

00562

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
FACULTAD DE QUIMICA



**DETECCION DE LA PROLACTINA 16K EN  
LA CIRCULACION E HIPOFISIS DE LA  
RATA**

Tesis profesional que para obtener el grado de

**Maestría en Ciencias Químicas  
(BIOQUIMICA)**

presenta la Q.F.B.

**María de la Luz Torner Aguilar**

Este trabajo fue apoyado por el CONACyT. Reg. No. 58243

Abril, 1993.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



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

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

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

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

## RESUMEN

El propósito de este trabajo fue el detectar la presencia endógena del fragmento amino terminal de 16,000 daltones de peso molecular de la PRL, la PRL 16K, mediante el uso de anticuerpos específicos generados contra la PRL 16K y técnicas de inmunotransferencia.

La prolactina (PRL) es una hormona proteica de 23 mil daltones de peso molecular producida principalmente por la adenohipófisis. Su efecto más conocido es la regulación de la producción de leche durante la lactancia, aunque posee más de 80 acciones fisiológicas distintas a través de todas las especies de vertebrados investigadas.

La diversidad funcional de la PRL se ha intentado explicar en función de su heterogeneidad molecular y/o la heterogeneidad de sus receptores. Existen diversas variantes moleculares de la hormona que son resultado de modificaciones postraduccionales de la misma. Asimismo sus receptores difieren en tamaño y localización en los distintos órganos blanco. De tal manera se ha propuesto que la multiplicidad de los efectos de la PRL podría resultar de la acción de sus variantes moleculares capaces cada una de producir efectos distintos y/o de los diversos receptores responsables de mediar efectos hormonales específicos.

La PRL 16K se origina a partir de la proteólisis y reducción de la PRL íntegra. Este fragmento no solo participa en la mediación de diversos efectos del tipo de PRL sino que posee relevancia funcional propia como regulador específico de la angiogénesis. La PRL 16K, pero no la PRL íntegra, inhibe la formación de vasos capilares nuevos tanto *in vivo* como *in vitro*. Este efecto específico sugiere la significancia de dicho fragmento hormonal como un nuevo factor antiangiogénico.

Aquí demostramos la presencia de una proteína de 16 kDa con inmunorreactividad de PRL en la circulación y la hipófisis anterior de ratas en diversos estadios fisiológicos. Sus niveles son variables aunque menores en general a los de la PRL 23K. Dado que la PRL 16K posee efectos propios mediados por receptores específicos, la demostración de su presencia endógena la convierte en un nuevo factor de regulación.

# INDICE

<b>I. INTRODUCCION.....</b>	<b>1</b>
<b>II. ANTECEDENTES GENERALES.</b>	
<b>A. CARACTERISTICAS MOLECULARES DE LA PROLACTINA.</b>	
1. Estructura general.....	3
2. Aspectos genéticos.....	4
<b>B. VARIANTES MOLECULARES DE LA PROLACTINA.....</b>	<b>4</b>
1. Agregados.....	5
2. Variantes glicosiladas.....	5
3. Formas desamidadas.....	6
4. Formas fosforiladas.....	7
5. Formas con cocientes bioensayo/radioinmunoensayo alterados. .	7
6. Formas proteolíticamente modificadas.....	8
6a. Variantes que resultan de la acción de kaliceína.....	9
6b. Prolactina cortada y fragmentos subsecuentes.....	9
<b>C. SITIOS DE PRODUCCION DE PROLACTINA.</b>	
1. Hipófisis anterior.....	10
1a. Producción y secreción de la prolactina a través del ciclo reproductor.....	10
1b. Regulación de la secreción de la prolactina.....	11
1b.i. Control inhibitorio de la secreción.....	12
1b.ii. Factores estimulatorios.....	13
1b.iii. Acciones de hormonas periféricas.....	13
2. Fuentes extrahipofisarias de secreción de PRL.....	14
2a. Prolactina uterina.....	14
2b. Prolactina cerebral.....	14
2c. Prolactina producida por células del sistema inmune.....	15
<b>D. DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LA PROLACTINA.</b>	
1. Multiplicidad de efectos.....	16
2. Receptores de PRL.....	18
2a. Heterogeneidad de los receptores.....	19
3. Mecanismos de acción de PRL.....	20

### **III. ANTECEDENTES INMEDIATOS.**

A. PROLACTINAS CORTADA Y 16K. ....	22
1. Estructura. ....	22
2. Sitios de producción. ....	23
3. Relevancia fisiológica. ....	24
B. PROLACTINA CORTADA. ....	25
1. Actividad biológica tipo PRL. ....	25
2. Actividad propia. ....	25
C. PROLACTINA 16K. ....	26
1. Actividad biológica tipo PRL. ....	26
1a. Unión de la PRL 16K a receptores de PRL. ....	26
2. Efectos propios. ....	27
2a. Receptores de PRL 16K. ....	28

### **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA. .... 30**

### **V. OBJETIVO. .... 30**

### **VI. MATERIAL Y METODOS.**

A. MATERIAL BIOLÓGICO ....	31
1. Animales. ....	31
2. Obtención de muestras. ....	31
B. METODOS. ....	31
1. Generación de la PRL 16K. ....	31
1a. Fracción enriquecida de las peptidasas específicas. ....	32
1b. Proteólisis de la PRL. ....	32
1c. Aislamiento de la PRL 16K. ....	32
2. Generación del anticuerpo anti-PRL 16K. ....	33
3. Electroforesis. ....	33
4. Electrotransferencia e inmunotinción. ....	33
5. Ultrafiltración. ....	34
6. Autorradiografías. ....	34
7. Yodación. ....	34
8. Radioinmunoensayo (RIA). ....	35

## **VII. RESULTADOS.**

A. PUREZA Y CUANTIFICACION DEL ESTANDAR DE PRL 16K. ....	36
B. ANALISIS DEL SISTEMA DE INMUNOTRANSFERENCIA UTILIZADO. .36	
C. DETECCION DE LA PRL 16K ENDOGENA. ....	39
1. En la circulación. ....	39
1a. Antisero anti-PRL 23K. ....	39
1b. Anticuerpo contra PRL 16K. ....	41
1bi. Especificidad del anticuerpo contra PRL 16K. ....	41
1bii. PRLs detectadas por el anti-PRL 16K en la circulación. . . . .	43
1biii.Efecto de la incubación de la sangre sobre la PRL 16K detectada en el suero. ....	50
D. DETECCION DE LA PRL 16K EN LA HIPOFISIS ANTERIOR. ....	52

## **VIII. DISCUSION. ....58**

## **IX. CONCLUSIONES. .... 62**

## **X. BIBLIOGRAFIA. ....63**

## I. INTRODUCCION

La prolactina (PRL) es una hormona proteica de 23 mil daltones de peso molecular producida principalmente por la adenohipófisis. Su efecto más conocido es la regulación de la producción de leche durante la lactancia, aunque posee más de 80 acciones fisiológicas distintas a través de todas las especies de vertebrados investigadas.

La diversidad funcional de la PRL se ha intentado explicar en función de su heterogeneidad molecular y/o la heterogeneidad de sus receptores. Existen diversas variantes moleculares de la hormona que son resultado de modificaciones postraduccionales de la misma. Asimismo sus receptores ya han sido clonados y mostrado que difieren en tamaño y localización en los distintos órganos blanco. De tal manera se ha propuesto que la multiplicidad de los efectos de la PRL podría resultar de la acción de sus variantes moleculares capaces cada una de producir efectos distintos y/o de los diversos receptores responsables de mediar efectos hormonales específicos.

La primera vez que se asignó una función específica a una variante molecular de PRL fue en 1980, cuando se mostró que el fragmento amino terminal de 16,000 daltones de peso molecular de la PRL, o PRL 16K estimulaba la proliferación del epitelio mamario en concentraciones significativamente menores a las de la PRL íntegra. De tal forma se propuso que la PRL 16K podría ser la responsable de mediar los efectos mitogénicos de la PRL. Si bien no se ha confirmado la mayor potencia mitogénica de la PRL 16K, estudios recientes han mostrado que la PRL 16K no sólo participa en la mediación de diversos efectos tipo PRL sino que posee relevancia funcional propia como regulador específico de la angiogénesis. La PRL 16K, pero no la PRL íntegra, inhibe la formación de vasos capilares nuevos tanto *in vivo* como *in vitro*. Este efecto específico sugiere la significancia de dicho fragmento hormonal como un nuevo factor endógeno de regulación.

Ahora bien, la presencia endógena de la PRL 16K no ha sido dilucidada. Diversas evidencias experimentales han mostrado que la forma molecular precursora de PRL 16K, o "PRL cortada" está presente en la hipófisis y circulación de distintas especies y que las enzimas capaces de generarla están presentes en los órganos blanco de la hormona. La detección de la PRL 16K por los métodos convencionales (radioinmunoensayo, inmunoprecipitación) se encuentra limitada dada su baja inmunoreactividad al anticuerpo contra la PRL 23K.

El propósito de este trabajo fue el detectar la presencia de la PRL 16K endógena mediante el uso de anticuerpos específicos generados contra la PRL 16K.

A continuación se presenta una revisión de aspectos relevantes en relación a las características estructurales de la PRL y sus variantes moleculares. Se señalan sus sitios de producción, su diversidad funcional y los mecanismos propuestos en la mediación de sus efectos. Asimismo se describen brevemente los estudios que señalan la significancia funcional de la PRL 16K, y que son los antecedentes inmediatos de este estudio.

## II. ANTECEDENTES GENERALES:

### A. CARACTERISTICAS MOLECULARES DE LA PROLACTINA.

#### 1. ESTRUCTURA GENERAL.

La prolactina (PRL) es una proteína que consiste de una cadena polipeptídica de más o menos 200 aminoácidos según la especie, y un peso molecular de 23,000 daltones. La primera PRL aislada fué la PRL ovina, la cual ha sido ampliamente caracterizada (1). Las prolactinas de las diferentes especies animales comparten un alto grado de homología en su secuencia de aminoácidos. Los porcentajes de secuencias idénticas de la PRL humana comparada con las prolactinas ovina, de pollo y de rata son de 73,73 y 60 % respectivamente (2).

En su forma nativa, la PRL contiene 6 residuos de cisteína, los que se unen entre sí formando 3 enlaces disulfuro (-S-S-) y tres asas de aminoácidos: dos asas menores en los extremos amino y carboxilo, y un asa mayor, intermedia. En la PRL de rata, los enlaces disulfuro se encuentran en los residuos 4 y 9 formando el asa amino terminal, 56 y 172 en el enlace central y 189 y 197 en el asa carboxilo terminal (3). De este modo, las dos asas pequeñas amino y carboxilo terminal constan de 4 y 7 residuos de aminoácidos respectivamente, y el asa mayor de 115 residuos (3,4) (Figura 1).

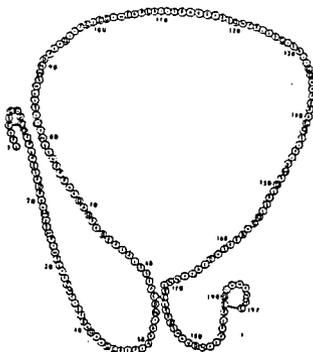


Fig. 1.- Estructura de la prolactina de rata.

## 2. ASPECTOS GENETICOS.

La PRL comparte secuencias de aminoácidos tanto con la hormona de crecimiento (GH) así como con el lactógeno placentario (PL), constituyendo una familia de hormonas peptídicas relacionadas estructural y funcionalmente (5). Los tres grupos hormonales tienen un tamaño similar (190-199 aminoácidos entre diversas especies) y presentan estructuras proteicas similares, compartiendo un 20-85 % de homología dependiendo de las especies comparadas (5,6). Por estos y otros datos se ha llegado a la hipótesis de que estas tres hormonas pudieron originarse mediante la duplicación de un gen ancestral común (6).

El gen de PRL existe como una copia única en las diversas especies estudiadas tales como la rata, el bovino y el humano (7). Se localiza en el cromosoma 17 en la rata (8) y en el cromosoma 6 en el humano (9). En general el gen de PRL abarca aproximadamente 10 kilobases (kb) de DNA y consiste de 5 exones separados por 4 grandes intrones (7).

Se ha propuesto que los exones pudieran codificar regiones peptídicas responsables de actividades biológicas discretas, puesto que al eliminar el exón III de la PRL se disminuyen en 87 % sus propiedades de unión al receptor. Asimismo se han localizado sitios antigénicos en el exón IV y el exón V que pudieran conferir estabilidad conformacional a la molécula de PRL (10).

## B. VARIANTES MOLECULARES DE LA PROLACTINA.

Aunque la PRL ovina fue aislada hacia 1930, no fué sino al inicio de la década de los 70's que se aisló y caracterizó a la PRL humana (2). El desarrollo de las técnicas de radioinmunoensayo (RIA) propició la detección de formas moleculares de PRL con diferentes propiedades inmunológicas. Posteriormente otras técnicas analíticas han incrementado el conocimiento de una serie de variantes moleculares de PRL. Como se mencionó, se conoce sólo un gen que codifica para PRL y se postula que las variantes moleculares descritas son el resultado de modificaciones postraduccionales de la molécula. Dichos cambios involucran mecanismos de depleción-transformación previos a la exocitosis (11). Estos eventos tendrían por objeto regular la disponibilidad de la hormona en forma liberable, y permitir las modificaciones estructurales de la misma dando lugar a formas con

diversas actividades biológicas. A la vez, se les ha asociado con un aumento en la estabilidad de la hormona. Las variantes moleculares de la PRL son las siguientes:

## 1. AGREGADOS.

Los agregados son formas poliméricas de PRL formadas mediante uniones no covalentes, o bien por uniones de enlaces disulfuro (12). Su presencia se ha asociado con mecanismos de intercambio tiol-disulfuro previos a la secreción de la prolactina (13). De este modo, las moléculas de PRL almacenadas en los gránulos serían en principio reducidas y posteriormente reoxidadas de manera cruzada dando origen a formas de alto peso molecular.

Inicialmente se describió la presencia de agregados de diferentes pesos moleculares de PRL en extractos de adenohipófisis de humano y de rata (14,15) mediante técnicas de cromatografía por filtración en gel y RIA. Así se describieron un agregado denominado PRL grande-grande (big-big), con un peso molecular de aproximadamente 80 a 100 kDa, otro llamado PRL grande (big) de 45-50 kDa, y la PRL pequeña (little) de 23 kDa correspondiente a la forma monomérica y que constituye del 80-90 % de la PRL inmunoreactiva. Estas variantes han sido descritas también en el suero de humanos normales y en pacientes con prolactinoma, así como en mujeres embarazadas (14, 16-19). Al parecer la PRL grande-grande está constituida principalmente de agregados unidos no covalentemente mientras que la PRL grande por dímeros, algunos de ellos unidos mediante enlaces disulfuro (12).

Pese a la enorme literatura que reporta su presencia, aún se desconoce su significancia fisiológica. Los dos tipos de agregados poseen una actividad mucho menor a la PRL monomérica en ensayos de radioreceptor. De tal manera, en muestras de suero el cociente radioreceptor/RIA para PRL grande-grande, PRL grande y PRL pequeña es de 0.27, 0.56 y 1.98 respectivamente (20). En el bioensayo específico para PRL de las células del linfoma Nb<sub>2</sub> se demostró que la PRL grande-grande tiene una actividad biológica mucho menor a la de la PRL monomérica (18).

Por otra parte, se ha observado que mujeres con hiperprolactinemia y ovulaciones normales poseen niveles elevados de PRL grande-grande mientras que sus niveles de PRL monomérica son normales, lo que sugiere que la PRL grande-grande podría poseer una actividad biológica muy pequeña (14). En sujetos normales se considera que menos del 20 % de la PRL sérica está constituida por formas de alto peso molecular (21). Estos agregados no son resultado de artefactos en el procesamiento de las muestras biológicas (12).

## 2. VARIANTES GLICOSILADAS.

Lewis fue el primero en aislar una forma de PRL de la hipófisis conteniendo una entidad de carbohidrato (22) y un peso molecular de 25,000 Da. El carbohidrato es un oligosacárido de composición (N-acetilglucosamina)<sub>2</sub> (manosa)<sub>2</sub> (fucosa)<sub>1</sub>, unido por un enlace de una N-acetilglucosamina a la asparagina 31, dentro de una secuencia Asn-X-Ser en la que X corresponde a algún otro aminoácido, frecuentemente Leu o Thr (23).

La PRL glicosilada tiene sólo un tercio de la inmunoreactividad de la PRL no glicosilada (22). Su actividad biológica es menor a la de la hormona no glicosilada: posee 80 % de la bioactividad de la PRL ovina en el bioensayo de glándula mamaria de ratón, 20 % en ensayos de radioreceptor y 24% en el bioensayo de las células del linfoma Nb<sub>2</sub> (22,24,25) por lo que en general se considera que la PRL glicosilada posee entre 30 - 40 % de la bioactividad de PRL.

Está presente en el suero de humanos (26,27) y diversas especies (28,29), en cantidades considerables (30 % de la PRL circulante), y se ha observado que varía la proporción entre PRL no glicosilada y glicosilada en los diferentes estados fisiológicos. En la hipófisis, el contenido total de PRL se estima entre 8 - 15 % (22). Dado que se ha establecido que esta forma glicosilada se metaboliza más lentamente que la forma no glicosilada de PRL (30) y que la proporción entre las PRLs glicosilada y no glicosilada puede variar dependiendo del estado fisiológico (26,27) se ha propuesto que la glicosilación podría participar en la regulación de su potencia hormonal. Sin embargo no se ha determinado con certeza su relevancia fisiológica.

## 3. FORMAS DESAMIDADAS.

Se han descrito tres isoformas desamidadas de PRL. Estas isoformas poseen una inmunoreactividad muy disminuída con respecto a la molécula original. De acuerdo a Graf (31) la asparagina en la posición 10 es la que sufre más fácilmente la desamidación, y puede ser responsable de la principal forma desamidada de PRL. También se desconoce el significado funcional de esta modificación. Se ha sugerido que la desamidación pudiera representar un paso en el proceso de degradación de la PRL (32). Asimismo dado que estas variantes desamidadas poseen una capacidad reducida para unirse a su receptor membranar, se ha propuesto a la desamidación como un mecanismo regulatorio de su acción biológica a nivel del receptor (33).

#### 4. FORMAS FOSFORILADAS.

Se ha observado que existen varias isoformas de PRL con diferentes movilidades electroforéticas capaces de ser separadas por sus diferencias de carga (32). Estas diferencias de carga pudieran deberse a la fosforilación de uno o más residuos de aminoácidos de la hormona. La secuencia primaria de la PRL de rata revela la presencia de 24 residuos potencialmente fosforilables (16 residuos de serina y 8 de treonina) por diversas proteínas cinasas presentes en las células. Existe un sólo trabajo donde se ha demostrado la capacidad de la PRL de rata de ser fosforilada tanto *in vitro* como *in vivo* (34). Recientemente sin embargo se demostró la fosforilación *in vitro* de la PRL de diversas especies (ovina, de rata, de pollo y de pavo) mediante su incubación con proteína cinasa A, y la correspondiente alteración en la carga molecular (35). La significancia fisiológica de la fosforilación es desconocida. Es posible que este evento pudiera tener efectos sobre las acciones biológicas de la hormona. A este respecto se demostró recientemente que la desfosforilación de estándares de PRL de rata produce un incremento en su actividad promotora del crecimiento (36).

