente. El suero se separó de inmediato y se almacenó en un congelador a temperatura de -20C hasta el momento de realizar las determinaciones hormonales así como la cromatografía en columna con gel.

Radioinmunoanálisis. Se utilizaron dos anticuerpos contra Ga obtenidos de Amersham (Int. Plc. Amersham, UK); el primero RPN 1651 altamente específico contra la Ga puede unir las diferentes formas moleculares de la hormona y además tiene muy poca reacción cruzada (estimada en menos de 1.5%) con respecto a la colecistoquinina y otros péptidos con estructura similar. Por otra parte el anticuerpo RPN-1653 es selectivo contra Ga-17 (Fig. 13).

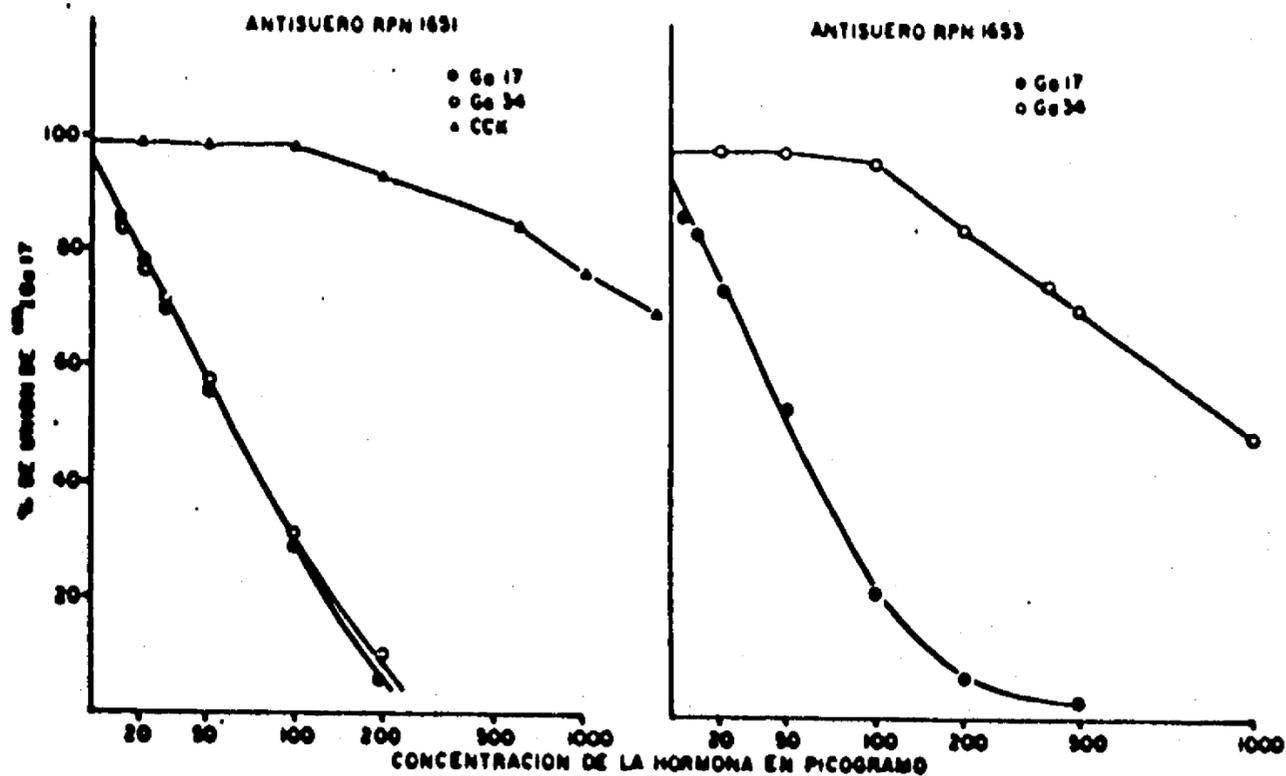


Fig. 13 Especificidad y sensibilidad del análisis de gastrina con dos diferentes anticuerpos. El anticuerpo RPN-1651 reconoce las diferentes especies moleculares de gastrina y el anticuerpo RPN-1653 es específico para gastrina - 17. La colecistoquinina que es una hormona muy parecida estructuralmente no interfiere en el sistema. (Fonseca & Zárate, Clin Endocrinol 27:403, 1987).

Se utilizó Ga-17 obtenida en forma sintética como el estándar ya que tiene la misma secuencia que la Ga humana (Sigma Chemical Co.) y ¹²⁵I Ga-17 como el marcador. El anticuerpo RPN-1651 fue específico para Ga tanto en la forma 17 como 34 y tuvo una mínima reacción cruzada con la colecistocinina ya que se tuvieron que utilizar concentraciones superiores a 5000 pg de colecistocinina para lograr una inhibición. El anticuerpo RPN-1653, que es específico para Ga-17, prácticamente no sufrió desplazamiento por la Ga-34 (Fig. 14).

