

58
2e j



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ANALISIS EXPERIMENTAL SOBRE LAS ISOFORMAS
DE PROLACTINA HIPOFISIARIA DE RATA

T E S I S

Que para obtener el Grado de

B I O L O G O

p r e s e n t a

IVAN RAMIRO ESPINOLA ALVARADO

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN-----	I
INTRODUCCION-----	1
CICLO ESTRAL-----	9
PSEUDOEMBARAZO-----	12
EMBARAZO-----	14
LACTANCIA-----	15
DIFERENCIAS SEXUALES EN LA SECRECION DE PROLACTINA-----	17
SECRECION DE PROLACTINA DURANTE LA LACTANCIA	
INFLUENCIA DEL ESTIMULO DE LA SUCCION-----	19
EFECTO DE LA SUCCION-----	20
INDEPENDENCIA DE LOS FENOMENOS DE DEPLECION Y LIBERACION DE LA PROLACTINA INDUCIDOS POR LA SUCCION----	23
REGULACION HIPOTALAMICA DE LA SECRECION DE PROLACTINA-----	27
ASPECTOS BIOQUIMICO-MOLECULARES DE LA SECRECION DE PROLACTINA-----	30
HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS-----	37
MATERIAL Y METODOS-----	40
RESULTADOS	
EFECTO DEL pH SOBRE EL CONTENIDO DE PRL DE LOS HOMOGENADOS INCUBADOS DE ADENOHIPOFISIS-----	43
EFECTO DE INCUBAR PRL-I ¹²⁵ EN HOMOGENADOS ACIDOS O ALCALINOS DE HIPOFISIS DE RATA LACTANTE-----	50

DISCUSION-----	54
CONCLUSIONES-----	60
BIBLIOGRAFIA-----	62

RESUMEN

La presente tesis se inicia con la mención de las generalidades más importantes acerca de la prolactina. Se incluyen pocos datos históricos como tales, pero se mencionan algunas de las numerosas funciones que se le han descrito a lo largo de un poco más de 70 años de su estudio.

Tomando a la rata como modelo se describen con mayor detalle aspectos relacionados con la secreción de esta hormona, como son: las diferencias en la secreción observadas durante el diestro, estro y proestro en la hembra con ciclo estral regular de cuatro días y las diferencias en la secreción con la rata macho; los estímulos involucrados en la secreción durante la lactancia junto a la descripción de la independencia entre los cambios hipofisarios de detectabilidad de la hormona y la liberación propiamente dicha de la misma.

El proceso de secreción de prolactina (PRL) se inicia con la síntesis de la hormona en el retículo endoplásmico rugoso, continuando con una serie de eventos que resultan en la formación de gránulos de hormona concentrada, cubiertos de membrana. Estos gránulos sufren una serie de transformaciones químicas y morfológicas hasta que son secretados por exocitosis, medio por el cual la hormona es liberada a la circulación.

En la rata lactante, la activación del sistema se encuentra controlada por la estimulación que las crías aplican durante la succión. Cuando las ratas permanecen de 2 a 8 horas sin ser succionadas, la concentración de PRL adenohipofisaria se incrementa mientras que el nivel circulante disminuye. En estas condiciones, la succión de las crías induce una disminución brusca vgr. depleción del 30 al 50% del contenido de la hormona, en la adenohipofisis, así como su liberación gradual hacia la circulación. Debido a las cinéticas diferentes de ambos eventos (vgr.: mientras que la depleción es rápida y masiva, la liberación es de menor magnitud, pero sostenida durante el tiempo de aplicación de la succión), ocurre una clara discrepancia entre la gran cantidad de hormona depletada y la poca cantidad de hormona liberada a los pocos minutos después de iniciada la succión. Esta condición aunada a que la hormona depletada se vuelve nuevamente visible al ser extraída de la hipófisis en amortiguador de carbonatos a pH 10 y que agentes como la cisteamina causan un efecto depletor, ponen en evidencia que la PRL no abandona la hipófisis de inmediato sino que sufre un cambio en su detectabilidad original relacionado con el intercambio tiol-disulfuro.

De esto y otros hechos surge la hipótesis de que los cambios en la detectabilidad de la prolactina hipofisiaria están asociados a mecanismos de intercambio tiol-disulfuro dependientes del pH, que estos suceden a nivel postraduccional y que afectan sobre todo a la variante monomérica de la hormona. Dado que estos cambios de detectabilidad pueden ser observados sobre homogenados de hipófisis, en la presente tesis se investigó si dichos mecanismos de intercambio tiol-disulfuro dependientes del pH eran o no exclusivos de la rata lactante y se determinó el efecto de un rango amplio de valores de pH. Asimismo, se investigó el efecto de agentes alquilantes, agentes oxidantes y reductores, y de un inhibidor enzimático sobre la detectabilidad de la PRL de homogenados de hipófisis de ratas no lactantes. Además se analizó el efecto del pH sobre la presencia de isoformas de PRL adenohipofisiaria en la rata lactante.