#### 5. FORMAS CON COCIENTES BIOENSAYO / RADIOINMUNOENSAYO ALTERADOS.

La validez del radioinmunoensayo (RIA) para medir a la hormona biológicamente activa se ha criticado repetidamente mediante la comparación de las determinaciones inmunológicas con las mediciones resultantes de los diversos bioensayos (BA) de PRL (37). En varios casos ha habido una buena correlación, sin embargo en muchos otros la correlación es pobre y apunta hacia la existencia de formas de PRL bioactivas con inmunorreactividad reducida. En preparaciones puras de la hormona la correlación BA/RIA observada es casi perfecta (37), sin embargo, en extractos de adenohipófisis en un estado de secreción dinámico la correlación BA/RIA es en general muy pobre (37,38, 39). En suero también se ha mostrado una baja correlación BA/RIA, determinándose que el RIA detecta sólo el 25% de la hormona biológicamente activa (40). Asimismo en el suero los ensayos de radioreceptor detectan 3.5 veces más PRL que la detectada mediante el RIA (41).

La formación de variantes bioactivas de PRL con inmunodetectabilidad reducida puede ocurrir como resultado del procesamiento periférico de la hormona en sus diversos órganos blanco.

Asawaroengchai (42) mostró que la incubación de la PRL con explantes de hígado, riñón y glándula mamaria se asociaba con un incremento en la actividad biológica de la hormona y de una pérdida de su inmunoactividad. Asimismo, el procesamiento de la hormona por fracciones subcelulares de algunos de sus órganos blanco genera una variante, la PRL cortada, la cual posee menor actividad inmunológica (alrededor del 50 %) que la hormona intacta aunque su actividad biológica es similar (43).

Por otra parte, Mena y cols (11,13) han mostrado que la PRL que se almacena en los gránulos de los lactotopos previa a ser secretada, sufre un proceso de transformación reversible que involucra un proceso de intercambio tiol-disulfuro. Así, la PRL pasa de una forma detectable a una indetectable, y finalmente recupera su detectabilidad durante la secreción. Este proceso podría estar involucrado en la formación de diversas variantes con cocientes BA/RIA alterados.

En cuanto a la naturaleza química de las formas de PRL con cocientes BA/RIA altos, éstas se han asociado con variantes de pesos moleculares diversos: formas de peso molecular medio (de 22 a 65 kDa) y variantes de 31, 20 y 14 kDa de peso molecular, las cuales poseen poca o nula inmunorreactividad detectada por RIA. Estas variantes pueden ser producidas y secretadas por la adenohipófisis (44-46). Asimismo diversos estudios han mostrado la presencia de variantes de 97,45,34,31,29,25,22,21,17,16 y 8 kDa (13,47-54), tanto en homogenados como en medios de cultivo de adenohipófisis de rata. En uno de ellos (51), la mayor parte de la bioactividad se encontró en el rango de 24-17 kDa, más del 40 % de la inmunorreactividad total se recuperó del rango de 97 - 34 kDa, y 30 % de ésta se asoció a la región del monómero.

El consenso general de la enorme serie de estudios describiendo a estas variantes es que todas ellas poseen actividad de prolactina considerándose que cambios en su secreción podrían desencadenar efectos biológicos no explicables por los niveles inmunodetectables de la hormona.

## 6. FORMAS PROTEOLITICAMENTE MODIFICADAS.

Existen variantes de PRL que resultan de la proteólisis de la hormona por diversas enzimas. En algunos casos su relevancia fisiológica es desconocida, sin embargo en otros, ciertas formas de PRL además de compartir algunos efectos de esta hormona poseen relevancia funcional propia.

## 6a) VARIANTES QUE RESULTAN DE LA ACCION DE KALICREINA.

La kalikreína es una proteasa de serina, la cual es capaz de generar en el plasma péptidos vasoactivos llamados cininas a partir de sus precursores inactivos, los cininógenos (55). Esta enzima está presente en la hipófisis anterior e intermedia (56) y es susceptible de ser regulada por estrógenos (57) y dopamina (58). Mediante estudios *in vitro*, se ha observado que esta enzima es capaz de procesar a la PRL íntegra en una reacción dependiente de tioles. Los tioles promueven cambios conformacionales en la PRL hacia formas que son sustratos de la kalikreína, originándose varios fragmentos de 21 y 22 kDa. El corte ocurre hacia el extremo carboxilo terminal y da origen a tres prolactinas, cuyos sitios de corte son los aminoácidos 174, 185 y 188 respectivamente (59). Algunos estudios *in vivo* han mostrado la presencia de variantes de PRL de 21-22 K en extractos de adenohipófisis, así como en sus medios de cultivo (51,60,61). Estas variantes son afectadas por algunos agentes que alteran la secreción de la PRL, tales como los estrógenos (60,61), por lo que se les ha propuesto como candidatos para la mediación de las acciones biológicas de PRL y/o que pudieran tener actividad biológica propia. Sin embargo hasta el momento se desconoce su relevancia fisiológica.

## 6b) PRL CORTADA Y FRAGMENTOS SUBSECUENTES.

Mitra demostró que la hipófisis de rata contenía una variante de PRL con un corte en el asa larga disulfuro, a la que denominó PRL cortada (62). La reducción de la variante cortada genera 2 fragmentos, uno amino terminal de 16 kDa (PRL 16K) y otro carboxilo terminal de 7 kDa. La PRL cortada se ha descrito presente en la hipófisis de humanos (63) y otras especies (62,64), así como en el plasma (63), y puede generarse en los órganos blanco de la hormona tales como la glándula mamaria, la próstata, el cerebro, el hígado, el riñón, etc. (43,65). Tanto la PRL cortada como la PRL 16K poseen efectos biológicos de PRL íntegra (54). Su inmunoreactividad de PRL es reducida por lo que podrían contribuir a las variantes de BAVRIA alto antes descritas. Por otra parte, la PRL 16K posee efectos propios como un potente factor antiangiogénico, ya que inhibe la formación de vasos capilares nuevos (66). Este efecto no lo tienen ni las PRLs 23K íntegra ni la cortada. La PRL 16K podría constituir en sí misma un nuevo factor de regulación. El análisis de la producción endógena de la PRL 16K es el motivo de esta

tesis y por lo tanto una revisión más detallada de estas variantes proteólicamente modificadas se presenta en secciones posteriores.

## **C. SITIOS DE PRODUCCION DE PROLACTINA.**

### **1. HIPOFISIS ANTERIOR.**

Es bien conocido que la prolactina es producida en la hipófisis anterior (AH), por células especializadas denominadas lactotrofos. Los lactotrofos pueden ser identificados por sus características morfológicas muy distintivas, tales como el patrón laminar y a menudo concéntrico del retículo endoplásmico rugoso y la forma irregular y tamaño de sus gránulos secretorios cuyo diámetro varía entre los 130 y 900 nm (67). Su distribución es homogénea a través de la AH, formando en ocasiones acúmulos de 5 a 10 células. Actualmente, se estima que los lactotrofos constituyen entre el 40 y 50 % de todas las células de la adenohipófisis, tanto en machos como en hembras (67). Los lactotrofos han sido identificados en las adenohipófisis de todas las clases de vertebrados estudiados (68).

#### **1a) PRODUCCION Y SECRECION DE PRL A TRAVES DEL CICLO REPRODUCTOR.**

El número y actividad secretora de los lactotrofos varía de acuerdo a las condiciones fisiológicas y es función de la acción de estímulos endógenos (hormonas esteroides) y exógenos (estimulación del cérvix uterino, succión de las crías durante la lactancia, etc.). Estas variaciones en la actividad secretora de PRL hipofisiaria se traducen en cambios en sus niveles circulantes.

El número de lactotrofos y concentración adenohipofisiaria de PRL es mayor en la hembra que en el macho de las distintas especies estudiadas (67). A la vez, los niveles circulantes de PRL son mayores en la hembra desde el comienzo de la función cíclica ovárica, y responden a un patrón de secreción determinado. En la rata, este patrón de secreción se caracteriza por un aumento marcado de PRL durante la tarde y noche del proestro (69). Este aumento de los niveles de PRL durante el ciclo estral se ha correlacionado con un incremento previo en los estrógenos circulantes (69). Asimismo en la mujer, la PRL circulante aumenta levemente durante la fase folicular, y alcanza un pico máximo durante el periodo periovulatorio (70).

Existen otros estímulos exógenos capaces de promover la secreción de PRL, con la consiguiente elevación de sus niveles sanguíneos. La estimulación del cérvix uterino induce la secreción de PRL a manera de picos bifásicos nocturno y diurno durante la primera mitad del embarazo (69-72). Justo en el momento del parto ocurre un aumento significativo en la concentración de prolactina plasmática (71) que se ha propuesto como consecuencia del incremento en los estrógenos y la disminución de la progesterona circulantes.

La secreción de PRL durante la lactancia está sujeta a la acción de estímulos provenientes de las crías entre las cuales el principal es el estímulo de la succión del pezón. La succión de las crías provoca la activación de reflejos neuroendócrinos que traen consigo la secreción adenohipofisaria de PRL así como de las demás hormonas involucradas en el proceso de secreción láctea (hormona adrenocorticotrófica ó ACTH, hormona estimulante del tiroides ó TSH y hormona de crecimiento ó GH) y de la ocitocina neurohipofisaria (73). La ocitocina estimula la contracción de las células mioepiteliales que recubren los alveolos y los conductos mamarios, provocando la elevación de la presión intraglandular que da lugar a la evacuación de leche. La frecuencia de la succión por las crías juega un papel determinante sobre la actividad secretora de la hipófisis, y por consiguiente, en el funcionamiento secretor de la glándula mamaria. En diversas especies, la menor frecuencia de succión observada hacia el final del ciclo contribuye a la declinación eventual de la función, mediante la reducción de la actividad secretora de la hipófisis y de la glándula mamaria (74). Otro de los estímulos exógenos capaz de estimular la secreción de PRL durante la lactancia es la estimulación exteroceptiva proveniente de las propias crías. Esta estimulación comprende estímulos olfatorios, auditivos y visuales (73).

#### 1b) REGULACION DE LA SECRECION DE LA PROLACTINA.

La secreción de prolactina está sujeta a un control hipotalámico complejo donde participan tanto factores estimulatorios como inhibitorios. La conexión anatómica entre la eminencia media y la hipófisis anterior es crítica para el mantenimiento del control de su secreción. Las lesiones de la eminencia media, la transección del tallo hipofisario y los trasplantes de hipófisis en la cápsula renal inducen un aumento marcado en la síntesis y secreción adenohipofisaria de PRL (75). De esta manera se ha llegado a la conclusión de que la producción y secreción de PRL por los lactotopos se encuentra predominantemente bajo una inhibición hipotalámica tónica que mantiene el control de su actividad. A la vez, los efectos directos sobre los lactotopos de los

factores hipotalámicos inhibitorios y estimulatorios son modificados por hormonas "periféricas" que llegan a la hipófisis anterior vía la circulación sistémica (75).

#### 1.b.i) Control inhibitorio de la secreción.

La dopamina (DA) es el principal inhibidor de la liberación de PRL. Esta bioamina se produce en neuronas tuberoinfundibulares específicas localizadas en los núcleos arqueado y periventricular del hipotálamo y se libera a los vasos del sistema portal hipotálamo-hipofisiario (76). La DA regula la secreción de PRL tanto mediante su unión a receptores dopaminérgicos del tipo  $D_2$  en los lactotrofos, así como por su disociación de los mismos (77). Estos receptores se encuentran acoplados negativamente al sistema adenilato ciclasa. La concentración de DA en la sangre portal es suficiente para ocupar aproximadamente el 80 % de los receptores  $D_2$  dopaminérgicos presentes en la hipófisis anterior (75) siendo proporcional el grado de inhibición de la secreción de la PRL a la ocupación de los receptores.

La disminución de los niveles portales de DA resultan en una rápida disociación de la DA de su receptor y la consecuente activación de múltiples vías de segundos mensajeros que a su vez estimulan la secreción de PRL durante el tiempo que permanece disminuida la DA (77). Se ha observado que durante períodos de estimulación fisiológica de la secreción de PRL tales como durante lactancia en respuesta a la succión (78), la tarde del proestro (79) y durante el último día del embarazo (80) ocurre una disminución transitoria de la dopamina portal (3 - 10 min) previa a la secreción de PRL. Se ha sugerido que esta disminución de la concentración de la DA portal podría ser una señal necesaria para la liberación de grandes cantidades de PRL en coordinación con otros factores estimulatorios (77).

Además de la DA, existen otros factores hipotalámicos con actividades inhibitorias. El ácido gamma amino butírico (GABA) reduce la liberación de PRL mediante su unión a receptores GABAérgicos presentes en los lactotrofos, pero sólo a concentraciones altas (75,81). La somatostatina es capaz de inhibir la secreción basal o estimulada de PRL aunque este efecto requiere de la presencia de estrógenos (75). También se ha sugerido que la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) pudiera inhibir la secreción de PRL aunque se requieren más estudios al respecto (81).

### 1.b.ii) Factores estimulatorios.

Dentro de los factores que estimulan la liberación de PRL se encuentran la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (75).

La TRH ejerce su acción directamente a través de su unión a receptores específicos en los lactotrofos activando, al parecer, el sistema de  $Ca^{++}$ /proteína cinasa C (82). Sus niveles en la sangre portal se incrementan previos a una secreción elevada de PRL, como la observada durante la tarde del proestro y en respuesta al estímulo de la succión (83). En la rata lactante la succión de las crías induce una liberación potenciada de PRL en respuesta a la TRH, que se ha asociado con la suspensión inicial transitoria del tono dopaminérgico (84). El estudio de estos efectos ha llevado a la hipótesis de que el escape transitorio de la acción tónica inhibitoria de la DA induce el incremento en la responsividad de los lactotrofos a la TRH (77).

El VIP estimula la secreción de PRL mediante receptores específicos presentes en los lactotrofos, los cuales se encuentran acoplados positivamente a la adenilato ciclasa (77), y se ha sugerido que el VIP podría ejercer una acción moduladora sobre otros factores reguladores de la secreción de PRL (75). Otros factores estimuladores de la secreción de la PRL son la serotonina, angiotensina II, neurotensina y bombesina (75).

### 1.b.iii) Acciones de hormonas periféricas.

Los estrógenos estimulan la secreción y síntesis de PRL. Su acción se ejerce directamente sobre los lactotrofos, a través de estimular su proliferación (85) y la síntesis y traducción del RNA mensajero de PRL (86). Asimismo los estrógenos pueden estimular indirectamente la actividad secretora de los lactotrofos mediante la modulación de su regulación hipotalámica (75). Entre los mecanismos propuestos para este efecto indirecto se ha observado que los estrógenos reducen la concentración de DA en la sangre portal (81), interfieren con la internalización de la DA por los lactotrofos y con la unión de la DA a su receptor (75,81). Asimismo los estrógenos incrementan el número de receptores a la TRH (77). De tal manera, se ha observado que el tratamiento prolongado con estrógenos se traduce en la hipertrofia e hiperplasia de los lactotrofos y el consecuente incremento en los niveles circulantes de PRL. Estos cambios en ocasiones se acompañan de la generación de tumores adenohipofisarios secretores de prolactina o prolactinomas (75).

Otras hormonas capaces de modificar la regulación hipotalámica de la secreción de PRL son las hormonas tiroideas, los glucocorticoides y las catecolaminas (75).

## 2. FUENTES EXTRAHIPOFISIARIAS DE SECRECIÓN DE PRL.

Recientemente se ha demostrado que la PRL puede ser sintetizada por diversos tejidos extrahipofisarios entre los que se encuentran la decidua uterina, el cerebro y ciertas células del sistema inmune.

### 2a) PRL UTERINA.

Durante los primeros días del embarazo, las células estromáticas del endometrio uterino sufren una serie de modificaciones que acompañan su crecimiento y diferenciación en deciduales a consecuencia de su interacción con el embrión (71). La decidua uterina produce una proteína cuya estructura molecular y actividad biológica es la misma que la de la forma molecular predominante de la PRL hipofisaria (87,88). Sin embargo, la PRL decidual está codificada por un gen con una región promotora ligeramente diferente a la del gen que codifica para la PRL adenohipofisaria. El ARN mensajero de la PRL uterina posee un sitio de comienzo de la transcripción diferente localizado varias kilobases hacia el extremo 5' (alrededor de 150) que el sitio de iniciación del ARN mensajero para la PRL de la HA (89). El tener una región promotora diferente determina una regulación diferencial de su expresión (71). Se ha propuesto que la PRL decidual podría estar involucrada en el proceso de implantación y desarrollo del feto. Asimismo su producción se ha asociado con el mantenimiento del cuerpo lúteo del embarazo y la tonicidad del fluido amniótico (71).

Además de la decidua, el endometrio uterino produce una proteína con inmunoreactividad y actividad biológica de PRL (90). El ARN mensajero que codifica para la PRL del miometrio es similar al de la PRL decidual (90). Sin embargo, el papel fisiológico de la PRL miometrial es desconocido.

### 2b) PRL CEREBRAL.

Diversas evidencias apoyan la producción de PRL por el sistema nervioso central. Inicialmente, estudios inmunohistoquímicos revelaron la presencia de un antígeno tipo PRL en neuronas localizadas en varios núcleos hipotalámicos a saber: arqueado, dorsomedial, y

ventromedial, la región periventricular y el área preóptica (91,92). Si bien los cuerpos neuronales positivos residen en el hipotálamo se han descrito procesos neuronales con inmunoreactividad de PRL en otras áreas del cerebro tales como cerebelo, tálamo, tallo cerebral (puente y médula), hipocampo, corteza cerebral y núcleo caudado (93,94). La caracterización por radioinmunoensayo de extractos hipotalámicos confirmó la presencia de una molécula con inmunoreactividad de PRL capaz de ejercer efectos mitogénicos en un bioensayo específico de la hormona (94,95). La PRL hipotalámica es sintetizada y almacenada en una poza liberable mediante despolarización a través de un proceso dependiente de calcio (95).

La PRL cerebral, al igual que la hipofisiaria, presenta cierta heterogeneidad molecular. Se han identificado además de la forma molecular predominante de 23 kDa, la PRL cortada y fragmentos de menor peso molecular (16 y 12 kDa) (96).

Hacia 1984 se describió la presencia de un ARN mensajero para PRL en el hipotálamo, mediante técnicas de hibridización con ADN complementario (97). Recientemente, mediante las técnicas de amplificación del mensajero (PCR) el grupo de Emanuele (98) ha confirmado la existencia del ARNm para PRL en hipotálamo y cerebro el cual es similar al de la HA. Asimismo, se observó la presencia de otro ARNm de PRL más pequeño, el cual carece del exón 4 y que podría surgir de un corte alternativo del mensaje original (98).

## 2c) PRL PRODUCIDA POR CELULAS DEL SISTEMA INMUNE.

Las células del sistema inmune son capaces de producir moléculas del tipo de PRL. Inicialmente se observó que los esplenocitos de ratón producían proteínas que estimulaban la proliferación de células blanco de PRL (linfoma Nb<sub>2</sub>), y que este efecto era neutralizado mediante anticuerpos contra PRL (99).