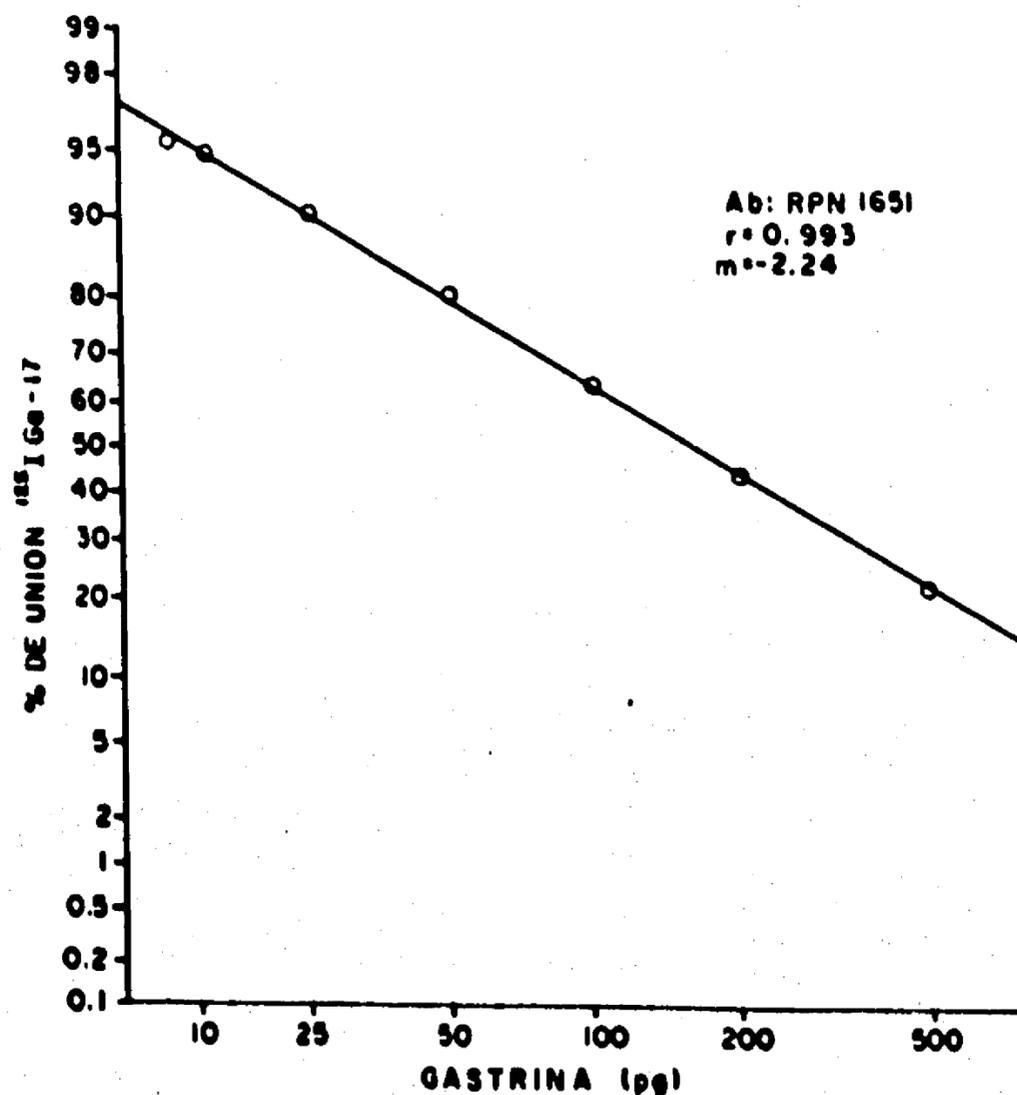


Fig.14 La curva estándar típica en escala logarítmica (papel Logit-log) del análisis de la gastrina usando RPN-1651 como anticuerpo. Se observa un descenso en la incorporación de Ga al anticuerpo conforme se incrementa la concentración de Ga-17 en el estándar sin radiactividad.

Los sistemas de RIA con ambos anticuerpos tuvieron una sensibilidad de 5 pg/ml. En estas condiciones la sensibilidad del sistema fue de 5 pg/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 5.4 y 9.8% respectivamente.

Filtración en gel. Se utilizó una columna de vidrio de 100 x 1 cm empacada con Sephadex G-50 fino y la columna se equilibró y eluyó con amortiguador de barbital 0.2 M y pH 8.4 con agregado de BSA al 1%. La calibración de la columna se realizó con azul dextrán, ^{125}I Ga-17, ^{125}I Ga-34 y ^{125}NaI . El flujo se estableció contra la gravedad a una velocidad de 12 ml/hr y se recolectaron fracciones de 1.5 ml. Cada una de estas fracciones fueron sometidas al radioinmunoanálisis en alícuotas de 0.1 ml. En la columna se aplicaron alícuotas del suero de 3.0 ml. El coeficiente de partición (K_{av}) de las moléculas eluidas en la columna se calculó de acuerdo con el método de Laurent-Kjellander (77).

Concentraciones de Ga en parto y lactancia. El contenido de Ga en la circulación materna fue mayor que el detectado en una muestra de líquido amniótico obtenida al mismo tiempo; en cambio se encontró una mayor concentración de Ga en el cordón umbilical del recién nacido (Fig. 15).

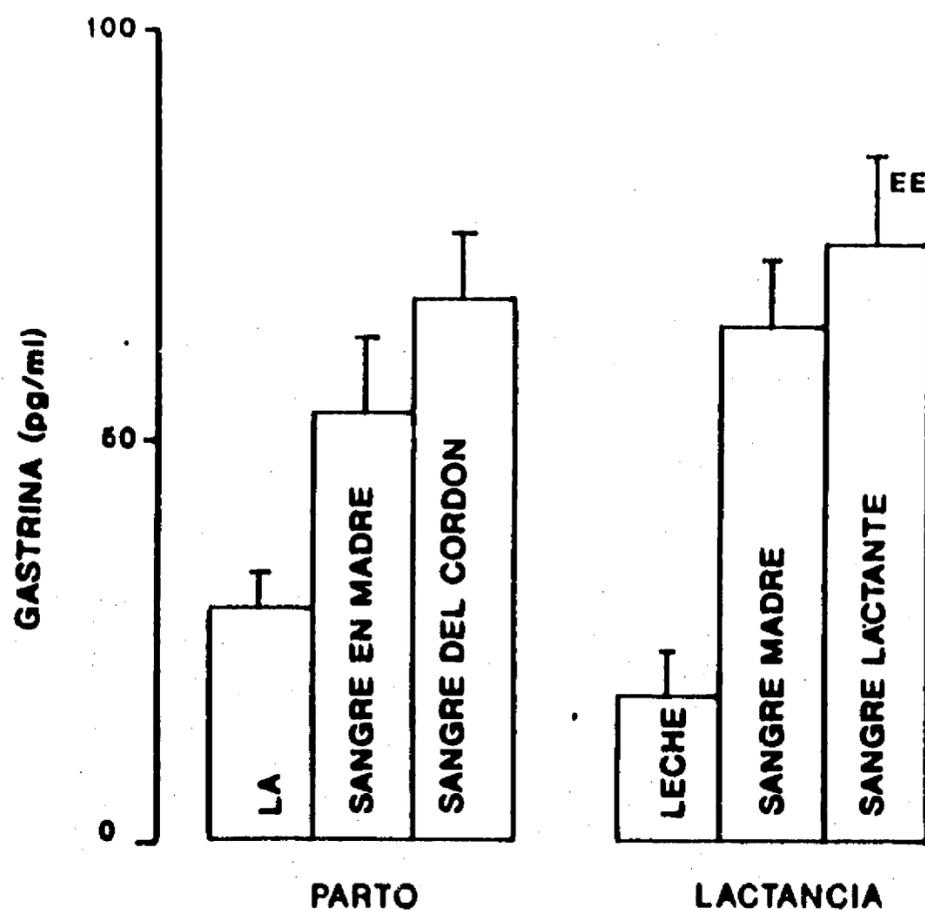


Fig. 15 Niveles de gastrina en el momento del parto y en la lactancia para mostrar que la concentración es mayor en el recién nacido y en el lactante.

Asimismo la concentración de Ga en la circulación del niño lactante fue mayor significativamente que la obtenida en su madre; en la leche se encontró una cantidad mucho menor que en las dos muestras biológicas anteriores.

La concentración de Ga en el recién nacido prematuro en sangre obtenida del cordón fue significativamente menor que en los recién nacidos a término y peso normal (Fig. 16).