Se han caracterizado diversas variantes con inmunoreactividad de PRL y pesos moleculares variables. En timocitos, esplenocitos y linfocitos de ratón se producen PRLs de 22 kDa (100) y 46 kDa (101). Asimismo los linfocitos humanos sintetizan y secretan moléculas tipo PRL de 24, 27 y 11 kDa (109,103), y en células humanas de linfomas se produce una de 29 kDa (104). Estudios recientes demostraron la presencia de ARNs mensajeros para PRL del tamaño normal y de un tamaño ligeramente mayor (más de 380 bases) en esplenocitos y timocitos de ratón (102, 103). Se ha propuesto que los efectos inmunomoduladores de la PRL podrían deberse en parte a la PRL producida localmente (105).

## D. DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LA PRL.

### 1. MULTIPLICIDAD DE EFECTOS.

La PRL posee un número considerable (más de 80) de acciones biológicas (68,106). Los efectos de la PRL se han agrupado en siete categorías diferentes (Tabla 1). En los mamíferos muchos de estos efectos se manifiestan conjuntamente en la regulación de la función de la glándula mamaria.

TABLA 1.

---

#### ACCIONES FISIOLÓGICAS DE LA PROLACTINA

---

- 1) balance de electrolitos y agua.
  - 2) reproducción.
  - 3) crecimiento y desarrollo (morfogénesis).
  - 4) efectos metabólicos.
  - 5) acciones sobre estructuras ectodérmicas e integumentarias.
  - 6) efectos conductuales.
  - 7) efectos inmunomoduladores.
- 

Si bien las diversas categorías funcionales se encuentran ampliamente representadas a través de la escala de los vertebrados, en general se considera que las acciones osmoregulatorias representan el papel predominante de la hormona entre los peces. Por otra parte en los anfibios adquieren mayor relevancia las funciones de PRL relacionadas con el crecimiento y el metabolismo, y en los mamíferos y las aves predominan claramente las acciones de la hormona relacionadas con la reproducción (107). Las distintas categorías funcionales han sido motivo de diversas revisiones (68,106,108).

Sobre la glándula mamaria confluyen varias de las acciones de la PRL, a saber: la PRL estimula el crecimiento y proliferación del epitelio alveolar (109), es determinante para la diferenciación de dicho epitelio en secretor y para su actividad secretora (74). Si bien en algunas especies la PRL es un componente esencial del complejo hormonal galactopoyético (PRL, ACTH, TSH y GH) que determina y regula la producción de leche a través de la lactancia, en otras especies como el conejo, es suficiente por sí sola para el mantenimiento de una lactancia normal (74).

La estimulación de la actividad secretora mamaria representa un ejemplo de sus acciones metabólicas. La PRL produce una estimulación generalizada de la maquinaria biosintética celular que permite la síntesis de los componentes específicos (caseína, lactosa, lípidos) y no específicos (agua, iones) de la leche (74) y su secreción al espacio alveolar. Así, la PRL estimula la síntesis de proteínas, tanto las secretadas en la leche, a saber: caseína,  $\alpha$ -lactalbúmina, p-lactoglobulina, transferrina, etc., como de las enzimas que participan en la elaboración de componentes tales como la lactosa, los lípidos específicos de la leche, etc. En el caso de la caseína, la inducción de su síntesis resulta de dos fenómenos independientes: el aumento de la transcripción del ARN mensajero para caseína y la estimulación de su traducción (110,111). Asimismo, la PRL estimula la transcripción de los genes ribosomales, promoviendo la acumulación del ARN ribosomal en las células mamarías (74).

Los triglicéridos y los fosfolípidos son componentes importantes de la leche. La PRL estimula el metabolismo de los lípidos de diversas maneras: promueve la síntesis de ácidos grasos de cadena intermedia ( $C < 14$ ) presentes en la leche por la glándula mamaria (74), además incrementa la captación de los ácidos grasos provenientes de la circulación por el tejido mamario mediante la estimulación de la actividad de la lipasa lipoproteica (112).

Durante la producción de leche la glándula mamaria transporta grandes volúmenes de fluido isotónico. La PRL ejerce funciones osmorregulatorias que permiten el mantenimiento de las diferencias entre la composición iónica de la leche y la del plasma (concentraciones bajas de  $Na^+$  y de  $Cl^-$  y altas de  $K^+$  en la leche, relativas a las plasmáticas). La PRL modifica el transporte activo de estos iones a través de la membrana (112), y reduce el flujo iónico entre las células del epitelio.

La presencia y proliferación de las células del sistema inmune y de sus anticuerpos en la leche parece ser consecuencia de los efectos inmunomoduladores de la hormona (112). Así, se ha demostrado que la PRL incrementa la capacidad de la glándula mamaria para atraer y retener a las células plasmáticas secretoras de anticuerpos del tipo IgA, presentes en la leche (112).

Finalmente, la PRL ejerce efectos conductuales que influyen sobre la lactancia. La PRL estimula la conducta materna en diversas especies, en conjunción con otras hormonas esteroides (estrógenos y progesterona) (106). Si bien la administración de PRL en ausencia de estos esteroides no es suficiente para provocar estos efectos, su presencia es indispensable para la inducción de la conducta materna por

las hormonas ováricas (108). Así, interviene en conductas de construcción del nido, empollamiento y cuidado de las crías, etc. Los efectos de la PRL sobre la conducta materna se presentan a lo largo de la escala de los vertebrados (108).

## 2. RECEPTORES DE PRL.

Coincidente a la gran versatilidad de la PRL, sus receptores se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos de mamíferos. (Ver Tabla 2). Si bien en la mayoría de los tejidos los receptores de PRL se han asociado con funciones específicas en otros casos su papel fisiológico es desconocido (113).

**TABLA 2.**

---

### **DISTRIBUCION DE RECEPTORES PARA PRL EN MAMIFEROS**

---

**Glándula mamaria:** normal, lactante, tumores.

**Ovario:** células granulosas, cuerpo lúteo.

**Utero.**

**Placenta.**

**Testículos:** células de Leydig, espermatidas.

**Epidídimo.**

**Vesículas seminales.**

**Próstata:** normal, tumores.

**Hígado.**

**Páncreas:** islotes de Langerhans

**Intestino.**

**Riñón.**

**Glándulas suprarrenales.**

**Sistema linfático y células inmunes:** timo, timocitos,  
linfocitos, neutrófilos.

**Cerebro:** hipotálamo, sustancia negra, plexos coroides.

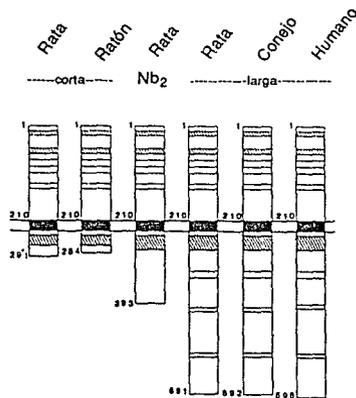
**Ojo:** cubierta coroidal, fotorreceptores retinales.

---

Los receptores de PRL varían durante el ciclo estral, se incrementan durante el embarazo, y son estimulados grandemente por los estrógenos. Asimismo, la PRL también regula a su propio receptor, siendo esta regulación dependiente de la concentración y la duración de la exposición a la PRL (113).

## 2a) HETEROGENEIDAD DE LOS RECEPTORES.

Los receptores de PRL ya han sido clonados e identificados como miembros de una gran familia que agrupa a los receptores de la hormona de crecimiento y las citocinas (113). Entre las características comunes a esta familia se encuentra un alto grado de homología estructural en el dominio extracelular con la presencia de 2 pares de cisteínas generalmente en la región N-terminal de la molécula, y la existencia de una secuencia o motivo altamente conservado WSXWS (Trp, Ser, cualquier aminoácido, Trp, Ser) cerca del extremo C-terminal de la primera región homóloga (113).



**Fig. 2. Receptores de PRL.** Se muestran las formas corta, larga e intermedia de los receptores, así como las diferentes especies en que se han descrito.

Los receptores a PRL comprenden 3 variantes que difieren en el tamaño de su dominio citoplásmico (113,114) (Fig. 2). La forma corta contiene 291 aminoácidos (aa), la forma intermedia de 392 aa y la forma larga de 591 aa. La longitud de los dominios citoplásmicos es de 57 aa, 26 y 262 aa respectivamente. La localización de las diferentes variantes difiere entre los diferentes tejidos. En algunos casos las formas corta y la larga coexisten como en el hígado de la rata. La forma intermedia sólo se ha observado en las células del linfoma Nb<sub>2</sub>.

### 3. MECANISMOS DE ACCION DE PRL.

El paso inicial en el mecanismo de acción de la PRL es la unión a su receptor membranaral. Mediante estudios con anticuerpos dirigidos contra el receptor de PRL, se ha observado que este evento es al parecer suficiente para provocar los efectos de PRL y sugiere que a nivel de la membrana celular tiene lugar la activación de segundos mensajeros responsables de las acciones hormonales (110). También se ha propuesto la internalización de la PRL como primer paso en la mediación de su acción hormonal. Sin embargo aunque existen evidencias que muestran la presencia de PRL inmunoreactiva en el interior de las células del epitelio alveolar y en otros tejidos blanco de la hormona, no se ha podido establecer con claridad si la PRL internalizada es biológicamente activa y ejerce acciones a nivel intracelular (74).

Los eventos que ocurren después de la unión de la PRL con su receptor y que resultan en las respuestas intracelulares a esta hormona son poco comprendidos, aunque han sido exhaustivamente estudiados. Generalmente se han tomado como parámetros la estimulación de la síntesis de caseína y de ADN. Hasta ahora, se ha implicado a los sistemas de segundos mensajeros: AMPc, GMPc, fosfoinosítidos, Ca<sup>2+</sup>, canales iónicos y fosforilación de receptores, entre otros (110,113,115).

Así, mediante estudios realizados en células mamarias en cultivo se ha observado que el AMPc tiene un efecto ligeramente inhibitorio sobre la síntesis de caseína, mientras que el GMPc la estimula ligeramente, aunque dichos efectos son muy pequeños para considerarlos como mediadores potenciales de la acción de PRL (115). Las prostaglandinas E<sub>2</sub> y F<sub>2</sub>-α estimulan la síntesis de ARN en la

glándula mamaria pero son incapaces de estimular la síntesis de caseína (113).

También se ha involucrado a las poliaminas, debido a que la PRL es capaz de estimular la actividad de la ornitina descarboxilasa (ODC), enzima que interviene en su síntesis (115,116). Asimismo la activación de la proteína cinasa C imita la acción de PRL sólo sobre la ODC y no sobre la estimulación de la transcripción de los genes que codifican para las proteínas de la leche (113).

Por otra parte, el análisis de la actividad mitogénica de la PRL en células de linfoma Nb<sub>2</sub> ha proporcionado información adicional. Se ha sugerido la participación de proteínas G probablemente asociadas al receptor en las acciones de PRL (113). Otros eventos tempranos posteriores a la unión de la PRL con su receptor incluyen la activación del intercambio Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y la activación de canales de Ca<sup>2+</sup> (113,110).

Si bien cada uno de estos posibles mecanismos ha sido estudiado ampliamente, ninguno por sí solo, ni aún en su conjunto, explica a satisfacción la mediación de sus efectos hormonales.

### III. ANTECEDENTES INMEDIATOS.

#### A. PROLACTINAS CORTADA Y 16K.

##### 1. ESTRUCTURA.

La PRL 16K se origina a partir de la PRL cortada, a su vez resultado de la proteólisis de la forma molecular predominante de PRL ó PRL 23K. La PRL cortada (PRLc) posee un corte en el asa de mayor tamaño cerrada por uno de los puentes disulfuro de la molécula (62). De este modo, la PRLc consiste en dos cadenas polipeptídicas: la amino-terminal de 16 kDa y la carboxilo terminal de 7 kDa, las cuales permanecen unidas entre sí mediante un enlace disulfuro (Fig. 3).

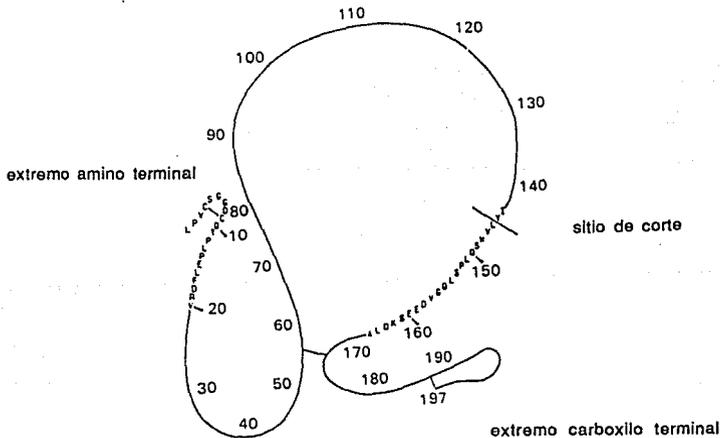


Fig. 3.- Estructura de la PRL cortada.

Mediante el análisis de los aminoácidos carboxilo terminales de formas de PRL cortada secretadas al medio de incubación de lactotrofos de rata se estableció el sitio de corte entre los aminoácidos Tyr 145 y Leu 146 (117). Por otra parte en una variante de PRL 16K humana producida mediante ADN recombinante, el sitio de corte se designó arbitrariamente entre los aminoácidos Arg 124 y Leu 125 (118). El hecho de que dicha PRL 16K posea una potente actividad biológica sugiere que el sitio de corte de la PRL pudiese variar entre las especies (118).

## 2. SITIOS DE PRODUCCION.

Mitra fue el primero que en 1980 (62) describió la presencia de la PRL cortada en la adenohipófisis, mediante el análisis electroforético de las PRLs marcadas con aminoácidos radiactivos en HA en cultivo. Asimismo, Mitra infirió que el sitio de corte era sumamente específico y regulable bajo los diversos estadios fisiológicos (119). De éstos, el embarazo y pseudoembarazo mostraron un aumento en los niveles adenohipofisarios de PRLc. A la vez, la estimulación farmacológica con perfenazina (un antagonista de dopamina) ó estradiol resultaron en un incremento en la concentración de la PRL cortada.

Posteriormente diversas evidencias han confirmado la presencia de la PRL cortada en la HA de rata (62), el ratón (64), y el humano (63) así como en prolactinomas de humano (63). La PRL cortada producida en la hipófisis puede ser secretada a la circulación. Recientemente se detectaron dos formas de PRLc en el medio de incubación de lactotrofos (117) y Sinha y cols. mostraron la presencia de PRL cortada en el plasma de mujeres embarazadas (63).

Diversos estudios han demostrado la presencia de las peptidasas específicas capaces de procesar a la PRL hacia PRLc y sus fragmentos derivados en diversos órganos blanco de PRL tales como el hígado, la glándula mamaria, el riñón, el pulmón, el bazo y la próstata (43,120). La actividad enzimática responsable del corte de la PRL varía de acuerdo al estado fisiológico. En la glándula mamaria la actividad enzimática de corte es mayor durante la lactancia que en el embarazo y el ciclo estral (121).

Las enzimas específicas para cortar la PRL en los órganos blanco están presentes en las diversas fracciones celulares examinadas (citósólica, mitocondrial, y lisosomal) (120,43). Si bien esto podría representar un cierto grado de contaminación entre las diferentes

fracciones celulares analizadas, (43,121), es posible que la presencia de dichas enzimas en las distintas fracciones refleje una amplia distribución real en varios compartimientos celulares.

El pH óptimo para la proteólisis *in vitro* de la PRL es de 3.4, con las enzimas específicas provenientes de la glándula mamaria. Asimismo la fracción lisosomal (precipitable a 25,000 X g) concentra una mayor actividad de corte (121). La PRL cortada ha sido generada también mediante la incubación a pH ácido de la PRL íntegra con los medios de incubación de rebanadas de tejidos (122).

Mediante estudios llevados a cabo con inhibidores de proteasas se determinó que el corte es realizado por un complejo de proteasas en los órganos blanco (43). Dentro de los grupos de proteasas involucrados se encuentran principalmente las de serina (43). Se ha implicado asimismo en la actividad de corte tanto a las proteasas de aspartato como a las metalo-enzimas debido a que el uso de inhibidores a estas enzimas fueron capaces de abolir la proteólisis de la PRL (43).

El procesamiento proteolítico de la PRL parece ser especie y hormona específicos. En estudios comparativos (121) sobre el procesamiento proteolítico de las PRLs de rata, ovina y humana, y otras hormonas lactogénicas: lactógeno placentario y hormona de crecimiento humana, y de hormonas estimulantes de crecimiento de rata y bovina, se mostró que las enzimas de los órganos blanco eran específicas para generar la variante cortada de la PRL de la misma especie. De tal manera enzimas provenientes de la glándula mamaria de la rata generan la variante cortada a partir de la PRL de rata pero no a partir de PRLs de otras especies o de otras hormonas homólogas, las cuales son básicamente degradadas hasta fragmentos de menor peso molecular.

Estos resultados muestran por tanto que la PRL cortada y sus fragmentos generados pueden ser producidos en la HA, secretados a la circulación y/o resultar del procesamiento periférico de la hormona en sus órganos blanco.

### 3. RELEVANCIA FISIOLÓGICA.

El procesamiento proteolítico hacia fragmentos con actividad biológica ya se había propuesto para otras hormonas (126). Lewis y cols. demostraron que en la hormona de crecimiento (GH) el corte proteolítico entre los residuos de aminoácidos 134 y 150 le confería un incremento en su actividad diabetogénica (123). Asimismo el fragmento 15K de GH generado presentaba actividad del tipo de GH tanto en ensayos de radioreceptor como en bioensayos para hormonas lactogénicas (124).

Con respecto a la PRL, Mena (39,13) observó que la detectabilidad de la PRL, previa a ser secretada, se asociaba con cambios estructurales en la molécula, pudiéndose generar formas con cocientes BA/RIA alterados. Asawaroengchai (42) presentó datos sugerentes al mostrar que la incubación de la PRL con explantes de glándula mamaria provocaba un aumento en su bioactividad. Asimismo, Nolin (125) presentó evidencias de que los folículos ováricos contienen fragmentos con inmunorreactividad de PRL, y sugirió que éstos podrían tener relevancia funcional.

Nuestro grupo de investigación ha generado PRLc y PRL 16K en grandes cantidades mediante la proteólisis de la PRL íntegra de rata con enzimas específicas provenientes de la glándula mamaria y su purificación subsecuente (121). Estas preparaciones se han caracterizado en diversos bioensayos de PRL.

## **B. PRL CORTADA.**

### **1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA TIPO PRL.**

Estudios de nuestro grupo mostraron que la PRL cortada posee la misma potencia mitogénica que la PRL íntegra (54) en los bioensayos mitogénicos específicos para PRL a saber: células epiteliales mamarias en cultivo, células derivadas del linfoma Nb<sub>2</sub> cultivadas *in vitro*, y el bioensayo *in vivo* de proliferación del buche del pichón. Esta actividad biológica se correlaciona con la misma afinidad de unión a los receptores de PRL (121). Sin embargo, la actividad inmunológica de la PRL cortada se reduce en un 55% (54), lo que sugiere que el sitio de corte es importante para la inmunoreactividad aunque no lo es para su actividad biológica.