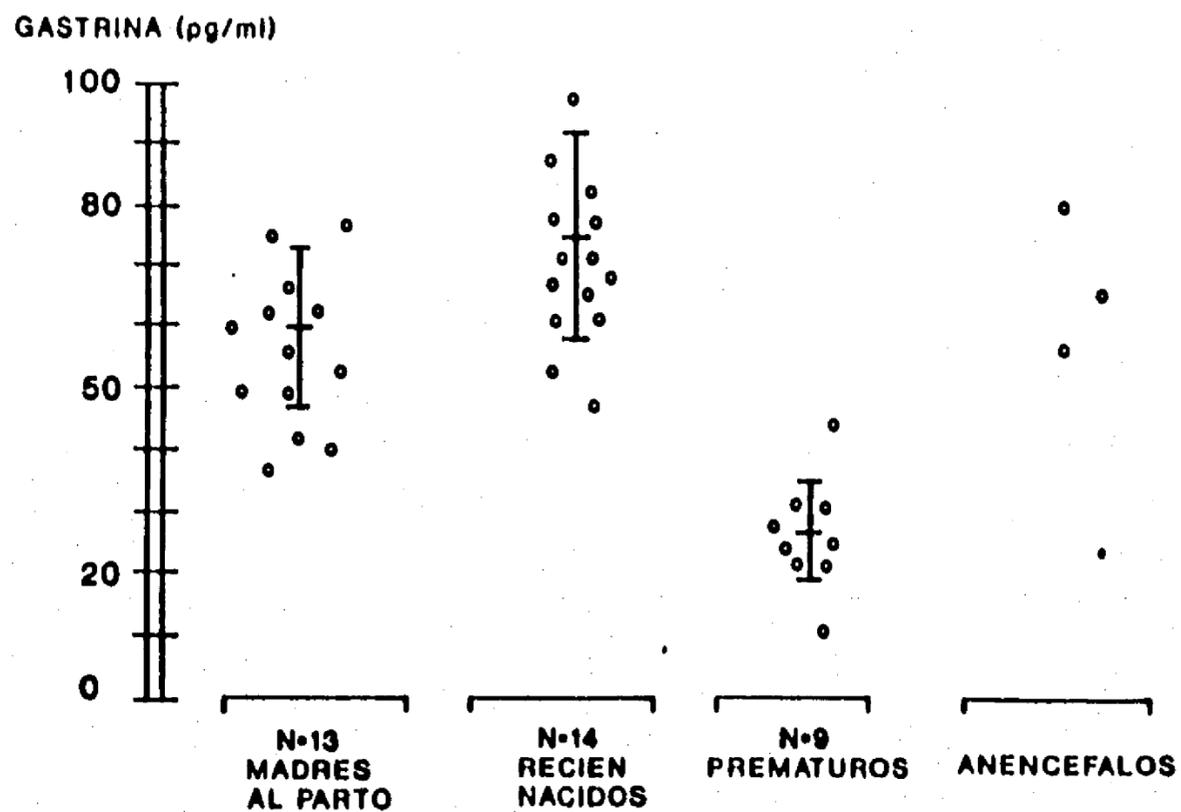


Fig. 16 La concentración de gastrina en madres y recién nacidos en condiciones normales, en prematuros y en anencefalos, los puntos son valores individuales. Los recién nacidos normales muestran los niveles más altos.

En un estudio realizado durante los periodos de amamantamiento se encontró que la concentración de Ga obtenida en el suero del lactante mostraba un incremento casi del doble después de 30 minutos de estar succionando el pezón (Fig. 17). Esta forma de respuesta al amamantamiento se conservó dos y tres semanas posparto, sensiblemente con la misma magnitud de incremento en las tres semanas del estudio (Fig. 17).

EFFECTO DE LA LACTANCIA SOBRE
GASTRINA CIRCULANTE EN SANGRE
Y EN LA LECHE

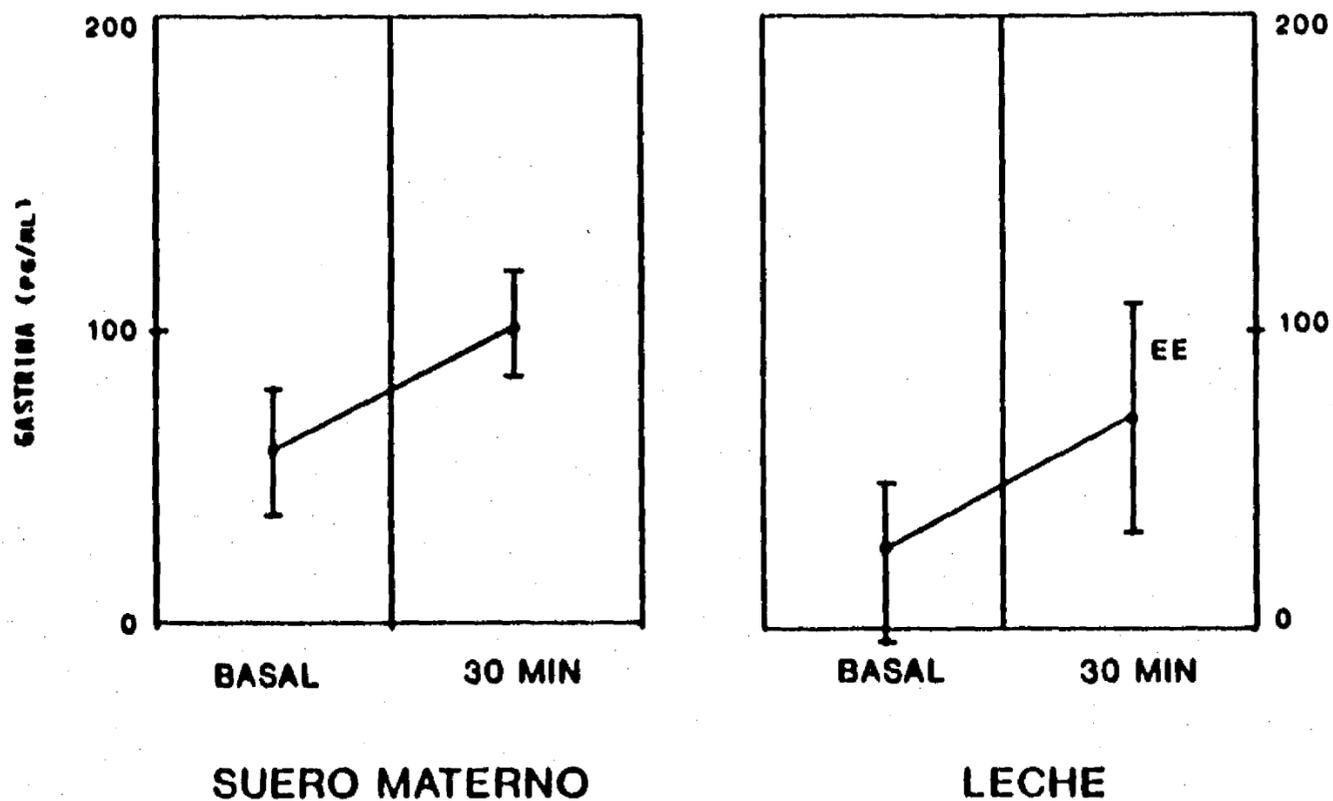


Fig. 17 Tanto en la circulación materna como en la leche la concentración de gastrina muestra un incremento como respuesta a la succión del pezón por el niño. La madre produce y secreta una mayor cantidad de gastrina al amamantar.

En tres madres se estudió el contenido de Ga en suero antes y después de que el niño se estaba alimentando y se observó un discreto incremento en la concentración de Ga; asimismo, fue moderado el aumento en la Ga de las muestras de leche, como respuesta al estímulo de la succión del pezón (Fig. 18).

GASTRINA EN SUERO DE LACTANTES EFECTO DE AMAMANTAMIENTO

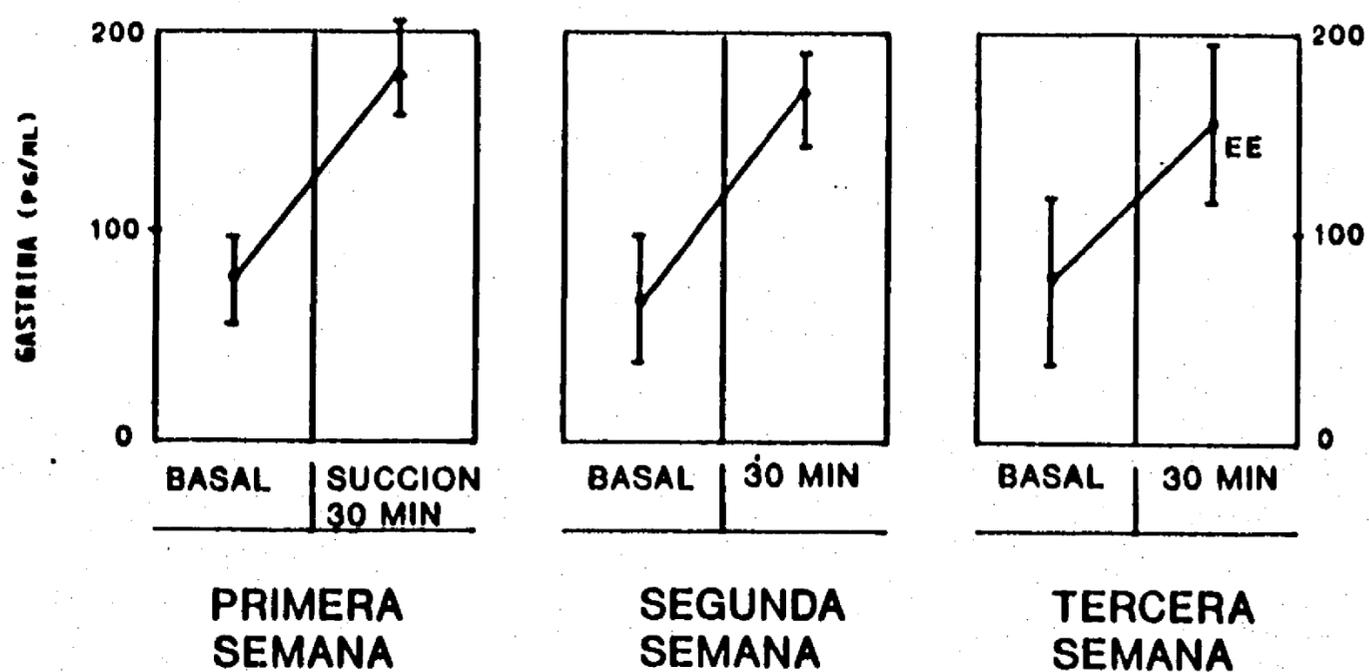


Fig. 18 La concentración de gastrina en la circulación del niño aumenta al succionar el pezón y la ingestión de leche. La magnitud del incremento de la secreción de gastrina en el lactante se mantiene prácticamente sin cambios durante todo el período de lactancia.

En una madre y en su recién nacido se pudo realizar una cromatografía del suero para conocer la proporción de las dos principales formas moleculares de Ga y se encontró que en la madre predominaba la Ga-34, en cambio en el niño la mayor proporción correspondió a Ga-17 (Fig. 19).

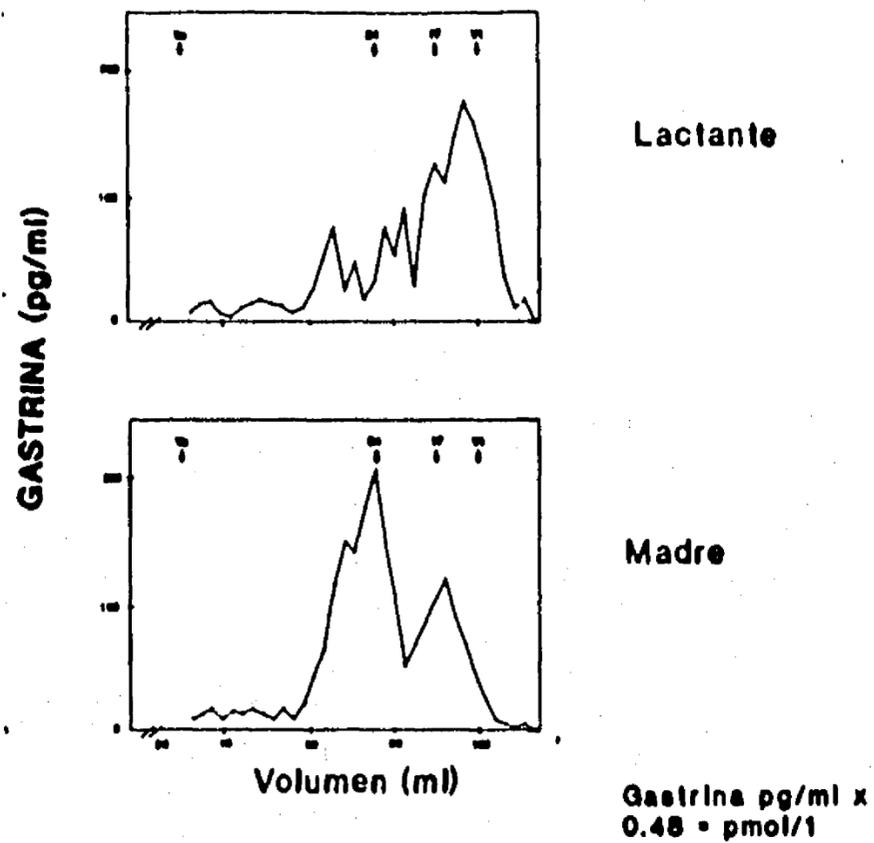


Fig. 19 Se muestra el fraccionamiento, en Sephadex G-50, de las moléculas de gastrina presentes en el suero de la madre y de su recién nacido. En el recuadro superior se demuestra que la forma de Ga-17 es la molécula predominante en el niño. En el recuadro inferior el cromatograma de la madre revela que la forma predominante es la Ga-17. Las flechas indican el volumen de elución del azul dextrán (V_0), ^{125}I Ga-34, ^{125}I Ga-17, NaI (V_t), de izquierda a derecha respectivamente.

En la Tabla 11 se resumen las principales conclusiones derivadas del estudio realizado para conocer las variaciones en la Ga circulante.