### **2. ACTIVIDAD PROPIA.**

Recientemente el grupo de Deneff caracterizó la actividad biológica de la PRL cortada secretada al medio de incubación de lactotropos. Deneff mostró que la PRL cortada, y no la PRL íntegra, estimula la proliferación de los gonadotropos y tirotropos adenohipofisarios en concentraciones nanomolares (117). Este hallazgo demostró que dicha variante posee una significancia funcional independiente a la de la forma íntegra de PRL, a manera de un nuevo factor parácrino regulador del crecimiento.

## C. PRL 16K.

### 1. ACTIVIDAD BIOLÓGICA TIPO PRL.

El primero en establecer la significancia funcional de la PRL 16K fué Mittra. El postuló que la PRL 16K podría ser la forma molecular de PRL responsable de estimular la división celular en el tejido mamario (mamogénesis) (119). En sus experimentos administró localmente fragmentos de gel conteniendo a la PRL 23K intacta o al fragmento 16K sobre glándulas mamarias de ratas vírgenes adultas. Sus resultados mostraron que la PRL 16K era capaz de estimular significativamente la división de las células epiteliales mamarias a concentraciones menores en las cuales la PRL 23K intacta no tenía ningún efecto.

Más recientemente nuestro grupo de investigación mostró que la PRL 16K generada mediante la proteólisis y reducción de la PRL 23K posee actividad mitogénica y lactogénica tipo PRL en diversos bioensayos específicos, a saber: el bioensayo *in vivo* del buche del pichón, y los bioensayos *in vitro* de células mamarias epiteliales o células de linfoma Nb<sub>2</sub> en cultivo (54). La potencia mitogénica de la PRL 16K varía entre los diferentes ensayos estudiados, siendo menor o similar a la de la PRL íntegra en el buche del pichón y las células mamarias, respectivamente (54). Asimismo la potencia lactogénica de la PRL 16K fue menor a la de la PRL íntegra. De tal manera no se confirmó la mayor potencia biológica de la PRL 16K observada por Mittra.

Las diferentes potencias biológicas de la PRL 16K sobre los diferentes tejidos parecen reflejar cambios en la afinidad de dicho fragmento hormonal por los receptores de la PRL íntegra.

#### 1a) UNIÓN DE LA PRL 16K A RECEPTORES DE PROLACTINA.

La habilidad de la PRL 16K para unirse a los receptores de la PRL 23K varía entre los diferentes órganos blanco (125). En ensayos de unión a receptores empleando membranas aisladas de hígado de ratas embarazadas se observó que la PRL 16K posee sólo un 6% de la capacidad de unión de la PRL 23K. Sin embargo, en membranas de cerebro su potencia de unión es similar a la de la PRL intacta, y en membranas de riñón la PRL 16K resultó tener una potencia de unión a los receptores de la PRL 23K, 30 veces mayor a la de la propia PRL 23K (122).

Estos resultados sugieren que la participación de la PRL 16K en la mediación de efectos de PRL íntegra puede variar entre los distintos órganos blanco. Esto sería particularmente importante en la mediación de los efectos de la PRL íntegra en el cerebro y en el riñón.

En relación a esto, resultados preliminares de nuestro laboratorio han mostrado la presencia de un antígeno tipo PRL 16K en ciertos núcleos hipotalámicos (126). Asimismo, estudios preliminares en colaboración con el grupo del Dr. William Samson de la Universidad de Missouri han mostrado que la administración de PRL 16K y no de PRL 23K íntegra a ratas anestesiadas hiperhidratadas, estimula significativamente la excreción urinaria de  $\text{Na}^+$  sin alterar los niveles urinarios de  $\text{K}^+$  ni la presión arterial. Este efecto es claramente distinto al de otros factores natriuréticos conocidos (127) y junto con la gran potencia mostrada por la PRL 16K para desplazar a la PRL 23K en el riñón, sugiere el que la PRL 16K podría ser el metabolito responsable de mediar los efectos de la PRL en el riñón.

## 2. EFECTOS PROPIOS:

La significancia funcional de la PRL 16K se apoya en su actividad como un potente inhibidor de la angiogénesis, i.e. la formación de vasos capilares nuevos. La PRL 16K, pero no la PRL íntegra, inhibe la angiogénesis tanto *in vivo* como *in vitro*.

La angiogénesis juega un papel muy importante en el crecimiento y diferenciación de los diferentes tejidos y órganos durante el desarrollo embriológico y posnatal. En la vida adulta la angiogénesis es fundamental en procesos fisiológicos tales como la ovulación, la formación del cuerpo lúteo, y la regeneración y reparación tisular. Por otra parte la angiogénesis es un componente esencial de procesos patológicos que involucran la sobreproducción de vasos capilares, como ocurre en las neoplasias, la artritis reumatoide y las retinopatías (128). La angiogénesis ocurre merced a una serie de fases secuenciales que incluyen la migración, proliferación y asociación de las células endoteliales en capilares.

En un estudio donde se analizaron los posibles candidatos angiogénicos responsables del desarrollo arterial anormal que ocurre en las hipófisis de animales tratados con estrógenos (129), se observó que la PRL 16K era capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales en cultivo. La PRL 16K de rata y la humana recombinante inhiben la proliferación basal y estimulada por diversos factores angiogénicos, i.e. el factor estimulante de fibroblastos (FGF) y el factor

estimulante del crecimiento vascular (VEGF). Este efecto inhibitorio es específico para las células endoteliales y no se observa en otras células blanco de los efectos mitogénicos de FGF, i.e. fibroblastos y la línea celular BHK derivada del riñón (130). Asimismo ni la PRL íntegra ni la PRL cortada de diversas especies tienen efecto sobre las células endoteliales (130).

La PRL 16K inhibe además otra de las fases de la angiogénesis, a saber: la asociación de las células endoteliales para formar vasos capilares. Cuando estas células se cultivan inmersas en una matriz de colágeno tipo I, se asocian entre sí y forman estructuras tubulares que semejan capilares (131). La adición de PRL 16K, pero no de PRL 23K, a estos cultivos provoca la disociación celular y la ruptura de estas estructuras. Las células disociadas adoptan una forma esférica. Este efecto es reversible: una vez que la PRL 16K ha sido removida del medio de incubación las células se vuelven a asociar generando las estructuras tubulares (130,118).

La inhibición directa sobre el endotelio *in vitro* se traduce en una inhibición sobre el proceso integral de la angiogénesis observado *in vivo*. Mediante el modelo *in vivo* de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo se observó que la PRL 16K provocó una disminución en el número de capilares en la zona de administración (118).

Estos resultados muestran que la PRL 16K es un potente inhibidor de la angiogénesis tanto *in vitro* como *in vivo* y sugieren su posible función como regulador endógeno de dicho proceso. Una alteración de su control podría contribuir a un crecimiento rápido de vasos capilares en respuesta a demandas fisiológicas ó desórdenes patológicos. Un ejemplo de lo anterior pudiera ser el mecanismo de angiogénesis que acompaña el crecimiento de tumores adenohipofisarios inducidos por estrógenos. Se ha propuesto que una inhibición de la producción de la PRL 16K pudiera participar en este proceso (129).

Por otra parte, la actividad antiangiogénica de la PRL 16K pudiera resultar en un enorme potencial terapéutico para el tratamiento contra el cáncer (118) dado que los tumores dependen de su vascularización para crecer y desarrollarse. Asimismo, pudiera servir como agente terapéutico en desórdenes tales como la artritis reumatoide y la retinopatía diabética, en los cuales una angiogénesis excesiva produce la destrucción del cartílago y la ceguera, respectivamente (128).

## 2a) RECEPTORES DE PRL 16K.

En apoyo a la significancia de la PRL 16K como un regulador endógeno de la angiogénesis observamos que su efecto antiangiogénico parece involucrar receptores específicos a la PRL 16K.

En estudios previos se había observado que diversos tejidos de la rata a saber, el riñón, el hígado y el cerebro poseen sitios de unión específicos a la PRL 16K que no reconocen a la PRL 23K (125), y se sugirió la posibilidad de que éstos pudiesen representar receptores capaces de mediar efectos específicos de la PRL 16K.

Se han reconocido sitios de unión específicos a la PRL 16K en membranas aisladas de células endoteliales (131). Estos sitios de unión son de alta afinidad ( $K_d = 1 \text{ nM}$ ), saturables y específicos. Ni la PRL 23K, la GH o el FGF compiten por su unión. La afinidad de unión a este receptor se correlaciona con la potencia antiangiogénica de diferentes análogos a la PRL 16K (131). De esta manera, estos sitios de unión podrían representar los receptores capaces de mediar el efecto antiangiogénico de la PRL 16K.

El hecho de que la PRL 16K ejerza efectos antiangiogénicos mediante receptores propios y que la PRL íntegra no afecte la angiogénesis, sugiere que dicho fragmento hormonal constituye un nuevo factor endógeno de regulación.

## **IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA:**

De todas las variantes moleculares conocidas de la PRL sólo las que resultan del procesamiento proteolítico i.e. PRLc y PRL 16K parecen tener una relevancia funcional clara. La PRL 16K posee efectos biológicos no sólo tipo PRL, sino principalmente efectos propios que la señalan como un potente factor inhibidor de la angiogénesis. La PRL 16K se une a receptores específicos de la hormona madre con una afinidad variable (e incluso mayor para algunos tejidos) pero sobretodo posee receptores propios capaces de mediar sus efectos específicos. De tal manera es posible considerar que la PRL 16K constituye un nuevo factor de regulación cuya presencia endógena requiere ser valorada.

Como se mencionó previamente, diversos estudios demuestran la presencia de la PRL cortada en la hipófisis y circulación de varias especies (39,51,63,64,96,101) así como su posible producción periférica en los órganos blanco de la PRL íntegra (43,65). Sin embargo, la presencia endógena de la PRL 16K como tal no ha sido dilucidada.

Un factor importante que pudiera interferir con la detección de esta variante es el empleo de anticuerpos específicos contra la PRL 23K. Dichos anticuerpos anti-PRL 23K poseen una reactividad cruzada muy baja (2%) contra la PRL 16K (121). Los estudios que han caracterizado a estas variantes de PRL basan su identificación en la técnica de electroforesis, transferencia e inmunotinción con los anticuerpos anti 23K (Western blots). Frecuentemente dicho procesamiento es precedido de la inmunoprecipitación de dichas variantes con estos anticuerpos lo que da lugar a una subestimación considerable de sus niveles endógenos.

## **V. OBJETIVO:**

El objetivo central de este estudio es el demostrar la presencia endógena de la PRL 16K y de esta manera sustentar su papel como un factor fisiológico de regulación. Con tal propósito hemos generado anticuerpos policlonales específicos contra la PRL 16K y analizado su presencia en la hipófisis y en la circulación de la rata, en los diferentes estadios del ciclo reproductor, mediante la técnica de inmunotransferencia .

## **VI. MATERIAL Y METODOS.**

### **A. MATERIAL BIOLÓGICO.**

#### **1. ANIMALES.**

Dado que la PRL 16K endógena puede provenir de la proteólisis de la PRL sus niveles endógenos podrían ser función de la concentración de la PRL íntegra que se sabe varía a lo largo del ciclo reproductor. De tal manera se emplearon ratas Wistar macho y hembras en los diferentes estadios del ciclo reproductor, a saber: proestro, estro, y diestro, y durante la lactancia (primíparas, 7-14 días). A las hembras vírgenes se les determinó su etapa del ciclo estrol mediante el examen de la citología de frotis vaginales durante al menos 4 ciclos. Asimismo se estudió la posible influencia de los estrógenos empleando ratas ovariectomizadas y sometidas a estrogenización mediante cápsulas de silastic conteniendo estradiol por 3 semanas.

#### **2. OBTENCION DE MUESTRAS.**

Las ratas fueron anestesiadas con éter y las adenohipófisis y la sangre fueron obtenidas por decapitación. El suero se obtuvo inmediatamente o en los experimentos que se indica después de incubar la sangre a 4C durante diferentes tiempos. Las muestras se procesaron inmediatamente o se almacenaron a -70 C para su procesamiento posterior. Para el extracto de enzimas se extirparon las glándulas mamarias de la región abdominal de ratas lactantes previamente succionadas por sus crías.

### **B. METODOS.**

#### **1. GENERACION DE LA PRL 16K.**

La PRL 16K a utilizar como estándar y en la generación de los anticuerpos específicos se obtuvo mediante la proteólisis de la PRL de rata (estándar B-6 del NIH) con una fracción subcelular enriquecida con las enzimas específicas para cortar PRL de acuerdo al método descrito (121) y referido a continuación:

### 1a) FRACCION ENRIQUECIDA DE LAS PEPTIDASAS ESPECIFICAS.

Glándulas mamarias de ratas lactantes fueron extraídas y homogeneizadas en un amortiguador de Tris 0.1M - sacarosa 0.25 M de pH 7.4 en un politrón (PT 10-35). El homogenado se sometió a centrifugaciones sucesivas (600Xg, 3,300Xg y 25,000Xg) hasta obtener el sedimento precipitado a 25,000Xg. Este sedimento se lavó, se resuspendió en un amortiguador de Tris 0.1M, pH 7.4 y se almacenó a -70 C. La concentración de proteína en dicho sedimento se determinó mediante el método de Bradford (132).

### 1b) PROTEOLISIS DE LA PRL.

La PRL de rata (NIH B-6) se incubó con el extracto de enzimas de glándula mamaria en una proporción de aproximadamente 50 ug de PRL/20 ug de proteína (extracto enzimático) en un amortiguador de Citrato-fosfatos 0.1 M, NaCl 0.15 M (pH 3.4), durante 3 horas a 37 C con agitación constante. Bajo estas condiciones toda la PRL 23K es transformada hacia la variante cortada. Dado que las otras proteínas presentes en el extracto están unidas a membranas, éstas son separadas de la PRL cortada mediante centrifugación.

### 1c) AISLAMIENTO DE LA PRL 16K.

La PRL cortada obtenida en el paso anterior se concentró y se redujo (2-mercaptoetanol 200 mM), y posteriormente se neutralizó ( $\text{Na}_2\text{HPO}_3$  3M). Los fragmentos 16K y 7K de la PRL se separaron en una columna de Sephadex G-50-150, empleando como amortiguador de elución, bicarbonato de amonio 0.1M conteniendo 2-mercaptoetanol 200 mM (pH 7.8). Las fracciones fueron analizadas por electroforesis y aquellas conteniendo exclusivamente a la PRL 16K se dializaron a 4 C contra un amortiguador de fosfatos 0.01M de pH 7.4, y posteriormente contra agua. Finalmente las fracciones fueron alicuotadas y almacenadas a -70 C. La pureza y concentración de las fracciones de PRL 16K se analizaron mediante electroforesis en presencia de SDS y densitometría.

## 2. GENERACION DEL ANTICUERPO ANTI-PRL 16K.

Los anticuerpos contra la PRL 16K fueron generados siguiendo el método descrito por Arámburo et al. (141). Se preparó una emulsión del inmunógeno mezclando 100 ug de la PRL 16K con 3 volúmenes de adyuvante completo de Freund (por animal) y se inyectó a conejos Nueva Zelanda directamente en los ganglios poplíteos. Se aplicaron inoculaciones de refuerzo los días 30, 60 y 90 por vía intradérmica, inyectando 50 ug de la hormona emulsificada con adyuvante incompleto de Freund y se tomaron muestras de sangre los días 15, 45, 75 y 105. Las respuestas inmunes de los animales se analizaron mediante la observación de precipitinas en tubo capilar y RIA. Cuando se tuvieron títulos adecuados se obtuvo la sangre de los conejos por punción cardíaca.

## 3. ELECTROFORESIS.

La concentración de la PRL 16K se analizó mediante la electroforesis y densitometría de curvas estándar de PRL 23K y PRL 16K en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) de acuerdo al método de Laemmli (133) en ausencia o presencia de 2-mercaptoetanol al 5%. Se utilizó un sistema de minigeles (grosor 0.75 mm; gel separador de 5 cm). La electroforesis se llevó a cabo a 200 V por aproximadamente 45 minutos. Los geles fueron teñidos con azul de Coomassie o la tinción de plata y secados, o bien electrotransferidos.

## 4. ELECTROTRANSFERENCIA E INMUNOTINCION.

En experimentos iniciales, los geles fueron fijados inmediatamente después de la electroforesis (8% Ac. acético /25% etanol) durante toda la noche, se equilibraron en el amortiguador de transferencia (Tris 100 mM, pH 9.7) y se transfirieron a nitrocelulosa por 2 horas a una intensidad constante de 0.10 Amperes. Después de la transferencia, los filtros de nitrocelulosa se bloquearon (PBS-2% BSA, pH 7.4) durante 4 h a temperatura ambiente (TA) y se incubaron con una dilución 1:500 del anticuerpo anti-PRL 23K (S-9,NIH) o del anti-PRL 16K por 24 h a 4 C. Al día siguiente, los filtros se lavaron con una solución de NaCl 0.15 M y se incubaron por dos horas (TA) con segundos anticuerpos (anti-gama globulina de conejo) acoplados a una enzima específica: peroxidasa de rábano (HP), fosfatasa alcalina (AP) u oro coloidal (GG), en diluciones 1/1000, 1/3000 y 1/1000 respectivamente. La detección con oro se combinó con un equipo intensificador de plata.

Se cuantificaron los cambios en la intensidad de las bandas inmunoreactivas mediante densitometría de reflectancia.

En otras series de experimentos utilizamos otro método alternativo de electrotransferencia (Bio-Rad) el cual es esencialmente parecido al de Towbin et al. (134). Después de la electroforesis, los geles se equilibraron por 5 min. con un amortiguador de Tris 25 mM, Gly 192 mM y 20 % de metanol y fueron electrotransferidos a 40 V a nitrocelulosa a 4 C por toda la noche. Los filtros de nitrocelulosa se bloquearon con albúmina al 5% en un amortiguador de Tris 20 mM-137 mM NaCl- Tween 20 0.1%, pH 7.6 por 1 hora (TA), y posteriormente se incubaron con anti-PRL 23K ó anti-PRL 16K (mismas concentraciones que arriba) durante 2 horas (TA). La inmunotinción se realizó utilizando segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano (dil. 1:1000) y los reactivos de quimioluminiscencia (Amersham). Los cambios en las intensidades de las inmunotinciones fueron cuantificados por densitometría en el modo de transmitancia.

## 5. ULTRAFILTRACION.

El suero de rata se mezcló en partes iguales con el amortiguador de muestras de electroforesis conteniendo 2-mercaptoetanol al 5%, y al cual se omitió el glicerol. La mezcla se ultrafiltró a través de una membrana Diaflo (YM 30) que retiene partículas de peso molecular mayores a 30,000 Da. El suero ultrafiltrado se concentró 10 veces antes de someterse a electroforesis.

## 6. AUTORADIOGRAFIAS.

Con el propósito de analizar la posible proteólisis de la PRL durante el procesamiento de la muestra se añadió PRL 23K marcada isotópicamente a las muestras de sangre y se les procesó en forma rutinaria. En estos casos los geles previamente secados se colocaron sobre una película sensible (Kodak XAR-5) entre dos pantallas intensificantes por 16 h a -70 C. La película se reveló mediante técnicas de fotografía convencionales.