TABLA 11. DATOS SOBRESALIENTES DEL ESTUDIO CON GASTRINA EN LA CIRCULACION MATERNA Y EN EL RECIEN NACIDO

-
- **LA CONCENTRACION DE GASTRINA ES MAYOR EN EL RECIEN NACIDO**
 - **LA SUCCION DEL PEZON DESENCADENA LA SECRECION DE GASTRINA EN AMBOS**
 - **SE PUEDE DEMOSTRAR LA PRESENCIA DE LAS DOS FORMAS MOLECULARES DE GASTRINA, 17 Y 34 KD**
 - **LA LECHE CONTIENE GASTRINA**
-

Patología del embarazo. Es interesante referir los resultados preliminares que se han obtenido de un trabajo en proceso. Se encontró que los niveles circulantes de Ga en la gestación normal son significativamente menores que los observados en embarazadas con preeclampsia y en aquellas con un embarazo prolongado (78). La misma tendencia se observó en cuanto a la concentración de Ga en el cordón umbilical de los recién nacidos de madres con patología obstétrica en comparación con los recién nacidos de madres con embarazo normal (Fig. 20).

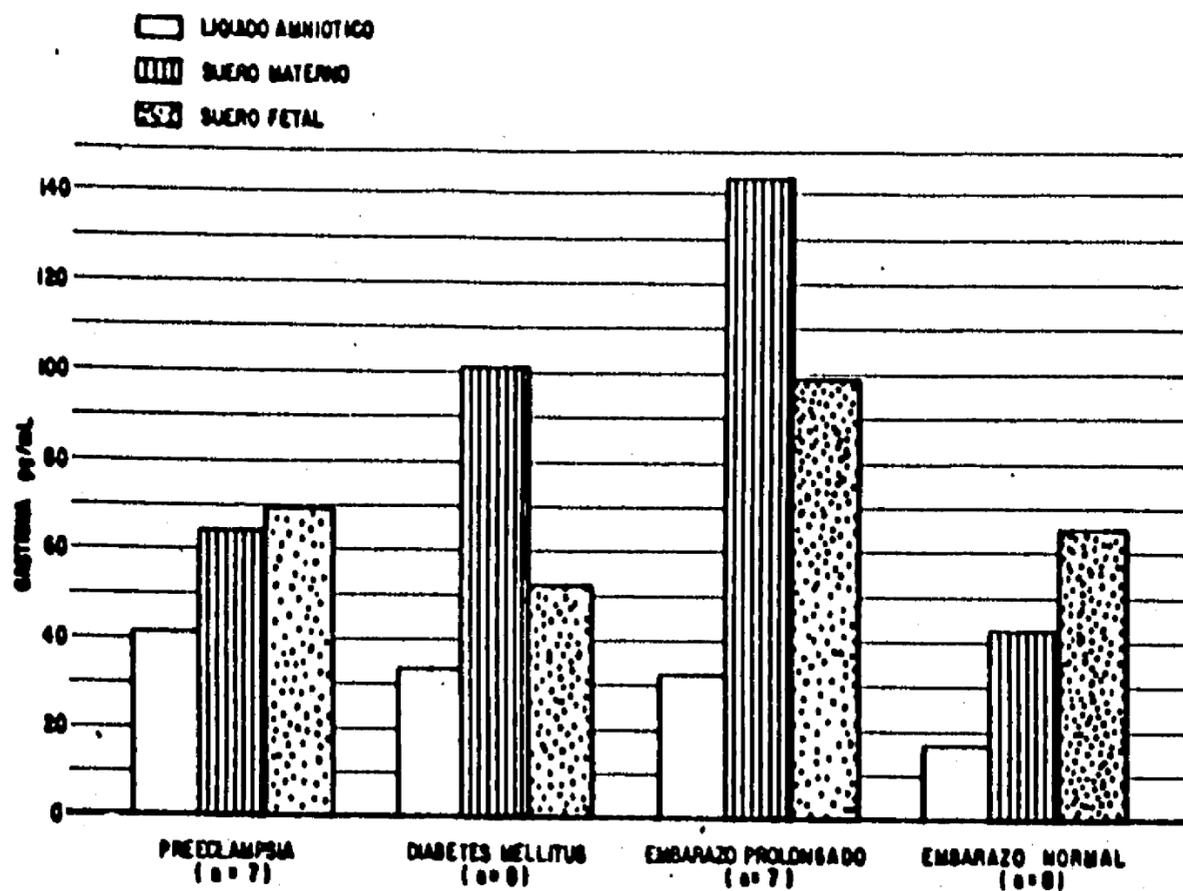


Fig. 20 Concentraciones de gastrina en los líquidos biológicos de la madre y del recién nacido, en condiciones normales y en varias patologías obstétricas. Se observa que cuando existe una patología obstétrica los niveles de gastrina son mayores que los que se registran en la gestación normal (Morán et al. datos aún no publicados).

La interpretación inicial a estos hallazgos es que probablemente las condiciones de estrés en la madre, que se transmiten al feto, se reflejan en la concentración de Ga tanto de origen hipofisario como de la que proviene del tubo digestivo (79-80).

CONCLUSIONES

No obstante que se acepta ampliamente que las hormonas proteicas circulan en varias formas moleculares guardando

una cierta relación con las condiciones del medio interno, aún es necesario investigar más profundamente con el objeto de aclarar la interrelación entre la proporción de esas moléculas y las etapas fisiológicas. Asimismo es importante establecer el mecanismo que determina una alteración en la proporción molecular de la hormona en ciertos estados patológicos para así conocer la fisiopatogenia de una enfermedad y subsecuentemente proporcionar estrategias terapéuticas para su manejo o tratamiento. En el caso de la PRL se ha acumulado una enorme información la cual ha permitido conocer tanto la fisiopatogenia de algunas enfermedades como los factores determinantes de las etapas fisiológicas. En condiciones normales la mayor proporción de PRL se encuentra en la forma monomérica, la cual a su vez puede encontrarse como la variedad glicosilada y la no glicosilada. Esta última forma monomérica es la más activa biológicamente y aún no se ha determinado si la forma glicosilada sólo es un reservorio de la primera en situaciones en las que se requiere su transformación periférica a otras formas (81-82). Durante la gestación y sobre todo en el periodo de la lactancia la forma no glicosilada es la variante molecular predominante ya que interviene en el proceso de la supervivencia de la especie a través de su participación en la preparación para la producción de la leche y más adelante el inicio del amamantamiento (82-83). En el presente estudio también se ha confirmado que las formas mole-

culares grandes de PRL, provistas de una menor actividad biológica, decrecen a medida que la gestación progresa y así permanecen durante la lactancia. Además, como un hallazgo especial fue la detección de formas moleculares aún más pequeñas que la variante monomérica lo cual en el momento sólo se puede considerar que son fragmentos moleculares, pero que conservan su actividad inmunológica.

Con base en los resultados que se obtuvieron en el estudio de las formas moleculares de PRL se pudo concluir que es aparente que la regulación de la proporción que se encuentra en las variantes de PRL es de importancia para la función hormonal y que por ende debe estar sujeta a un control endocrino. A su vez la regulación de la proporción de las formas moleculares de PRL por el medio interno puede contribuir al ajuste de la función hormonal al través de la secreción de diversas formas moleculares de PRL.