## 7. YODACION.

Las PRLs 23K (I-5, NIH) y 16K se yodaron isotópicamente mediante el método de la cloramina T (135).

## 8. RADIOINMUNOENSAYO (RIA).

Para la evaluación de la reactividad cruzada de la PRL 16K se desarrolló un RIA específico siguiendo el método sugerido por Parlow (NIH) para la PRL 23K (136) y los anticuerpos anti-PRL 16K generados por nosotros. Se utilizó un amortiguador de fosfatos 0.01M- NaCl 0.15M (PBS), pH 7.6 conteniendo BSA al 0.1%, pH 7.6 para el ensayo y la proteína A de Staphylococcus aureus para separar la fracción unida al anticuerpo. Los títulos de los anticuerpos fueron 1/12,000 y 1/16,000 para los RIAs de PRL 23K y 16K respectivamente.

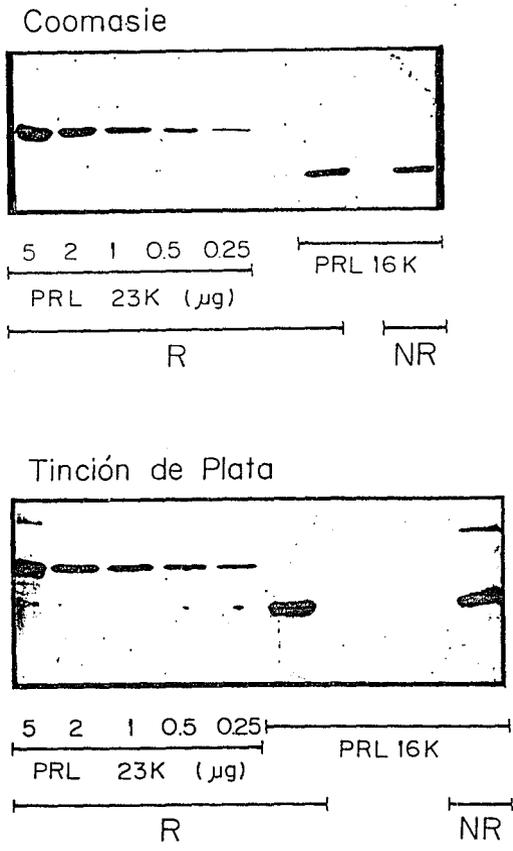
## VII. RESULTADOS

### A. PUREZA Y CUANTIFICACION DEL ESTANDAR DE PRL 16K:

Las preparaciones de PRL 16K obtenidas fueron suficientemente puras a juzgar por las tinciones de Coomasie y plata de geles de poli(acrilamida) bajo condiciones reductoras (Fig. 4). No se detectó contaminación con PRLs 23K y 7K. Esta preparación se utilizó como estándar en los diferentes métodos de inmunodetección y para la generación de anticuerpos específicos.

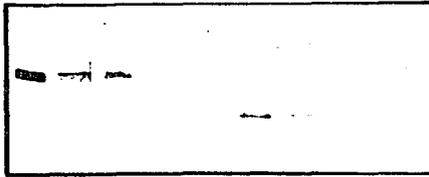
### B. ANALISIS DEL SISTEMA DE INMUNOTRANSFERENCIA UTILIZADO.

Validamos los métodos de electrotransferencia e inmunotinción utilizados en función de las PRLs 16K y 23K. La validación del método utilizado inicialmente (51) se ilustra en la figura 5. Se procesaron concentraciones decrecientes de los estándares de las PRLs 23K y 16K en dos geles paralelos, uno de los cuales fue teñido con azul de Coomasie inmediatamente después de la electroforesis (Fig. 5A) y el otro después de haber sido electrotransferido (Fig. 5B). El blot correspondiente al gel transferido e inmunoteñido con el anticuerpo contra PRL 23K (NIH S-9) y segundos anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano se muestra también (Fig. 5C). El procedimiento empleado fue mucho más eficiente para transferir a la PRL 16K que para la PRL 23K. La primera no es detectada en el gel transferido mientras que una cantidad importante de PRL 23K permanece en el gel aún después de la transferencia. Asimismo, el papel de nitrocelulosa correspondiente al gel transferido (Fig. 5C) muestra una inmunotinción mucho más intensa para las diferentes concentraciones de PRL 16K que para concentraciones equivalentes de PRL 23K, confirmando una mayor y menor transferencia de las PRLs 16K y 23K respectivamente bajo este sistema de detección. Estos resultados muestran que la PRL 23K y la PRL 16K difieren en sus propiedades de electrotransferencia y validan el uso de este sistema para la total transferencia de la PRL 16K. En un grupo posterior de experimentos utilizamos otro método de transferencia; con este método observamos la total transferencia de ambas PRLs (resultados no mostrados).

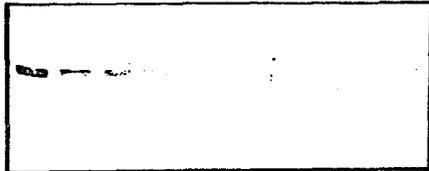


**Figura 4.- PUREZA DE LAS PREPARACIONES DE PRL 16K OBTENIDAS.** La PRL 16K generada in vitro fue cuantificada y se evaluó su pureza mediante geles de poliacrilamida al 15% en presencia de SDS. Se muestran las curvas estándar de PRL 23K y la PRL 16K (10 ul) en condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR). Los geles fueron teñidos con azul de Coomasie o mediante la tinción de plata. No se detectaron bandas de proteína contaminantes.

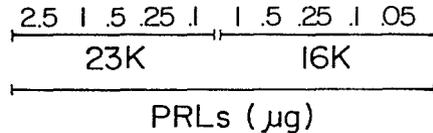
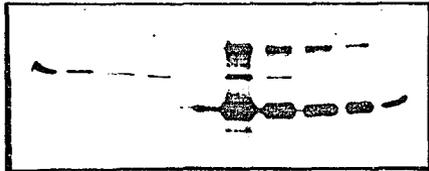
A. Gel sin transferir



B. Gel transferido



C. Inmunotransferencia



**Figura 5.- EFICIENCIA DE LA ELECTROTRANSFERENCIA DE LAS PRLs 23K Y 16K.** A. Gel de SDS-poliacrilamida teñido con azul de Coomassie mostrando concentraciones diferentes de PRL 23K y 16K. B. Gel idéntico al del panel A, teñido con azul de Coomassie después de ser transferido. C. Inmunotransferencia correspondiente al gel en B, inmunoteñido con anti-PRL 23K y 2do anticuerpo acoplado a fosfatasa alcalina. Los gels se corrieron bajo condiciones reductoras.

En el estándar de PRL 16K la banda inmunorreactiva más intensa fué la de 16 kDa, sin embargo se observaron también otras bandas inmunorreactivas de pesos moleculares diversos. Entre éstas las más aparentes fueron bandas de 36, 25 y 12 kDa. La proporción de estas proteínas de peso molecular distinto a 16 kDa fue de aproximadamente un 20 % del total. La proporción de estas proteínas varió entre las distintas preparaciones del estándar independientemente del método de transferencia e inmunotinción utilizado.

## **C. DETECCION DE LA PRL 16K ENDOGENA.**

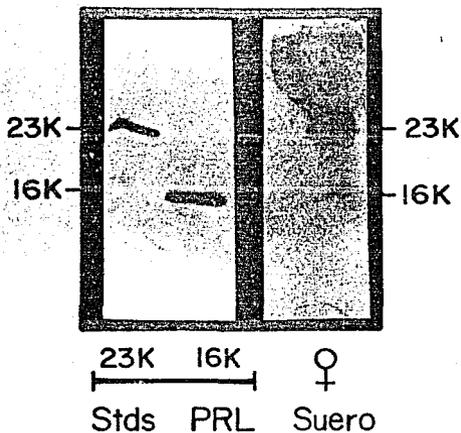
### **1. EN LA CIRCULACION.**

#### **1a) ANTISUERO ANTI-PRL 23K.**

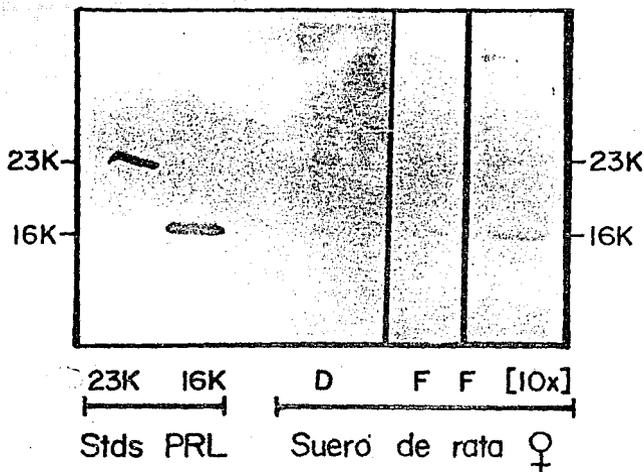
Mediante los métodos de transferencia e inmunotinción antes descritos analizamos la presencia de la PRL 16K en la circulación de la rata. Inicialmente las muestras de suero directo fueron procesadas e inmunoteñidas con el antisuero anti-PRL 23K. La máxima cantidad de suero para ser fraccionada por electroforesis fueron 2.5 microlitros. En cantidades mayores las proteínas séricas distorsionan el corrimiento de las bandas impidiendo una separación adecuada. La tinción con el anti-PRL 23K mostró en las muestras de suero directo la presencia de varias bandas inmunorreactivas. La banda de PRL 23K fue la más aparente y en ocasiones se observó unida a una zona artificial producida por la alta concentración de las proteínas séricas (Fig. 6). Asimismo fue aparente la presencia de una banda de 16 kDa con inmunorreactividad de PRL (Fig 6).

Con el propósito de determinar si la alta concentración de las proteínas séricas eran capaces de distorsionar la migración de esta variante inmunorreactiva, ultrafiltramos el suero a través de una membrana Diaflo capaz de retener proteínas mayores a 30 000 Da de peso molecular. Para ello adicionamos al suero una cantidad igual del amortiguador de muestra de electroforesis en condiciones reductoras sin glicerol. El suero filtrado se concentró 10 veces (concentrador Savant) y se fraccionó por electroforesis. La Fig. 7 muestra la inmunotransferencia teñida con anti PRL 23K del suero directo (D), filtrado (F) ó filtrado y concentrado (F&10X). El suero directo muestra la banda de PRL 23K, bandas inmunorreactivas de alto peso molecular (rango de la zona artificial) y la banda de 16 kDa. Esta banda se logró aislar y concentrar significativamente. Estos resultados demuestran la presencia de una banda de 16 kDa con inmunorreactividad de PRL en la

circulación de la rata que podría corresponder al fragmento N-terminal de la PRL ó PRL 16K. Sin embargo, estos geles fueron corridos en condiciones reductoras de manera que estos resultados no nos permiten discernir si esta proteína 16K inmunorreactiva endógena corresponde a la forma cortada y/o a la PRL 16K como tal. Por otra parte su concentración aparente en el suero sin concentrar es cercana a los límites de detección de nuestro ensayo con este anticuerpo (500 picogramos) lo que obstaculiza su detección en las muestras de suero analizadas. Es posible que sus concentraciones bajas reflejen su concentración real y/o su baja reactividad con el anticuerpo a PRL 23K. La PRL 16K posee sólo el 2% de la inmunorreactividad de la PRL 23K por su anticuerpo en el RIA (121). Para analizar si los niveles de PRL 16K están siendo subestimados mediante los inmunoblots revelados con el anti-PRL 23K generamos y utilizamos un anticuerpo policlonal contra nuestra preparación estándar de PRL 16K.



**Figura 6.- DETECCION DE UNA BANDA DE 16kDa CON INMUNORREACTIVIDAD DE PRL EN EL SUERO.** Inmunotransferencia de los estándares de PRL 23 y 16K y de 2.5 ul de suero de una rata hembra. Las proteínas se transfirieron de geles de acrilamida al 15 % en presencia de SDS y condiciones reductoras. La inmunotinción se realizó con el anti-PRL 23K (dil. 1:500) y segundos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina.



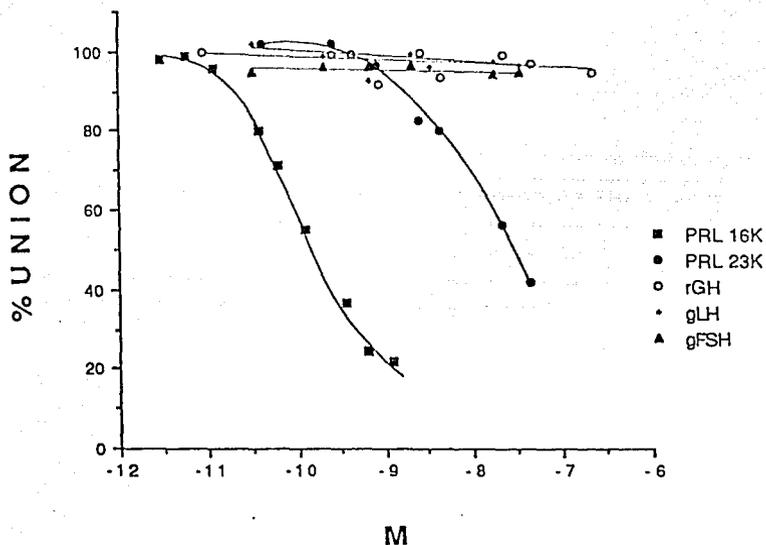
**Figura 7.- SEPARACION Y CONCENTRACION DE LA BANDA INMUNORREACTIVA DE 16 KDA PRESENTE EN EL SUERO.** Inmunotransferencias de los estándares de PRL 23 y 16K y de un suero de ratas hembra fraccionado por electroforesis en condiciones reductoras ya sea directamente (D, 2.5 ul), después de ser ultrafiltrado (F, dialfo 30K, 10 ul) o ultrafiltrado y concentrado 10 veces (F&[10], 10 ul). La inmunotinción se realizó con el anti-PRL 23K (dil. 1:500) y segundos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina.

1b) ANTICUERPO CONTRA PRL 16K.

1b.i) Especificidad del anticuerpo contra PRL 16K.

Un criterio para evaluar la especificidad del anticuerpo generado en el laboratorio contra la PRL 16K fue la comparación de las reactividades cruzadas de la PRL 16K versus la PRL íntegra y otras hormonas hipofisarias (GH de rata, LH y FSH caprinas) mediante un radioinmunoensayo desarrollado por nosotros. La Fig. 8 muestra las curvas estándar obtenidas con el anti-PRL 16K del fragmento de la PRL 16K y de la PRL 23K, así como el entrecruzamiento con las otras hormonas.

### RIA de PRL 16K



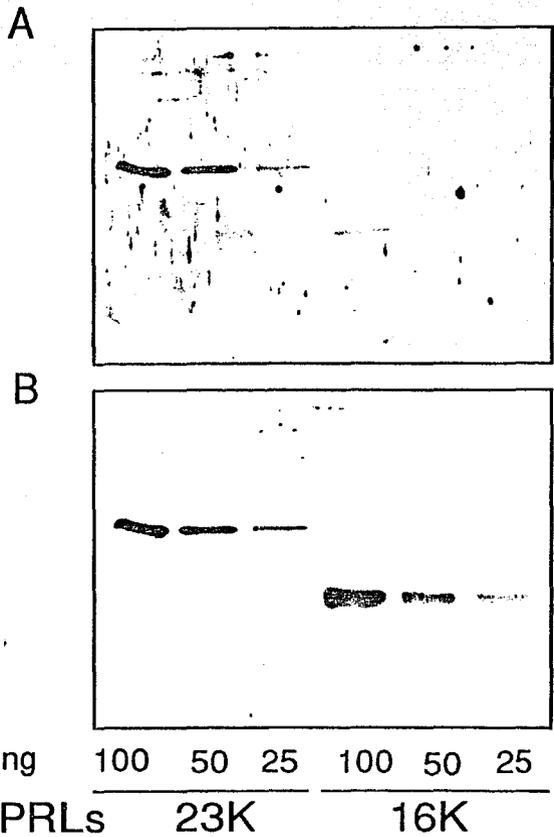
**Figura 8.- ESPECIFICIDAD DEL ANTICUERPO ANTI-PRL 16K MEDIANTE RADIOINMUNOENSAYO (RIA).** Se hicieron curvas de desplazamiento empleando  $^{125}\text{I}$ -PRL 16K contra las diferentes hormonas analizadas: PRL 16K, PRL 23K, hormona de crecimiento de rata (rGH), hormona luteinizante de cabra (gLH) y hormona folículo estimulante de cabra (gFSH). Se muestran las concentraciones de las hormonas en molaridad. El CV intra ensayo resultó ser de 3.07% (n=6), mientras que el CV interensayo fue de 9.68 % (n=6).

Como puede observarse, el anticuerpo anti-PRL 16K resultó ser altamente específico para la detección de la variante de 16 kDa. La  $IC_{50}$  (concentración capaz de desplazar el 50 % del antígeno radiactivo) para la PRL 16K es de  $1.5 \times 10^{-10}$  M, mientras que la  $IC_{50}$  para la PRL 23K resultó ser de  $2.7 \times 10^{-8}$  M, siendo aproximadamente 200 veces más sensible este anticuerpo para detectar a esta variante mediante RIA. A la vez, ni la GH de rata, ni la FSH ó LH caprinas presentaron reactividad cruzada con el anti-PRL 16K aún a concentraciones muy altas ( $10^{-6}$  M).

Asimismo comparamos la especificidad del anti-PRL 23K y el anti-PRL16K en el sistema de electrotransferencia e inmunotinción para detectar a las PRLs 16K y 23K. La figura 9 muestra las inmunotransferencias de diferentes concentraciones de los estándares de PRL 23 y 16K (100, 50 y 25 ng) inmunoteñidos con el anti PRL 23K (panel A) o con el anti-PRL 16K (panel B), ambos a una misma dilución (1/500). Como se observa en esta figura, el anti PRL 23K es menos sensible para detectar a la PRL 16K. Las bandas de los dos estándares son más intensas reveladas con el anti PRL 16K que con el anti-PRL 23K. Si bien el anti PRL 16K revela ambas PRLs su sensibilidad para detectar a la PRL 16K es considerablemente mayor. Los valores densitométricos de las bandas correspondientes revelaron que el anti PRL 16K es 4 veces más sensible para detectar a la PRL 16K que a la PRL 23K. A la inversa y como se esperaba, el anti PRL 23K fue más sensible (2 veces más) para detectar a la PRL 23K que a la PRL 16K a juzgar por la cuantificación densitométrica de estas diferencias.

1b.ii) PRLs detectadas por el Anti-PRL 16K en la circulación.

Comparamos la detección por ambos anticuerpos de las PRLs presentes en muestras de suero directo (Fig. 10). En esta figura se muestran las transferencias procesadas en paralelo conteniendo la misma concentración de los estándares de las PRLs 23 y 16K (500 ng), así como las mismas muestras de suero procesadas bajo condiciones reductoras y no reductoras. Uno de los inmunoblots fue revelado con el anti-PRL 23K (panel superior) y el otro con el anti-PRL 16K (panel inferior). De acuerdo a lo esperado el empleo del anti PRL 16K mostró una mayor sensibilidad para teñir los estándares de ambas PRLs que el anti PRL 23K a una misma dilución (1/500). Asimismo con el anti-PRL 16K, la intensidad de la banda de PRL 16K fue considerablemente mayor a la de la banda de PRL 23K. Incluso este anticuerpo detectó una banda de 16 kDa que contaminaba al estándar de PRL 23K. La intensidad de esta banda contaminante fue considerablemente mayor a la de la banda de PRL 23K. Sin embargo el anti-PRL 23K apenas sí detectó esta banda contaminante de 16 kDa en el estándar de PRL 23K.



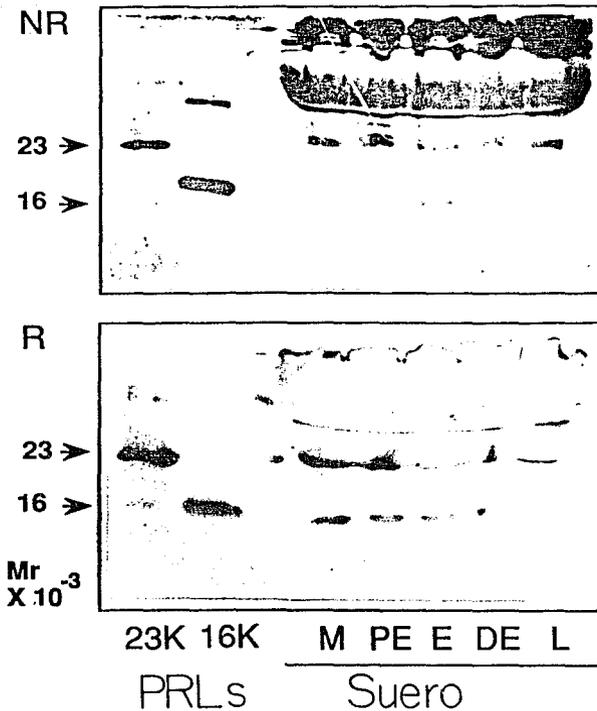
**Figura 9.-EL ANTICUERPO ANTI-PRL 16K DETECTA MEJOR A LA PRL 16K.** Se hicieron inmunotransferencias de los mismos estándares de PRL 23K y PRL 16K a diferentes concentraciones (ng) y se incubaron con el anti-PRL 23K (panel A) o con el anti-PRL 16K (panel B) a una misma dilución (1:500). Para el revelado se utilizaron segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano y sustratos quimioluminiscentes.



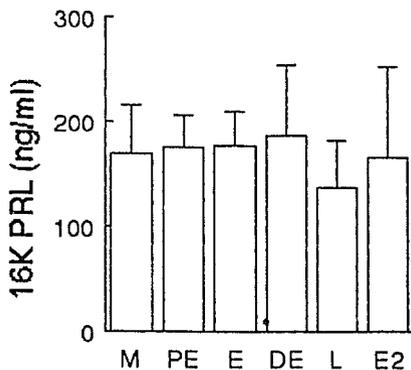
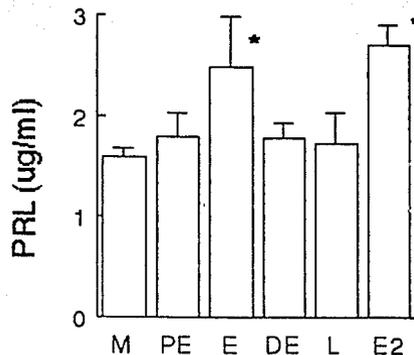
De igual manera, en las mismas muestras de suero, con el anti-PRL 23K no se detecta ninguna banda en posición 16K (panel superior). En contraste el anticuerpo anti-PRL 16K reveló una banda muy intensa de 16 kDa (panel inferior). La intensidad de esta banda de 16 kDa detectada bajo condiciones no reductoras es un poco mayor a la intensidad de la banda respectiva observada bajo condiciones reductoras. Dado que la banda de 16K inmunorreactiva se observa bajo condiciones no reductoras en el suero directo, podemos afirmar que ésta podría corresponder efectivamente a PRL 16K y no a PRL cortada, la cual bajo condiciones no reductoras migra con un peso molecular aparente de 25 kDa (59) y no contribuye a la banda detectada de 16 kDa. Asimismo, estos resultados denotan que la detección de esta proteína tipo PRL depende de la especificidad del anticuerpo. Consecuentemente dicha proteína está presente en el suero y su detección ha sido subestimada por el empleo de anticuerpos poco sensibles.

Empleando el antisuero anti-PRL 16K, detectamos la presencia de una banda de 16K inmunorreactiva en el suero de ratas macho (M) y ratas hembra bajo diferentes estadios fisiológicos (proestro 'P', estro 'E', diestro 'D' y lactantes 'L'). Como se observa en la inmunotransferencia de la Fig. 11, bajo condiciones no reductoras es clara la banda de 16 kDa inmunorreactiva en todos los estadios fisiológicos analizados. Asimismo se observan bandas de 25 y 23 kDa, correspondientes a la PRL cortada e íntegra. Bajo condiciones reductoras las mismas muestras presentan la banda de 16 kDa pero más intensa que en condiciones no reductoras, sugiriendo la contribución de la PRLc. La banda de PRL 16K muestra grandes variaciones en intensidad dentro y entre los diferentes estadios fisiológicos analizados. El análisis densitométrico de cinco experimentos independientes reveló una diferencia significativa entre los niveles detectados en machos y hembras ( $p < 0.05$ ). No hubo diferencias significativas a lo largo del ciclo reproductor (Fig. 12).

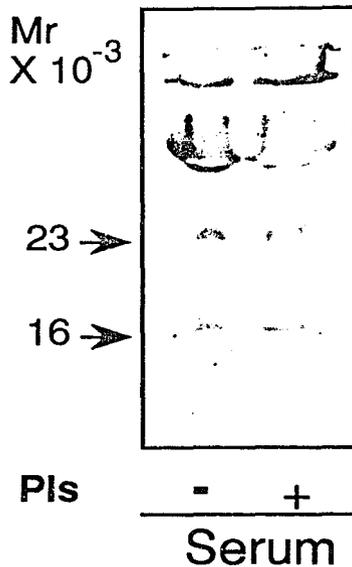
Descartamos la naturaleza artificial de las bandas inmunorreactivas de 16 kDa observadas en el suero adicionando a la sangre al momento de ser colectada dos inhibidores de proteasas (PMSF 1mM y Aprotinina 100 kIU/ml) que se sabe inhiben la actividad de las enzimas que cortan a la PRL (135). La Figura 13 muestra dos sueros de rata tanto en ausencia como en presencia de los inhibidores de proteasas en inmunotransferencias con el anti-PRL 16K de geles corridos bajo condiciones no reductoras. En ambos casos se observa claramente la banda de 16 kDa inmunorreactiva en las muestras analizadas, siendo muy similar en intensidad, lo que descarta la posibilidad de que la proteína inmunorreactiva de 16 kDa se generase artificialmente por la manipulación de las muestras al momento de ser obtenidas.



**Figura 11.- DETECCIÓN DE PRL 16K INMUNORREACTIVA EN SUERO DE RATAS BAJO DIFERENTES ESTADIOS FISIOLÓGICOS.** Se hicieron inmunotransferencias de sueros (2.5 ul) de ratas macho (M) y hembras en proestro (P), estro (E), diestro (DE) y lactantes (L). Las proteínas se transfirieron de gels en presencia de SDS en condiciones no reductoras (NR) o reductoras (R). La inmunotinción se realizó con anti-PRL 16K y segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa en presencia de sustratos quimioluminiscentes. Los números a la izquierda indican las posiciones de los estándares de PRL 23K y 16K.



**Figura 12.- CONCENTRACIONES DE PRL 23K Y PRL 16K EN EL SUERO DE RATAS EN DIFERENTES ESTADIOS FISIOLÓGICOS.** Se hicieron densitometrías de las bandas inmunorreactivas de PRL 23K y PRL 16K presentes en el suero de ratas macho (M), y hembras en proestro (PE), estró (E), diestro (DE), lactante (L) y tratadas con estrógenos (E2). Se muestran las concentraciones en ug/ml o ng/ml. Las mediciones corresponden a 5 casos diferentes de cada estadio analizado. (\*) corresponde a una  $p < 0.05$ .

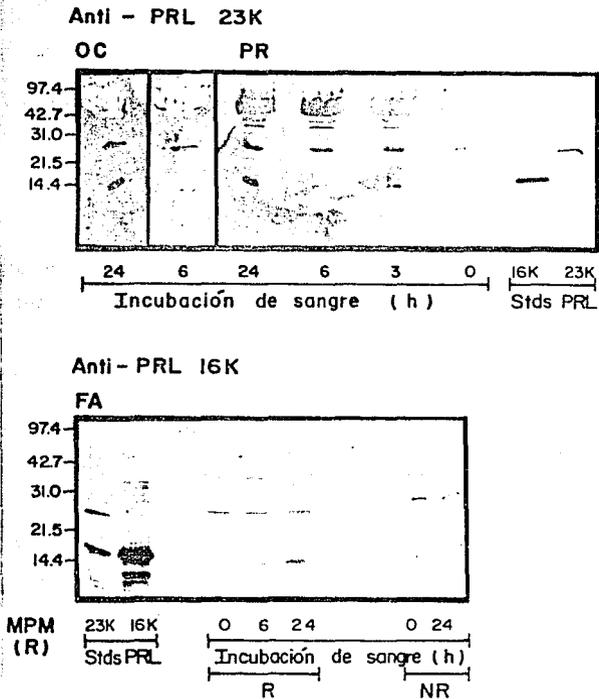


**Figura 13.- DETECCIÓN DE LA PRL 16K INMUNORREACTIVA DEL SUERO EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.** Se hicieron inmunotransferencias de los estándares de PRL 23K y 16K y del suero de una misma rata obtenido en ausencia (-) o presencia (+) de los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM) y Aprotinina (100 kIU/ml). Las proteínas se transfirieron de geles en presencia de SDS bajo condiciones no reductoras. La inmunotinción se realizó con anti-PRL 16K (dil. 1:500) y segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano sobre sustratos quimioluminiscentes.

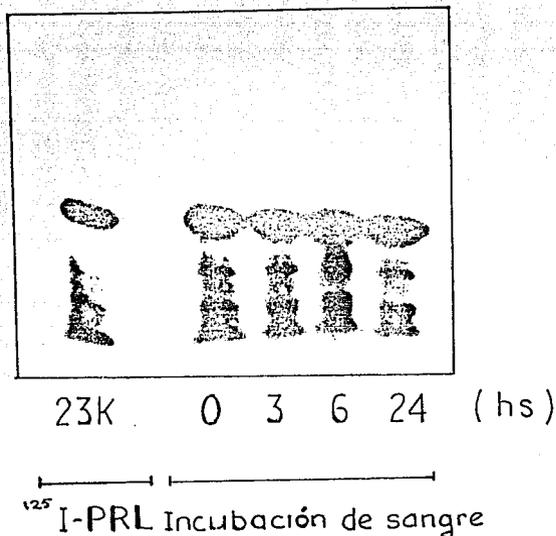
1b.iii) Efecto de la incubación de la sangre sobre la PRL 16K detectada en el suero.

Si bien la PRL 16K se encuentra presente en las muestras del suero directo fraccionada por electroforesis inmediatamente después de haber sido obtenidas (resultados mostrados) observamos que podíamos incrementar marcadamente la cantidad detectada de PRL 16K a través de obtener el suero después de la incubación a 4 C de la sangre completa por diversos períodos. La Figura 14 muestra el efecto de incubar la sangre a 4 C por distintos períodos de tiempo sobre la banda de PRL 16K inmunorreactiva en inmunotransferencias reveladas con el anti-PRL 23K (panel A) y el anti PRL-16K (panel B). La intensidad de la banda de PRL 16K aumenta en función del período de incubación. En contraste la intensidad de la banda de PRL 23K no se modifica. Las distintas técnicas de revelado de la inmunorreacción: segundos anticuerpos acoplados a peroxidasa de rábano (HP), fosfatasa alcalina (AP) y oro coloidal (OC), mostraron los mismos cambios sobre la PRL 16K. Es interesante notar que los distintos métodos de revelado coinciden en reconocer a las bandas de ambas PRLs (23 y 16K) como las más significativas y/o únicas en el suero, bajo estas condiciones. Asimismo, las bandas inmunoreactivas de mayor peso molecular desaparecen bajo la tinción de oro coloidal (OC), lo que señala su posible naturaleza artificial.

El efecto de incubación de la sangre no parece ser consecuencia de la proteólisis de la PRL circulante hacia la forma cortada, ya que se observa la misma intensidad en la banda de PRL 16K bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). Aun más, el hecho de no observar una disminución en la concentración de la banda de PRL 23K concomitantemente al aumento de la PRL 16K a consecuencia de la incubación de la sangre sugiere que el aumento en la PRL 16K no parece ser a consecuencia de la proteólisis de la PRL 23K endógena durante la incubación. Sin embargo, para analizar esta posibilidad adicionamos PRL 23K marcada isotópicamente a la sangre y la incubamos a 4C por los distintos períodos de tiempo. La autorradiografía de los geles respectivos (Fig. 15) mostró que la PRL 23K radioactiva añadida a la sangre no se modificó durante el proceso de incubación y apoya la posibilidad de que el aumento en la PRL 16K a consecuencia de la incubación de la sangre no parece resultar de la proteólisis de la PRL 23K endógena durante dicha incubación y sí quizás de otros factores tales como una mayor extracción de la PRL 16K endógena favorecida por el proceso de incubación.



**Figura 14.- INCREMENTO DE BANDA DE PRL 16K INMUNORREACTIVA EN EL SUERO POSTERIOR A LA INCUBACION DE LA SANGRE.** Inmunotransferencias de sueros de rata hembra obtenidos antes o después de incubar la sangre completa por diferentes períodos de tiempo (h) a 4 C. *Panel Superior:* Las proteínas séricas se transfirieron de geles SDS-PAGE en condiciones reductoras. Los blots fueron teñidos con el anti-PRL 23K (dil. 1:500) y segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano (PR) u oro coloidal (OC). *Panel inferior:* Las proteínas séricas se transfirieron de geles en presencia de SDS tanto en condiciones reductoras (R) como no reductoras (NR). Los blots fueron teñidos con anti-PRL 16K (dil. 1:500) y segundos anticuerpos conjugados a fosfatasa alcalina (FA).

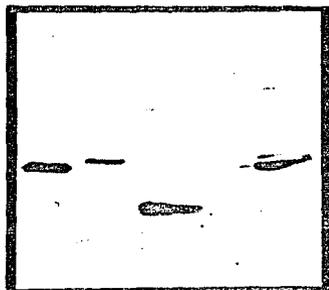


**Figura 15.- LA  $^{125}\text{I}$ -PRL 23K NO ES MODIFICADA POR LA INCUBACION DE LA SANGRE.** Autorradiografía de geles de poliacrilamida en presencia de SDS mostrando el estándar de  $^{125}\text{I}$ -PRL 23K antes y después de ser incubado con la sangre completa por diferentes tiempos (h) a 4 C. Las muestras son las mismas de la figura anterior.

#### **D. DETECCION DE LA PRL 16K EN LA HIPOFISIS ANTERIOR.**

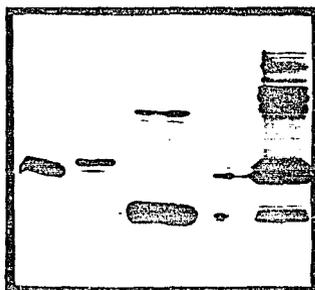
Exploramos la presencia de la PRL 16K en homogenados de hipófisis anterior, y observamos que el anticuerpo generado contra la PRL 16K, al igual que en las muestras del suero, detectó una cantidad mayor de PRL 16K y de PRL cortada que el anticuerpo contra PRL 23K.

Anti - PRL 23K



I C E  
 ┌───┬───┐ 16K ♀  
 23K  
 ┌──────────┐ AH  
 Stds PRL

Anti - PRL 16K



I C E  
 ┌───┬───┐ 16K ♀  
 23K  
 ┌──────────┐ AH  
 Stds PRL

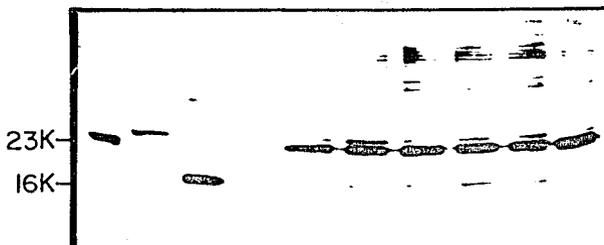
**Figura 16.- COMPARACION DE UN HOMOGENADO DE HA REVELADO CON LOS ANTICUERPOS ANTI-PRL 23K Y ANTI-PRL 16K.** Inmunotransferencias de los mismos estándares de PRL 23K (intacta, I, y cortada, C) y de PRL 16K así como de un mismo homogenado de adenohipófisis (AH, 5 ul) de una rata en estro. Todas las muestras se corrieron dentro de un mismo gel en presencia de SDS bajo condiciones no reductoras. Los blots se incubaron con el anti-PRL 23K (1:500) o el anti-PRL 16K (1:2000) y segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano.

Ambos anticuerpos detectaron básicamente las mismas variantes inmunorreactivas: variantes de alto peso molecular (rango 55 a 100 kDa) y PRLs de 25, 23 y 16 kDa, como se muestra en geles corridos en condiciones no reductoras y transferidos a nitrocelulosa (Fig. 16). Nuevamente el anti-PRL 16K detectó proporcionalmente más PRLc y PRL 16K que PRL 23K en comparación al anti-PRL 23K.

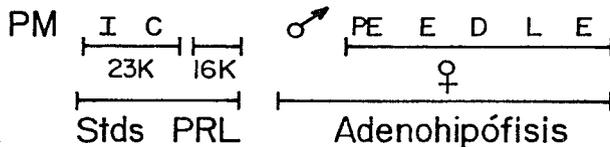
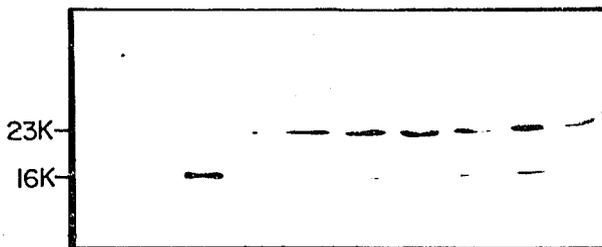
El anti-PRL 16K mostró la presencia de las variantes de PRL cortada y 16K en las adenohipófisis de ratas bajo los diferentes estadios fisiológicos (Fig. 17) como puede observarse en muestras corridas en geles bajo condiciones no reductoras (panel A). Las bandas inmunorreactivas de mayor peso molecular a la PRL 23K parecen ser agregados por puentes disulfuro ya que desaparecen al analizar las mismas muestras bajo condiciones reductoras (panel B). Bajo estas condiciones desaparece la banda de 25 kDa y sólo permanecen las bandas de 23 y 16 kDa. El análisis densitométrico de las bandas inmunorreactivas en 5 experimentos distintos reveló diferencias significativas entre los niveles detectados en HA de machos y hembras ( $p > 0.05$ ), sin embargo, tampoco hubo diferencias significativas a través del ciclo reproductor (Fig. 18).