En cuanto a los resultados obtenidos en el estudio bioquímico de la GH y sus variantes moleculares, se puede concluir que sigue un comportamiento semejante al observado con la PRL. La forma predominante de GH fue también la monomérica y aunque las isohormonas de gran peso molecular estuvieron presentes en cantidades considerables (84), mostraron un descenso conforme avanzó la gestación. La

seguramente participar en forma importante en el proceso gestacional así como durante la lactancia. Al igual que con la PRL, es necesario profundizar en el estudio de la GH en diferentes condiciones fisiológicas. Por lo tanto en mi laboratorio ya se están ampliando los trabajos con el objetivo de analizar la interrelación que existe con la dinámica de PRL.

Los estudios con Ga son de particular relevancia ya que en esta área el conocimiento no ha sido tan extenso como el que se ha alcanzado con el estudio de otras hormonas. Se sabe de la importancia y de la interacción entre la madre y el recién nacido en cuanto al vínculo alimentario a través de la lactancia y como ésta permite y condiciona la etapa final del desarrollo del tubo digestivo en el niño (85-86). La llegada de leche al recién nacido y su respuesta a la secreción de varias hormonas, en particular las del tubo digestivo, es una etapa definitiva en el desarrollo del sistema digestivo (85-87). Sin embargo el hecho de que parte de la Ga que se encuentra en la circulación proviene no solo del tubo digestivo sino también de la hipófisis permite consideraciones sobre las respuestas y reacciones en el binomio madre-hijo. Llama la atención que el recién nacido tiene una mayor concentración de Ga circulante en comparación con la que se encuentra en la circulación de la madre y en el líquido amniótico, es decir parece que el

feto tiene una capacidad de respuesta tanto a la deglución de líquido amniótico como, posiblemente, a estímulos neuroendocrinos que le llegan directamente a su eje hipotálamo-hipofisario. La concentración de Ga también guarda una relación con el grado de desarrollo gestacional ya que se encuentran diferencias entre el recién nacido a término y el prematuro. El amamantamiento produce un estímulo para la secreción de Ga tanto en la madre como en el niño, casi con una tendencia semejante a la que se observa en los estudios con la PRL, pero con una importante diferencia ya que en el lactante también se incrementa la Ga. Este último hallazgo sugiere que la succión del pezón y en forma secundaria el ingreso de la leche al tubo digestivo del niño estimula la secreción de Ga a través de dos vías: una directa y la otra neurogénica por el nervio vago (88). Finalmente, otra observación preliminar, que requiere verificarse es el hecho que encontramos en el recién nacido una mayor proporción de la forma Ga-17, que se sabe es la variante que se produce, en la mayor cantidad en el antro gástrico. En contraste, en la circulación materna predominó la variante Ga-34 que es la molécula que posee menor actividad biológica. Otro hallazgo en nuestro estudio y que necesita someterse a más condiciones experimentales es que en algunas situaciones de patología obstétrica consideradas como de estrés para el feto, se encuentra una mayor concentración de Ga. Es un conocimiento

que el estrés puede generar una mayor secreción de Ga, en variadas condiciones fuera del embarazo (89). La lactancia es una etapa especial que permite el estudio de la interrelación hormonal con otros sistemas del organismo, en particular con el sistema nervioso central ya que la interdependencia entre la madre y su recién nacido es definitiva para la supervivencia y mantención de la especie biológica (90-93).

Las conclusiones que se derivan de todos estos estudios presentados en la tesis pueden extenderse a otras áreas del conocimiento biológico. Los resultados, su interpretación y las hipótesis alternas que se deriven de ellos son una continuación de una línea de pensamiento que se ha venido persiguiendo en los últimos veinte años para contribuir al conocimiento de la fisiología de la lactancia, la infertilidad posparto y la participación activa del recién nacido en todo el proceso.

**"LOS CIENTIFICOS SON GENTE DE TEMPERAMENTOS
DISTINTOS HACIENDO COSAS DIFERENTES DE
MANERA DIFERENTE. ENTRE LOS CIENTIFICOS HAY
COLECCIONISTAS, CLASIFICADORES Y METICULOSOS
COMPULSIVOS; MUCHOS SON DETECTIVES POR
TEMPERAMENTO Y MUCHOS MAS EXPLORADORES;
ALGUNOS SON ARTISTAS Y OTROS ARTESANOS
TAMBIEN HAY POETAS-CIENTIFICOS Y FILOSOFOS-
CIENTIFICOS INCLUSO ALGUNOS MISTICOS"**

**PETER B. MEDAWAR (1915-1988)
THE ART OF THE SOLUBLE
LONDON: METAHUEN, 1967, p. 132**

REFERENCIAS

1. Roth J, Le Roith D, Shiloach J, Rosenzweig JL, Lesniak MA, Huarankova J: The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters and other extracellular chemical messengers. *New Eng J Med* (1982) 306:523
2. Medawar PB: Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol Med* (1953) 7:320
3. Starling EH: The Croonian lectures in the chemical correlation of the functions of the body. *The Lancet* (1905) 2:579
4. Stewart JM, Channabasavaiah K: Evolutionary aspects of some neuropeptides. *Federation Proc* (1979) 38:2302
5. Krieger DT, Martin JB: Brain peptides. *New Eng J Med* (1981) 304:876
6. Pearse AGE: Peptides in brain and intestine. *Nature* (1976) 262:92
7. Rehfeld JF, Schwarts TW, Stadil FS: Immunochemical status on macromolecular gastrin: evidences that big-big gastrin in blood and mucosa are truly present in same gastrinomas. *Gastroenterol* (1977) 73:469

8. Zárate A: El sistema neuroendocrino regulador de las funciones homeostáticas y metabólicas del organismo. *Ciencia* (1989) 40:11
9. Solcia E, Usellini L, Buffa R, Rindi G, Villani L, Zampatti C, Silini E: Endocrine cells producing regulatory peptides. *Experientia* (1987), 43:839
10. Kiefer KA, Malarkey WB: Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: experimental conditions that alter gel filtration patterns. *J Clin Endocrinol Metab* (1978) 46:119
11. Nyberg F, Roos P, Wide I: Human pituitary prolactin: isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Biochem Biophys Acta* (1980) 625:255
12. Wallis M: The molecular evolution of pituitary growth hormone prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J Mol Evol* (1981) 17:10
13. Suh HK, Frantz AG: Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab* (1974) 39:929

14. Pansini F, Bergamini CM, Malfaccini M, Cocilovo G, Linciano M, Jacobs M, Bagni B: Multiple molecular forms of prolactin during pregnancy in women. *J Endocrinol* (1985) 106:81
15. Le Roith D, Shiloach J, Roth J, Lesniak MA. Evolutionary origins of vertebrate hormones: substances similar to mammalian insulins are native to unicellular eukaryotes. *Proc Nat Acad Sci USA* (1980) 77:6184
16. Odell WD, Wolfsen AR: Hormones from tumors: are they ubiquitous?. *Am J Med* (1980) 63:317
17. Pankov YuA, Butnev VYu: Multiple forms of pituitary prolactin, a glycosylated form of porcine prolactin with enhanced biological activity. *Inter J Peptide Res* (1986) 28:113
18. Fraser IS, Guan Lun Z, Ping Zhou J, Herrington AC, McCarron G, Caterson I, Tan K, Markham R: Detailed assesment of big big prolactin in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab* (1989) 69:585
19. Champier J, Claustrat B, Sassolas G, Berger M: Detection and enzymatic deglycosylation of a glycosylated variant of prolactin in human plasma. *FEBS Letters* (1987) 212:220

20. Tanaka T, Yano H, Umezawa S, Shishiba Y, Okada K, Saito T, Hibi I: Heterogeneity of big big hPRL in hyperprolactinemia. *Hormone Res* (1987) 21:84
21. Philip DM, Rehfeld JF, Piers CE: Distribution and chromatographic characterization of gastrin and cholecystokin in the rat central nervous system. *Neurochem* (1984) 42:1523
22. Ginkel LA, Loeber JG: Heterogeneity of human luteinizing hormone. *Acta Endocrinol* (1987) 114:572
23. Sairam MR: Role of carbohydrates in glycoprotein hormone signal transduction. *FASEB J* (1989) 3:1915
24. Wilson CA, Leigh AJ, Chapman AJ: Gonadotropin glycosylation and function. *J Endocrinol* (1990) 125:3
25. Whitaker RG, Wilcox T, Lind T: Maintained fertility in patient with hyperprolactinemia due to big big prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* (1981) 53:863
26. Fonseca ME, Zárate A: The Significance of elevated levels of gastrin in patients with pituitary adenomas. *Clin Endocr* (1987) 27:403

27. Zárate A, Canales ES: Endocrine aspects of lactation and postpartum infertility. *J Steroid Biochem* (1987) 27:1023
28. Soria J, Canales ES, Forsbach G, Karchmer S, Guzmán V, Zárate A: Relationship of maternal, fetal and amniotic fluid prolactin levels. *Ann D'Endocrinol* (1977) 38:55
29. Zárate A, Canales ES, Alger M: The effect of pregnancy and lactation on pituitary prolactin secreting tumors. *Acta Endocrinol* (1979) 92:407
30. Riddle O, Bates RW, Dyreshorn SW: A new hormone of the anterior pituitary. *Proc Soc Exp Biol Med* (1932) 29:1211
31. Evans HM: The hypophyseal growth hormone: its separation from the hormones simulating the thyroid, gonads, adrenal cortex and mammary glands. *Assoc Rev Nerv Ment Dis* (1938) 17:175
32. Nicoli CS: Prolactin and growth hormone: specialists on one hand and mutual mimics on the other. *Perspectives Biol & Med* (1982) 25:369
33. Bates RW, Laanes T, Riddle O: Evidence from dwarf mice against the individuality of growth hormone. *Proc Soc Exp Biol Med* (1935) 33:446

34. Schooley JP, Riddle O, Bates RW: Replacement therapy in hypophysectomized juvenile pigeons. *Am J Anat* (1941) 69:128
35. Zipe WB, Payne AH, Kelch RP: Prolactin growth hormone and luteinizing hormone in the maintenance of testicular luteinizing hormone receptors. *Endocrinology* (1978) 103:595
36. Lewis UJ, Singh RNP, Bonewald LF: et al: Human growth hormone additional members of the complex. *Endocrinology* (1979) 104:1256
37. Villalobos H, Canales ES, Zárate A, Soria J, MacGregor C: Effect of prolactin suppression on gonadotrophic secretion in puerperium. *Acta Endocrinol* (1976) 83:236
38. Reyes FI, Winter JSD, Faiman C: Pituitary ovarian interrelationships during the puerperium. *Am J Obstet Gynec* (1972) 114:589
39. Martin RH: The place of PRL in human lactation. *Clin Endocr* (1983) 18:295
40. Delvoye P, Demaegd M, Uwayitu-Nyampeta, Robin C: Serum prolactin, gonadotropins and estradiol in menstruating and amenorrheic mothers during two years lactation. *Am J Obstet Gynec* (1978) 130:635

41. Howie PW, McNeilly AS, McArdle T, Smart L, Houston M: The relationship between suckling induced prolactin response and lactogenesis. *J Clin Endocr Metab* (1980) 50:670
42. Aono T, Shioji T, Shoda T, Kurachi K: The initiation of human lactation and prolactin response to suckling. *J Clin Endocr Metab* (1977) 44:1101
43. Zárate A, Villalobos H, Canales ES, Soria J, Arcovedo F, McGregor C: The effect of oral administration of thyrotropin releasing hormone on lactation.. *J Clin Endocr Metab* (1976) 43:301
44. Zárate A: Hiperprolactinemia. *Rev Iberoamericana Fertil* (1990) 7:176
45. Kleinberg DL, Noel GL, Frantz AG: Galactorrhea: a study of 235 cases, including 48 with pituitary tumors. *New Eng J Med* (1977) 296:589
46. Jeffcoate SL: Diagnosis of hyperprolactinemia. *Lancet* (1978) 2:1245
47. Del Pozo E, Broun de Re R, Varga L, Friesen HG: The inhibition of prolactin secretion in man by CB-154 (2-Br-alpha-ergocryptine) *J Clin Endocrinol Metab* (1972) 35:768

48. González-Colindres JA, Canales ES, Levinson G, Zárate A, Soria J: Efectividad terap(utica de la bromoergocriptina (CB.154, Sandoz) en pacientes con galactorrea. Rev Invest Clin (1975) 27:135
49. Archer DF, Nankin HR, Gabos PF, Maroom J, Nosetz S, Wadhwa SR, Josimovich JB: Serum prolactin in patients with inappropriate lactation. Am J Obstet Gynec (1974) 119:466
50. Grossman A, Basser GM: Prolactinomas. Brit Med J (1985) 290:182
51. Ben-Jonathan N: Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone. Endocrine Rev (1985) 6:564
52. Bjorklund A, Lindvall O, Nobin A. Evidence of an incerto-hypothalamic dopamine neuron system in the rat. Brain Res (1975) 89:29
53. Friesen HG: Human prolactin in clinical endocrinology: the impact of radioimmunoassays. Metabolism (1973) 22:1039
54. Jacobs LS, Maria IK, Daughaday WH: A mixed heterologous radioimmunoassay for human prolactin. J Clin Endocrinol Metab (1971) 34:484

55. Jeffcoate SL, Bacon RRA, Beastall GH, Diver MJ, Franks S, Seth J: Assays for prolactin: guidelines for the provision of a clinical biochemistry service. *Ann Clin Biochem* (1986) 23:638
56. Kauppila A, Kivinen S, Ylikorkala O: Metoclopramide increases prolactin release and milk secretion in puerperium without stimulating the secretion of thyrotropin and thyroid hormones. *J Clin Endocr Metab* (1981) 52:436
57. Soong YK, Ferguson KM, McGarrick G, Jeffcoate SL: Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in hyperprolactinemic serum. *Clin Endocrinol* (1982) 16:259
58. Allolio B, Hoepfner A, Leonhardt V, Deub U, Winkelmann W: Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in patients with prolactinoma. *Acta endocrinol* (1987) 114:475
59. Anderson AN, Pedersen H, Djursing H, Anderson BN, Friesen HG. Bioactivity of prolactin in a woman with an excess of large molecular size prolactin, persistent hyperprolactinemia and spontaneous conception. *Fertil Steril* (1982) 38:625
60. Andino N, Bidot C, Valdez M, Machado AJ: Chromatographic of circulating prolactin in ovulatory hyperprolactinemia. *Fertil Steril* (1985) 44:600