El proceso de homogenización del tejido adenohipofisario pudiera implicar la ruptura de organelos tales como lisosomas, con la consiguiente liberación de una variedad de enzimas, entre ellas diversas proteasas. Para excluir la posibilidad de que la banda de 16 kDa inmunorreactiva pudiera generarse a consecuencia de la acción de proteasas endógenas agregamos al amortiguador de homogenización (pH 10) un coctel de inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, Aprotinina 100 kIU/ml). La Fig. 19 muestra la comparación bajo condiciones no reductoras entre dos homogenados de una misma adenohipófisis tanto en ausencia como en presencia de los inhibidores de proteasas. En ambos casos se observa la presencia de la banda de 16K inmunorreactiva con una intensidad similar en ambos casos, lo que apoya que la proteína inmunorreactiva observada no es consecuencia de la proteólisis hormonal durante el procesamiento de las muestras.

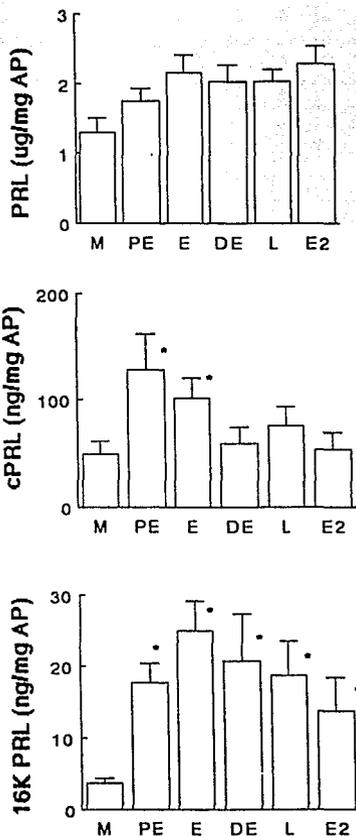
Anti - PRL 16K  
NR



R

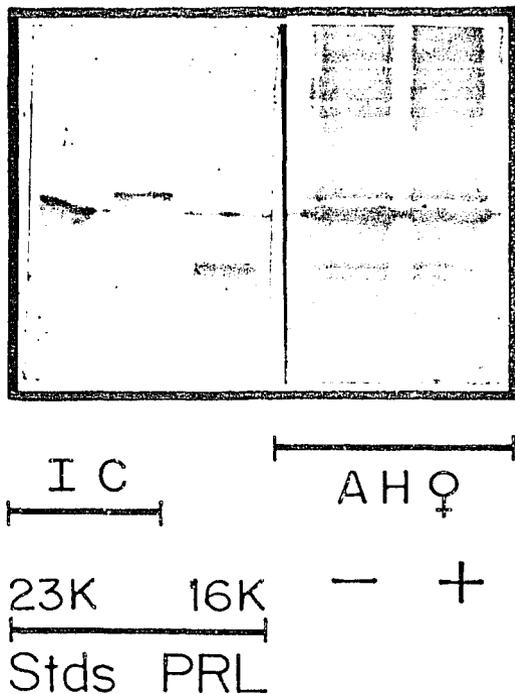


**Figura 17.- DETECCIÓN DE PRL 16K INMUNORREACTIVA EN LA HIPOFISIS ANTERIOR DE RATAS BAJO DIFERENTES ESTADIOS FISIOLÓGICOS.** Se hicieron inmunotransferencias de estándares de PRL 23K (intacta, I, cortada, C) y PRL 16K, así como de homogenados de adenohipófisis (5 ul) de ratas macho y hembras en proestro (P), estro (E), diestro (DE), lactantes (L) y tratadas con estrógenos (E<sub>2</sub>). Las proteínas se transfirieron de geles en presencia de SDS en condiciones no reductoras (NR) o reductoras (R). La inmunotinción se realizó con anti-PRL 16K y segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa. Los números a la izquierda indican las posiciones de los estándares de PRL 23K y 16K.



**Figura 18.- CONCENTRACIONES DE LAS PRLs ANALIZADAS EN LA HIPOFISIS ANTERIOR DE RATAS EN DIFERENTES ESTADIOS FISIOLÓGICOS.** Se hicieron densitometrías de las bandas inmunorreactivas de PRL 23K, PRL cortada y PRL 16K presentes en las adenohipófisis de ratas macho (M), y hembras en proestro (PE), estro (E), diestro (DE), lactante (L) y tratadas con estrógenos (E2). Se muestran las concentraciones en ug o ng/mg de tejido. Las mediciones corresponden a 5 casos diferentes de cada estadio analizado. (\*) corresponde a una  $p < 0.05$ .

# Anti - PRL 16K



**Figura 19.- PRL 16K INMUNORREACTIVA EN LA HIPOFISIS EN PRESENCIA DE INHIBIDORES DE PROTEASAS.** Se hicieron inmunotransferencias de los estándares de PRL 23K (intacta, I, cortada, C) y PRL 16K así como de homogenados de hipófisis anterior de una misma rata obtenidos en ausencia (-) o presencia (+) de los inhibidores de proteasas PMSF (1 mM) y Aprotinina (100 kIU/ml). Las proteínas se transfirieron de geles en presencia de SDS bajo condiciones no reductoras. La inmunotinción se realizó con anti-PRL 16K (dil. 1:500) y segundos anticuerpos conjugados a peroxidasa de rábano sobre sustratos quimioluminiscentes.

## VIII. DISCUSION.

Nuestros resultados muestran claramente la presencia de una banda de 16 kDa con inmunorreactividad de PRL tanto en el suero como en la adenohipófisis de rata bajo los diferentes estadios fisiológicos analizados. En la mayoría de los experimentos utilizamos el método de electrotransferencia descrito por Sha y Hymer (51) adaptándolo a nuestro sistema de minigeles, dado que con este método ellos lograron observar la presencia de una banda de 17 kDa con inmunorreactividad de PRL en homogenados de adenohipófisis bajo condiciones no reductoras y reductoras en el medio de incubación de lactotropos. Asimismo con este método, aunque bajo condiciones reductoras, se detectó en la circulación del ratón una banda de 16 kDa con inmunorreactividad de PRL (64). Este método es básicamente similar al descrito por Towbin (134) a excepción del prefijado de los geles antes de la transferencia y el uso de Tris 100 mM (pH 9.7) como amortiguador de transferencia. De esta manera se omite el uso de metanol durante la electrotransferencia. Estas condiciones pudieran incrementar la eficiencia de transferencia para la PRL 16K. Se ha descrito que el metanol puede interferir con el pegado de las proteínas a la matriz de nitrocelulosa (137).

Si bien este método es adecuado para valorar a la PRL 16K endógena no lo es tanto para la PRL 23K. Esta última se transfiere en menor proporción al papel de nitrocelulosa que la primera, cuya transferencia es total. Curiosamente la menor transferencia de la PRL 23K se observa cuando los geles son corridos en condiciones reductoras. Bajo condiciones no reductoras la transferencia de ambas PRLs es total. Para evitar una subestimación de los niveles endógenos de la PRL 23K todas las cuantificaciones se hicieron en geles bajo condiciones no reductoras, y/o utilizando el método de transferencia de Towbin adaptado por Bio-Rad donde la transferencia de ambas PRLs es total.

Mediante el uso del anticuerpo específico contra la PRL 23K la PRL 16K es apenas perceptible y se encuentra en los límites de detección del ensayo aún bajo condiciones reductoras. Su detección bajo condiciones no reductoras fue inconsistente. Estos bajos niveles reflejan la baja sensibilidad del anticuerpo contra la PRL 23K para reconocer a la PRL 16K. Ya se ha reportado\* que posee una inmunorreactividad cruzada muy baja (2%) por RIA contra la variante de PRL 16K (121). En nuestro estudio documentamos estas evidencias utilizando otro método de inmunodetección. En SDS-PAGE-Transferencia-inmunotinción la capacidad del anti-PRL 23K de detectar

al estándar de PRL 16K es dos veces menor que su capacidad de detectar al estándar de PRL 23K. En contraste el anti-PRL 16K fue más sensible (cuatro veces) para detectar al estándar de PRL 16K que de PRL 23K. Esta selectividad se ilustra aún más en el RIA donde la especificidad de este anticuerpo por la PRL 16K fue de aproximadamente 2 órdenes de magnitud (200 veces más). Asimismo este anticuerpo no reconoce a la hormona de crecimiento (GH) que comparte un alto grado de homología en su secuencia de aa con la PRL, ni a otras hormonas adenohipofisarias.

Es claro que el empleo de un anticuerpo dirigido contra la propia PRL 16K es un factor decisivo para la detección de esta variante. Numerosos estudios han evaluado estas variantes de PRL mediante inmunotransferencias reveladas con anti-PRL 23K (S-9, NIH) en homogenados y medios de incubación de adenohipófisis y en la circulación de diversas especies (39,51,63,64). En estos estudios no se ha reportado la presencia de la PRL 16K como tal a excepción de los trabajos de Sha y Hymer (51) y de Mena y cols (39). Asimismo el análisis de estas variantes en la circulación ha sido precedida del paso obligado de la inmunoprecipitación con el anti-PRL 23K antes de fraccionar las muestras por electroforesis. De tal manera es claro que bajo estas condiciones se ha impedido la detección y/o subestimado los niveles endógenos de la PRL 16K.

Recientemente Casabiel et al. puso en duda la presencia endógena de la PRL cortada así como de la variante de PRL 16K (138). El argumentó que la PRL cortada reportada previamente (Mittra, Sinha) procedía de un artefacto producido durante la extracción y diálisis de los homogenados de los tejidos respectivos a consecuencia de la acción de proteasas ácidas endógenas capaces de cortar a la PRL y generar los fragmentos subsecuentes. Sin embargo, no en todos los trabajos que demuestran la PRL cortada se procesan y dializan las muestras (51,64). En nuestro trabajo utilizamos muestras de suero directo sin ningún procesamiento adicional o en la presencia de inhibidores de proteasas. Asimismo la PRL marcada adicionada a la sangre antes de obtener el suero no se modificó durante el manejo de la muestra. De la misma manera las variantes respectivas estuvieron presentes tanto en sueros como en homogenados directos de hipófisis obtenidos ambos en ausencia o presencia de inhibidores de las proteasas específicas para cortar PRL. Estos resultados nos permiten descartar la posible naturaleza artificial de estas variantes.

Ahora bien, esta molécula tipo PRL 16K (mt-PRL 16K) está presente en todos los estadíos fisiológicos analizados. Si bien es clara su mayor concentración en la hipófisis y suero de las hembras vs. los machos, las diferencias a lo largo del ciclo reproductor no fueron

consistentes. Asimismo nuestra cuantificación tampoco muestra las diferencias significativas que se sabe tienen lugar para la PRL 23K a través del ciclo. Por tanto estos resultados pueden reflejar limitaciones para la cuantificación asociados a este sistema de detección. Asimismo es posible que no hayamos considerado las condiciones fisiológicas en las que dicha PRL 16K se produzca diferencialmente.

Si bien la mt-PRL 16K está presente en el suero, su concentración puede incrementarse considerablemente mediante la incubación de la sangre completa por períodos de tiempo prolongados (24 h) a 4 C. Exploramos la posibilidad de que este incremento en la PRL 16K sucediera a expensas de la proteólisis de la PRL 23K presente en la sangre. Nuestros resultados sugieren que éste no parece ser el caso. No se observó ninguna disminución y/o modificación en la PRL 23K marcada isotópicamente y añadida a la sangre antes de su incubación. Ignoramos la causa del incremento en la concentración de la mt-PRL 16K a consecuencia de la incubación de la sangre, una posibilidad a considerar podría ser el que dicha mt-PRL 16K esté unida a algún elemento de la sangre y que la incubación por espacios prolongados de la sangre completa favorezca su extracción. Se sabe que algunos tipos celulares del sistema inmune normales y transformados contienen receptores para PRL (105) y que la PRL 16K tiene efecto sobre algunos de ellos (121). El análisis de la ubicación de la PRL 16K en los distintos compartimientos sanguíneos permitirá esclarecer esta posibilidad. Por otra parte, el poder obtener una mayor cantidad de PRL 16K mediante este procedimiento constituirá una herramienta muy útil en experimentos futuros para poder lograr el aislamiento de dicha mt-PRL 16K con el propósito de determinar su identidad.

Ignoramos si la PRL 16K presente en el suero proviene de aquella producida en la hipófisis anterior y/o de fuentes periféricas alternativas. Los experimentos de incubación con la sangre completa parecen sugerir un mecanismo de atrapamiento y/o generación de la PRL 16K a partir de algún componente de la sangre. Dados los efectos antiangiogénicos de esta molécula su presencia en los vasos sanguíneos podría jugar un papel regulatorio de estos efectos.

Nuestros resultados demuestran de forma clara la presencia de una proteína de 16 kDa con inmunoreactividad de PRL en muestras de suero directo y en homogenados adenohipofisarios procesados tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. De esta manera podemos descartar su naturaleza de PRL cortada. Sus niveles son variables aunque son siempre menores a los de la PRL 23K (entre 10 a 100 veces menos). Esta proteína comparte dos de las propiedades de la PRL 16K: inmunoreactividad y tamaño. Sin embargo, si bien estas

propiedades sugieren su posible naturaleza de PRL 16K, no son suficientes para identificarse como tal. Se requiere determinar sus propiedades biológicas y fundamentalmente su secuencia estructural para identificar su naturaleza.

Dado que la PRL 16K posee efectos propios mediados por receptores específicos, la demostración de su presencia endógena la convierte en un nuevo factor de regulación. El desarrollo de anticuerpos específicos y de la metodología sensible, descrita en este trabajo, capaz de detectar los niveles endógenos de la PRL 16K permitirá en estudios posteriores caracterizar cuidadosamente sus fuentes de producción así como su regulación.

## **IX. CONCLUSIONES.**

**1.-** Se encuentra presente una proteína de 16 kDa con inmunorreactividad de prolactina tanto en el suero como la hipófisis anterior de la rata, en todos los estadíos fisiológicos analizados.

**2.-** Los niveles de la proteína inmunorreactiva de 16 kDa son siempre menores en los machos respecto a las hembras. Asimismo, dicha proteína se encuentra en mucho menor concentración (10 a 100 veces menos) que la prolactina íntegra en los tejidos analizados.

**3.-** La detección de la PRL 16K endógena ha sido subestimada debido al empleo de antisueros anti-PRL con una baja reactividad cruzada contra la PRL 16K.

**4.-** La identificación de la banda de 16 kDa con inmunorreactividad de PRL como la PRL 16K requiere de su caracterización bioquímica y biológica.

## X. BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Li C.H. (1974) Chemistry of ovine prolactin. In: *Handbook of physiology*. Endocrinology part 2. Ed. Knobil, Sawyer. pp. 103-110. Am. Physiol. Soc.
- 2.- Fluckiger E., Del Pozo E., Von Werder K. Eds. (1982) *Prolactin. Physiology, pharmacology and clinical findings*. Springer-Verlag.
- 3.- Parlow A.F. and Shome B. (1976) Rat prolactin: the entire linear aminoacid sequence. *Fed. Proc.* **35**: 219.
- 4.- Cooke N.E., Coit D., Weiner R.I., Baxter J.D., Martial J.A. (1980) Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger. *Journal of Biological Chemistry* **255**:6502-6510.
- 5.- Miller W.L., Eberhardt N.L. (1983) Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrine Reviews* **4**(2): 97-130.
- 6.- Wallis M. (1981) The molecular evolution of pituitary growth hormone, prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J. Mol. Evol.* **17**:10-18.
- 7.- Gubbins E.J., Maurer R.A., Lagrimini M., Erwin C.R., Donelson J.E. (1980) Structure of the rat prolactin gene. *J. Biol. Chem.* **255**:8655-8662.
- 8.- Cooke N.E., Spierer C., Levan G. (1986). The related genes encoding growth hormone and prolactin have been dispersed to chromosomes 10 and 17 in the rat. *Endocrinology* **119**:2451-2459.
- 9.- Owerbach D., Rutter W.J., Cooke N.E., Martial J.A., Shows T.B. (1981) The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* **212**:815-816.
- 10.- Shull J.D., and Gorski J. (1986) The hormonal regulation of prolactin gene expression: an examination of mechanisms controlling prolactin synthesis and the possible relationship of estrogen to these mechanisms. In: *Vitamins and Hormones, Academic Press Vol. 43*, pp.197-247.
- 11.- Mena F., Aguayo D., Hummelt G., Morales M.T. (1992). Regulación y control de la secreción de prolactina en la rata. *Rev. Fac. Med. UNAM, Vol. 35 (3) julio-septiembre*.
- 12.- Fraser I.S., Lun Z.G. (1990) Polymers of prolactin and their clinical significance. *Obstetrical and gynecological survey* **45**(8):515-520.

- 13.- Mena F., Hummelt G., Aguayo D., Clapp C., Martínez de la Escalera G., and Morales M.T. (1992). Changes in molecular variants during *in vitro* transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology* **130** (6):3365-3377.
- 14.- Suh H.K. and Frantz A.G. (1974) Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **39**:928-935.
- 15.- Wallis M., Daniels M., Ellis S.A. (1980) Size heterogeneity of rat pituitary prolactin. *Biochem. J.* **189**:605-614.
- 16.- Pansini F., Bergamini C.M., Malfaccini M., Cocilovo G., Cinciano M., Jacobs M and Bagni B. (1984) Multiple molecular forms of prolactin during pregnancy in women. *J. Endocrinol.* **106**:81-85.
- 17.- Kiefer K.A., Malarkey W.B. (1978) Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: experimental conditions that alter gel filtration. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **46**:119-124.
- 18.- Whitaker M.D., Klee G.G., Kao P.C., Randall R.V., Hesser D.W.(1984) Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**:826-830.
- 19.- Allolio B., Hoepfner A., Leonhardt U., Deub U., Winkelmann W. (1987) Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in patients with prolactinoma. *Acta Endocrinologica (Copenh)* **114**:475-482.
- 20.- Farkouh N.H., Parker M.G., Frantz A.G. (1979) Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: high proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J.Clin. Endocrinol. Metab.* **48**:1026.
- 21.- Smith C.R., Norman M.R. (1990) Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann. Clin. Biochem.* **27**:542-550.
- 22.- Lewis U.J., Singh R.N., Lewis L.J., Seavey B.K., Sinha Y.N. (1984) Glycosylated ovine prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**:385-389.
- 23.- Sinha Y.N. (1992) Prolactin variants. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**:100-106.
- 24.- Markoff E., Sigel M.B., Lacour N., Seavey B.K., Friesen H.G., Lewis U.J. (1988) Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* **123**:1303-1306.
- 25.- Young K.H., Buih W.C., Horseman N., Davis J., Kraeling R., Linzer D., and Bazer F.W. (1990) Biological activities of glycosylated and nonglycosylated porcine prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* **71**:155-162.