61. Larrrea F, Villanueva C, Cravioto MC, Escorza A, Del Real O: Further evidence that "big-big" prolactin is preferentially secreted in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *Fertil Steril* (1985) 44:25
62. Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB: Persistence of large molecular weight prolactin secretion during pregnancy in women with macroprolactinemia and its presence in fetal cord blood. *J Clin Endocrinol Metab* (1989) 68:1046
63. Markoff E, Lee DW: Glycosylated prolactin is a major circulating variant in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* (1987) 65:1102
64. Markoff E, Sigel MB, Lacour N, Seavey BK, Friesen HG, Lewis UJ: Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* (1988) 123:1303
65. Garnier PE, Aubert ML, Kaplan SL, Grumbach MM: Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: decreased affinity of "big" prolactin in a radioreceptor assay and evidence of its secretion. *J Clin Endocrinol Metab* (1978) 47:1273
66. Fonseca ME, Ochoa R, Zárate A: Diferentes formas moleculares de prolactina circulante en mujeres normales. *Rev Latinoamericana, Esteril Fertil* (1990) 4:6

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

67. Matsura S, Chen HC: A simple and effective solvent system for elution of gonadotropins from concanavalin A affinity chromatography. *Analytical Biochem* (1980) 106:402
68. Naill HD, Hogan ML, Tregear GW: The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormones. *Recent Prog Horm Res* (1973) 29:387
69. Guyda HJ: Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secreted in vitro: immunoassay and radioreceptor assay correlations. *J Clin Endocrinol Metab* (1975) 41:953
70. Zárate A, García IC, Morán C, Fonseca ME: Impaired glucose tolerance coincides with as normal release of growth hormone following a glucose load as well as response to TRH in acromegaly. *Horm Metab Res* (1986) 18:400
71. Rehfeld JF: Immunochemical studies on cholecystokinin II distribution and molecular heterogeneity in central nervous system and small intestine of man and dog. *Biol Chem* (1978) 253:4022
72. Bardram L, Lindholm J, Rehfeld JF: Gastrin in pituitary tumours. *Acta Endocrinol* (1987) 115:419

73. Rehfeld JF: Localization of gastrins to neuro and adeno-hypophysis. Nature (1978) 271:771
74. Pearse AGE: Peptides in brain and intestine. Nature (1976) 262:92
75. Zárate A, Fonseca ME, Morán C, Loyo M: The hormonal profile of hypophysial adenomas demonstrates the existence of the secretory interdependence of the pituitary cells. Arch Invest Med (1984) 15:317
76. Canales ES, García IC, Ruiz JE, Zárate A: Bromocriptine as prophylactic therapy in prolactinoma during pregnancy. Fertil Steril (1981) 36:524
77. Laurent TG, Killander J: A theory of gel filtration and its experimental verification. J Chromatogr (1964) 14:37
78. Morán C, Bonnet L, Herrera M, Zárate A: Elevated gastrin levels in maternal blood and amniotic fluid in pregnant women with preeclampsia and postdate gestation. Brain Gut Peptides and Reproductive Hormone Secretion, Washington State Unive. Pullman. Washington, June 18-19, (1989)
79. Euler AR, Byrne WJ, Cousins LM, Marvin EA, Leake RD, Walsh JH: Increased serum gastrin concentration and gastrin and

hyposecretion in the immediate newborn period. Gastroenterology (1977) 72:1271

80. Attia RR, Ebeid AM, Fischer JE, Goudsouzian NG: Maternal, fetal and placental gastrin concentrations. Anaesthesia (1982) 37:18
81. Markoff E, Lee DW, Hollingsworth DR: Glycosylated and nonglycosylated prolactin in serum during pregnancy. J Clin Endocrinol Metab (1988) 67:519
82. Kiefer KA, Malarkey WB: Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: experimental conditions that alter gel filtration patterns. J Clin Endocrinol Metab (1978) 46:119
83. Jackson RD, Wortsman J, Malarkey WB: Persistence of large molecular weight prolactin secretion during pregnancy in women with macroprolactinemia and its presence in fetal cord blood. J Clin Endocrinol Metab (1989) 68:1046
84. Stachura ME, Frohman LA: Growth hormone: independent release of big and small forms from rat pituitary in vitro. Science (1975) 187:449
85. Holst N, Jenssen TG, Burhol PG, Jorde R, Maltan JM, Hang E: Gut peptides in lactation. Brit J Obstet Gynaec (1986)

93:188

86. Sheard NF, Walker WA: The role of breast milk in the development of the gastrointestinal tract. Nutrition Rev (1988) 46:1
87. Grand RJ, Watkins JB, Torti FM: Development of the human gastrointestinal tract. Gastroenterol (1976) 70:790
88. Hayes JK, Ardill J, Kennedy TL, Shands RG, Duchaner KD: Stimulation of gastrin release by catecholamines. Lancet (1972) 1:819
89. Berson SA, Yalow RS: Nature of immunoreactive gastrin extracted from tissues of gastrointestinal tract. Gastroenterol (1971) 60:215
90. Euler AR, Amont ME, Walsh JH: Human newborn hypergastrinemia an investigation of prenatal and perinatal factors and their effect on gastrin. Pediat Res (1978) 12:652
91. Berger L, Henrichs I, Raptis S, Henize E, Jonatha W, Teller WM, Pfeitter EF: Gastrin concentrations in plasma of neonate at birth and after the first feeding. Pediatrics (1976) 58:264

92. Dokumou ST, Tarkolev N, Shterev AT, Istatkou M: Serum gastrin I concentrations of mother and newborn immediately after birth. *Brit J Obstet Gynaec* (1981) 88:126 *Gastroenterol* (1980) 9:567
93. Walsh JH, Laui SK: Physiology and pathology of gastrin. *Clin Gastroenterol* (1980) 9:567

AGRADECIMIENTOS

Por este conducto se expresa un agradecimiento muy especial al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por haber concedido los donativos: PCSACNA-050126, P219CCOL-880122 y P219CCOL-891949, con los cuales fue posible realizar en gran parte los experimentos que forman el fundamento de esta tesis. Asimismo, merecen reconocimiento el Sistema Nacional de Investigadores por las becas que fueron otorgadas al autor de la tesis y a sus colaboradores directos, en particular se debe hacer una mención al nuevo programa de estímulo para ayudantes de investigador. El Instituto Mexicano del Seguro Social ha creado un ambiente que propicia y fomenta investigaciones como la que constituye el núcleo de esta tesis.

También se agradece la asistencia secretarial de las señoritas Patricia Hernández y Guadalupe Sánchez así como la colaboración en el trabajo de cómputo por parte de la señora Lourdes Mayorga y del Actuario Julio Rangel.