- 26.- Markoff E., Lee D.W., Hollingsworth D.R. (1988) Glycosylated and nonglycosylated prolactin in serum during pregnancy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **67**:519-523.
- 27.- Markoff E. and Lee D.W. (1987). Glycosylated prolactin is a major circulating variant in human serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **65**:1102-1106.
- 28.- Sinha Y.N., Campion D.R., Jacobsen B.P., and Lewis U.J. (1988) Glycosylated prolactin in porcine plasma: Immunoblotic measurement from birth to one year of age. *Endocrinology* **123**:1728-1734.
- 29.- Sinha Y.N., and Jacobsen B.P. (1987) Glycosylated prolactin in the murine pituitary: detection by a novel assay and alteration of concentrations by physiological and pharmacological stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **148**:505-514.
- 30.- Sinha Y.N., DePaolo L.V., Lewis U.J., Jacobsen B.P. and Scott K.E. (1991) Glycosylation alters the metabolic clearance rate (MCR) of prolactin. *73rd Annual Endocrine Meeting USA p. 214 (abstract)*.
- 31.- Graf L., Cseh G., Nagy I., and Kurcz M. (1970) An evidence for deamidation of prolactin monomer. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* **5**:299-303.
- 32.- Nyberg F., Roos P., and Wide L. (1980) Human pituitary prolactin. Isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Biochim. Biophys. Acta* **625**:255-265.
- 33.- Haro L.S., and Talamantes F. (1983) Secreted mouse prolactin and stored ovine prolactin desamide isoforms: Effect of deamidation on both receptor binding and immunoreactivity. *Endocrinology* **112 (suppl.)** 166 (Abstract).
- 34.- Oetting W.S., Tuazon P.T., Traugh J.A., and Walker A.M. (1986) Phosphorylation of prolactin. *J. Biol. Chem.* **261**:1649-1652.
- 35.- Aramburo C., Montiel J.L., Proudman J.A., Berghman L.R. and Scanes C.G. (1992) Phosphorylation of mammalian and avian prolactin. *Journal of Molecular Endocrinology* **8**:183-191.
- 36.- Wang Y.F., and Walker A.M. (1992) Dephosphorylation of NIDDK prolactin increases its growth-promoting activities. *74th Annual Endocrine Meeting USA p.382 (Abstract)*.
- 37.- Subramanian M.G., and Gala R.R. (1986) Do prolactin levels measured by RIA reflect biologically active prolactin? *Journal of Clinical Immunoassay* **9**:42-52.

- 38.- Owens R.E., Casanueva F.F., Friesen H.G. (1985) Comparison between rat prolactin radioimmunoassay and bioassay values under different experimental and physiological conditions. *Mol. Cell. Endocrinol.* **39**:131.
- 39.- Nicoll C.S., Mena F., Nichols C.W. Jr., Green S.H., Tai M., Russell S.M. (1976). Analysis of suckling-induced changes in adenohipophysial prolactin concentration in the lactating rat by three assay methods. *Acta Endocrinol (Kbh)* **83**:512.
- 40.- Leung F.C., Russell S.M., and Nicoll C.S. (1978) Relationship between bioassay and radioimmunoassay estimates of prolactin in rat serum. *Endocrinology* **103**:1619-1628.
- 41.- Leung F.C. (1980) Relationship between radioreceptor assay and radioimmunoassay estimates of prolactin in rat pituitary tissue, incubation medium and serum: effects of dialysis on measurements of the hormone. *Endocrinology* **106**:61-67.
- 42.- Asawaroengchai H. (1978) Metabolism of purified and secreted rat prolactin in vitro. *Hormone Res.* **9**:151-160.
- 43.- Wong V.L.Y., Compton M.M., Witorsch R.J. (1986) Proteolytic modification of rat prolactin by subcellular fractions of the lactating rat mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **881**:167.
- 44.- Asawaroengchai H., Russell S.M., Nicoll S.C. (1978). Electrophoretically separable forms of rat prolactin with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Endocrinology* **102**:407-414.
- 45.- Sinha Y.N. and Gilligan T.A. (1981). Identification of a less immunoreactive form of prolactin in the rat pituitary. *Endocrinology* **108**:1091-1094.
- 46.- Mayer G.L., Russel S.M. (1983). Identification of a low molecular weight (14K) form of bioactive rat PRL that lacks immunoactivity. *Endocrinology (Suppl.)* **112**, pp.223 (Abstr.).
- 47.- Meuris S., Svoboda M., Vilamala M., Christophe J. and Robyn C. (1983). Monomeric pituitary growth hormone and prolactin variants in man characterized by immunoperoxidase electrophoresis. *FEBS LETTERS* **154**:111-115.
- 48.- Sinha Y.N., Ott K., Vanderlaan W.P. (1987). Detection of multiple PRL- and GH- like proteins in human pituitary by Western blot analysis. *Am. J. Med. Sci.* **294**(1):15-25.
- 49.- Sinha Y.N. and Gilligan T.A. (1985). Identification and partial characterization of a 25K protein structurally similar to prolactin. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **178**:505-514.
- 50.- Sinha Y.N. and Jacobsen B.P. (1988). Structural and immunologic evidence for a small molecular weight ("21K") variant of prolactin. *Endocrinology* **123**:1364-1370.

- 51.- Sha G.N., and Hymer W.C. (1989). Prolactin variants in the rat adenohypophysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **61**:97-106.
- 52.- Sinha Y.N., Gilligan T.A. and Lee D.W. (1984). Detection of a high molecular weight variant of prolactin in human plasma by a combination of electrophoretic and immunologic techniques. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **58**:752-754.
- 53.- DeVito W. (1988). Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**(2):599-604.
- 54.- Clapp C., Sears P.S., Russell D.H., Richards J., Levay-Young B.K., and Nicoll C.S. (1988). Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* **122**:2892-2898.
- 55.- Schachter M. (1980). Kallikreins (kininogenases)-a group of serine proteases with bioregulatory actions. *Pharmacological Rev.* **31**:1-23.
- 56.- Powers C.A., Nasjletti A. (1984). A major sex difference in kallikrein-like activity in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* **114**:1841-47.
- 57.- Clements J.A., Fuller P.j., McNally M., Nikolaidis I., Funder J.W. (1986). Estrogen regulation of kallikrein gene expression in the rat anterior pituitary. *Endocrinology* **119**:268-277.
- 58.- Pritchett D.B., Roberts J.L. (1987). Dopamine regulates expression of the glandular type kallikrein gene at the transcriptional level in the pituitary. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**:5545-5552.
- 59.- Powers A.C., Hatala M.A. (1990). Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: In vitro reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin in vivo. *Endocrinology* **127**:1916-1927.
- 60.- Ho T.W.C., Balden E., Chao J. and Walker A.M. (1991). Prolactin processing by kallikrein: production of the 21-23.5 K PRL-like molecules and inferences about PRL storage in mature secretory granules. *Endocrinology* **129**:184-192.
- 61.- Oetting W.S., Ho T.W.C., Greenan J.R., Walker A.M. (1989). Production and secretion of 21-23.5 kDa prolactin like molecules. *Mol. Cell. Endocrinol.* **61**:189-199.
- 62.- Mitra I. (1980). A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95**(4):1750-1759.
- 63.- Sinha Y.N., Gilligan T.A., Lee D.W., Hollingsworth D., Markoff E. (1985). Cleaved prolactin; evidence for its occurrence in human

- pituitary gland and plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **60**:239-243.
- 64.- Sinha Y.N. and Gilligan T.A. (1984). A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology* **114**:2046-2053.
  - 65.- Compton M.M., Witorsch R.J. (1984). Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* **115**:476-483.
  - 66.- Ferrara N., Clapp C. and Weiner R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* **129**:896-900.
  - 67.- Tougard C., and Tixier-Vidal A. (1988). Lactotropes and gonadotropes. In *The physiology of reproduction* Vol.2, Ed. E. Knobil, J.D. Neill pp.1305-1335 Raven Press, New York, USA.
  - 68.- Bern H.A., Nicoll C.S. (1968). The comparative endocrinology of prolactin. *Recent Prog. Horm. Res.* **24**:681-720.
  - 69.- Neill J.D. (1974). Prolactin: its secretion and control. In: *Handbook of physiology* Sect. 7, Endocrinology, ed. E. Knobil, W.H. Sawyer 4(2):469-488 Washington D.C. Am. Physiol. Soc.
  - 70.- Fluckiger E., Del Pozo E., Von Werder K. (1982). Control of Prolactin secretion in: *Prolactin. Physiology, pharmacology and clinical findings*. pp.24-64. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg.
  - 71.- Soares M.J., Faria T.N., Roby K.F., Deb S. (1991). Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary uterine and placental expression. *Endocrine Reviews* **12**(4):402-423.
  - 72.- Freeman M.E., and Neill J.D. (1972). The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge. *Endocrinology* **90**:1292-1294.
  - 73.- Elias J.J. (1980). The role of prolactin in normal mammary gland growth and function. In: *Hormonal proteins and peptides*. Vol.Viii. pp. 37-74. Academic Press Inc. USA.
  - 74.- Clapp C., Martinez-Escalera G., Aguayo D., y Mena F. (1987). Regulación integrativa de la lactancia. *Bol. EStud. Med. Biol. Méx.* **35**:63-107.
  - 75.- Lamberts S.W.J. and Macleod R.M. (1990). Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* **6**(4):564-589.
  - 76.- Ben-Jonathan N. (1985). Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Reviews* **6**(4):564-589.

- 77.- Martínez de la Escalera G. and Weiner R.I. (1992). Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrine Reviews* **13(2):241-255**.
- 78.- deGreef W.J., Plotsky P.M., Neill J.D. (1981) Dopamine levels in hypophyseal stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of stimulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* **32: 229**.
- 79.- Ben-Jonathan N. Olivier C., Weiner H.J., Mical R.S., Porter J.C. (1977) Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology* **100:452**.
- 80.- Ben-Jonathan N., Neill M.A., Arbogast L.A., Peters L.L., Hofer M.T. (1980). Dopamine in hypophysial portal blood: relationship to circulating prolactin in pregnant and lactating rats. *Endocrinology* **104:583**.
- 81.- Leong D.A., Frawley L.S., and Neill J.D. (1983). Neuroendocrine control of prolactin secretion. *Ann. Rev. Physiol.* **45:109-127**.
- 82.- Martínez de la Escalera G., Guthrie J., Weiner R.I. (1988). Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not by VIP: stimulation via Ca<sup>2+</sup>/protein kinase C pathway. *Neuroendocrinology* **47:38-45**.
- 83.- Fink G., Koch Y., Ben Aroya N. (1982). Release of thyrotropin releasing hormones into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res.* **243:186**.
- 84.- deGreef W.J., Visser T.J. (1981). Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotrophin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J. Endocr.* **91:213-223**.
- 85.- Jacobi J., Lloyd H.M., Meares J.D. (1977). Onset of oestrogen-induced prolactin secretion and DNA synthesis by the rat pituitary gland. *J. Endocrinol.* **72:35-40**.
- 86.- Amara J.F., Van Itallie C., Dannies P.S. (1987). Regulation of prolactin production and cell growth by estradiol: difference in sensitivity to estradiol occurs at level of messenger ribonucleic acid accumulation. *Endocrinology* **120:264-271**.
- 87.- Golander A. Hurley T., Barret J., Hize A., Handwerger S. (1978). Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Science* **202:311**.
- 88.- Golander A., Hurley T., Barret J., Handwerger S. (1979). Synthesis of prolactin by human decidua in vitro. *J. Endocrinol.* **82:263-267**.

- 89.- Takahashi H., Nabesima Y., Nabesima Y.I., Ogata K., Takeuchi S. (1984). Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA complementary to human decidal prolactin mRNA. *J. Biochem.* **95**:1491-1499.
- 90.- Gellersen B., Bonhoff A., Hunt N., Bohnet H.G. (1991). Decidual-type prolactin expression by the human myometrium. *Endocrinology* **129**:158-168.
- 91.- Fuxe K., Hokfelt T., Eneroth P., Gustafsson J.A., Skett P. (1977). Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* **196**:899-900.
- 92.- Tobeau G., Desclin J., Parmentier M., Pasteels J.L. (1979). Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J. Endocrinol.* **83**:261-266.
- 93.- Harlan R.E., Shivers B.D., Fox S.R., Kaplove K.A., Schachters B.S., and Pfaff D.W. (1989). Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology* **49**:7-22.
- 94.- Emanuelle N.V., Metcalfe L., Wallock L., Tentler J., Hagen T.C., Beer C.T., Martinson D., Gout P.W., Kirsteins L., Lawrence A.M. (1987). Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin. *Brain Research* **421**:255-262.
- 95.- DeVito W., Connors J.M., Hedge G.A. (1987). Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: In vitro release and subcellular localization. *Neuroendocrinology* **46**:155-161.
- 96.- DeVito W. (1988). Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**(2):599-604.
- 97.- Schachter B.S., Durgerian S., Harlan R.E., Pfaff D.W., Shivers B.D. (1984). Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology* **114**(5):1947-1949.
- 98.- Emanuele N.V., Jurgens J.K., Halloran M.M., Tentler J.J., Lawrence A.M., Kelley M.R. (1992). The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Molec. Endocrinol.* **6**:35-42.
- 99.- Montgomery D.W., Zukoski C.F., Shah G.N., Buckley A.R., Pacholczyk T., Russell D.H. (1987). Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **145**(2):692-698.
- 100.- Montgomery D.W., Lefevre J.A., Ulrich E.D., Adamson C.R., Zukoski C.F. (1990) Identification of prolactin-like proteins

- synthesized by normal murine lymphocytes. *Endocrinology* **127:2601-2603**.
- 101.-Montgomery D.W., Shah G.N., Zukoski C.F., Buckley A.R., Laird H.E., Pacholczyk T., Russell D.H. (1992) A novel prolactin is synthesized by murine splenocytes during immune responses. (*In press*).
  - 102.-Di Matia G.E., Gellersen B., Bohnet H.G., Friesen H.G. (1988). A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* **122:2508-17**.
  - 103.- Montgomery D.W., Shen G.K., Ulrich E.D., Steiner L.L., Parrish P.R., Zukoski C.F. (1992). Human thymocytes express a prolactin-like mRNA and synthesize bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* **131:3019-3026**.
  - 104.- Baglia L.A., Cruz D., Shaw J.E. (1991). An Epstein-Barr virus-negative burkitt lymphoma cell line (sfRamos) secretes a prolactin-like protein during continuous growth in serum-free medium. *Endocrinology* **128:2266-2272**.
  - 105.- Gala R.R. (1991). Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **198:513-527**.
  - 106.- Nicoll C.S. (1974). Physiological actions of prolactin. In: *Handbook of physiology*. Sect. 7, Vol. IV part. 2. Endocrinology. Ed. Knobil E. Sawyer W.H., pp. 253-393. Washington D.C. Am. Physiol. Soc.
  - 107.- Nicoll C.S. (1980). Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *Fed. Proc.* **39(8):2563-2566**.
  - 108.- Meites J. (1988). Biological functions of prolactin in mammals. In: *Prolactin gene family and its receptors*. Ed. K. Hoshino pp.123-130. Elsevier Science publishers.
  - 109.- Elias J.J. (1980). The role of prolactin in normal mammary gland growth and function In: *Hormonal proteins and peptides* Vol. VIII pp. 37-74. Academic Press Inc.
  - 110.- Houdebine L.M., Djiane J., Dusanter-Fourt I., Martel P., Kelly P.A., Devinoy E., Servely J.L. (1985). Hormonal action controlling mammary activity. *J. Dairy Science* **68(2):489-500**.
  - 111.- Guyette W.A., Matusik R.J., Rosen J.M. (1979). Prolactin-mediated transcriptional and post-transcriptional control of casein gene expression. *Cell* **17:1013-1023**.
  - 112.- Shiu R.P.C., Friesen H.G. (1980). Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Ann. Rev. Physiol.* **42:83-96**.

- 113.- Kelly P.A., Djiane J., Postel-Vinay M.C., Edery M. (1991). The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine reviews*. **12(3):235-251**.
- 114.- Kelly P.A., Djiane J., Boutin J.M., Jolicoeur C., Edery M. (1988). Molecular cloning and expression of prolactin receptors. In: *Prolactin gene family and its receptors*. K. Hoshino editor. pp. 71-78. Elsevier Science publishers.
- 115.- Rillema J.A. (1980). Mechanism of prolactin action. *Fed. Proc.* **39(8):2593-2598**.
- 116.- Rillema J.A., Oppat C.A. (1988). Studies on the mechanism by which prolactin (PRL) stimulates lactose synthesis in cultured mouse mammary tissues, In: *Prolactin gene family and its receptors*. K. Hoshino editor. pp. 189-193. Elsevier Science publishers.
- 117.- Andries M., Tilemans D., Deneef C. (1992). Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochem. J.* **281:393-400**.
- 118.- Clapp C., Martial J., Rentier-Delrue F., Guzman R.C., Weiner R.I. (1993) Human 16K prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *En prensa*.
- 119.- Mittra I. (1980). A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary. II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **95:1760-1764**.
- 120.- Compton M.M., Witorsch R.J. (1984). Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* **115: 476- 483**.
- 121.- Clapp C. (1987). Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* **121:2055-2064**.
- 122.- Baldocchi R.A., Tan L., Nicoll C.S. (1992). Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum in vitro. *Endocrinology* **130:1653-1659**.
- 123.- Lewis U.J., Singh N.F., Vanderlaan W.F., Tutwiler G.F. (1977) Enhancement of the hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymatic modification. *Endocrinology* **101:1587**.
- 124.- Aston R., Ivanyi J. (1983). Antigenic receptor binding and mitogenic activity of proteolytic fragments of human growth hormone *EMBO J.* **2:493**.
- 125.- Clapp C., Sears P.S., Nicoll C.S. (1989). Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* **125:1054-1059**.

- 126.-Gutiérrez Ospina G., Martínez Barranco M.T., Martínez de la Escalera G., Clapp C. (1991). Cellular localization of a 16K prolactin-like antigen in the pituitary and brain of female rats. *73rd Annual Meeting of The Endocrine Society, Washington D.C. U.S.A.*
- 127.- Sawyer W.H. (1974) The mammalian antidiuretic response, In: *Handbook of physiology. Section 7: Endocrinology*, Vol. iv, part I. Eds Knobil E., and Sawyer W.H., American Physiological Society.
- 128.-Schwartz S.M., Heimark R.L., Majesky M.W. (1990). Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiological reviews* **70(4):1177-1209.**
- 129.- Weiner R., Findell P., Ferrara N., Clapp C. Schechter J. (1988). Arteriogenesis and the etiology of prolactinomas. In: *Progress in Endocrinology*. H. Imura et. al. editors. pp. 559-566. Elsevier-Science publishers.
- 130.- Ferrara N., Clapp C., Weiner R. (1991). The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* **129:896-900.**
- 131.- Clapp C., Weiner R.I. (1992). A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* **130:1380-1386.**
- 132.- Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72:248-252.**
- 133.- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:680- 685.**
- 134.-Towbin H., Staehelin T., Gordon J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76:4350-4354.**
- 135.- Greenwood F.C., Hunter W.M., Glover J.S. (1963). The preparation of <sup>131</sup>I-labeled growth hormone of high specific radioactivity. *Biochem. J.* **89:114-119.**
- 136.-Parlow A.F. N.I.A.D.D.K. *Instructive of rat prolactin RIA.* Pituitary Hormones and antisera center, Harbor U.C.L.A., Medical Center, U.S.A.
- 137.-Beisiegel U. (1986) Protein blotting. *Electrophoresis* **7:1-18.**
- 138.-Casabiell, Robertson M.C., Friesen H.G., Casanueva F.F. (1989). Cleaved prolactin and its 16K fragment are generated by an acid protease. *Endocrinology* **125:1967-1972.**