Entre los resultados más sobresalientes se encuentra la observación de isoformas hormonales, en el rango de los 18-20 kilodaltones (Kd), cuando el análisis fue hecho en condiciones ácidas o neutrales. Igualmente interesante fue la presencia de una variante de 22Kd en la extracción a pH alcalino. Se observó que el fenómeno de indetectabilidad era parcialmente bloqueado al incubar los homogenados adenohipofisiarios con los agentes alquilantes iodoacetamida y N-etilmaleimida y que esta última aparentemente no modificó la presencia de las diversas isoformas hormonales, y que tampoco lo hizo el inhibidor enzimático aprotinina. En conclusión este trabajo aporta evidencias de que es posible reproducir in vitro los cambios de detectabilidad de la PRL mediante la manipulación del pH y de los agentes reductores tiólicos y oxidantes. Asimismo se muestra que los mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, responsables de los cambios de detectabilidad de la hormona, están presentes en los animales no lactantes, siendo particularmente evidentes en el proestro.

INTRODUCCION

El sistema endócrino constituye en los vertebrados, después del sistema nervioso central, el segundo sistema en importancia que permite la comunicación fisiológica en el organismo. Los mensajeros empleados por este sistema son sustancias químicas denominadas hormonas que después de ser sintetizadas por un órgano o tejido específico son secretadas hacia la sangre circulante que se encarga de transportarlas hacia otros órganos y tejidos del organismo donde ejercen sus acciones.

Existen hormonas, que a lo largo de la filogenia de los vertebrados, muestran universalidad en la regulación de una función o un grupo particular de funciones. Otras

hormonas, en cambio, poseen funciones específicas que varían de acuerdo a la especie. Un ejemplo de esto último es la prolactina, la cual es una hormona de naturaleza proteica producida por la hipófisis, cuya importancia funcional y comparativa estriba, precisamente, en el hecho de que participa en la regulación de una amplia variedad de mecanismos fisiológicos en los diferentes grupos de vertebrados (12, 55, 56) [Cuadro 1].

El descubrimiento de la prolactina se realizó en 1928, cuando se demostró que la inyección de un extracto acuoso de adenohipófisis era capaz de estimular la síntesis de leche por la glándula mamaria de

CUADRO 1. PRINCIPALES EFECTOS DE LA PROLACTINA EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE VERTEBRADOS	
PECES (Teleósteos):	-Secreción mucosa por glándulas cutáneas, bucales y branquiales. -Acción osmorreguladora
ANFIBIOS:	-Efectos antimetamórficos. -Acción osmorreguladora.
REPTILES:	-Acción antigonadotrópica.
AVES:	-Producción de "leche del buche de la paloma". -Formación de la "placa de incubación". -Desarrollo de la conducta paternal.
MAMIFEROS:	-Desarrollo de la glándula mamaria. -Lactancia: Efectos lactogénicos y galactopoiéticos. -Acción luteotrópica. -Acción antigonadotrópica. -Acción osmorreguladora.
[Cuadro tomado de Nicoll C.S. 1978, (57) modificado]	

conejos pseudoembarazadas. Posteriormente, esta respuesta se observó en perros, cerdos y vacas. El compuesto responsable de estos efectos fue aislado en 1933 por Riddle, Bates y Dyskhorn, quienes le asignaron el nombre de prolactina (56,58,62).

La prolactina es una proteína que está constituida por una sola cadena polipeptídica con un número variable de puentes disulfuro (16). En los teleósteos la cadena se une por dos puentes disulfuro (16), mientras que en varias especies de mamíferos,

la hormona consta de 198 aminoácidos con tres puentes disulfuro (16, 64).

En elasmobranquios, teleósteos, reptiles y aves las células secretoras de la prolactina están localizadas en la región anterior de la *pars distalis* (56). En los mamíferos, la hormona es producida por células de la adenohipófisis que están clasificadas como acidófilas por sus características tintoriales y son denominadas lactotropos (56, 63).

Desde el punto de vista filogenético, la prolactina se localiza inicialmente en de los ciclostomos, en los cuales desempeña un papel importante en la regulación metabólica de los electrolitos (56). En los peces teleósteos, la hormona posee acciones principalmente de tipo osmorregulador,

ejerciendo su efecto principalmente sobre el riñón y las branquias. En los peces dulce acuícolas la prolactina es fundamental para la adaptación de estas especies a su medio ambiente promoviendo específicamente la retención de sodio, así como, reduciendo la permeabilidad al agua de las membranas expuestas a ella, tales como las agallas, la piel, la vejiga, el intestino y los riñones. En estos peces la hormona regula también la secreción del moco bucal, branquial y cutáneo. Asimismo, el número y la talla de las glándulas mucosas del tegumento en varias especies de este grupo son aumentadas por la prolactina. El revestimiento que esta secreción mucosa proporciona puede funcionar reduciendo la permeabilidad de la piel del pez, contribuyendo

a la regulación del flujo de sodio junto con el de agua en las agallas y al mismo tiempo proveer alimento para las crías (56).

En el grupo de los anfibios la prolactina influye sobre el crecimiento somático y el desarrollo funcional, además de ejercer acciones osmorreguladoras en algunas especies de salamandras. Estudios realizados en varias especies de anfibios han mostrado que la prolactina posee acciones antimetamórficas en larvas de anuros y urodelos. En relación con estos efectos, las acciones de la prolactina son antagónicas a las de la tiroxina, la cual induce la metamorfosis, pareciendo de esta manera que la prolactina favoreciese la fase acuática de la vida de los anfibios. En estas especies también se ha

observado que la prolactina ejerce efectos estimulantes sobre la secreción del moco epidérmico que estimula la producción de gelatina albuminoide que recubre el ovario de los anuros. Dicha gelatina es producida por los oviductos proveyendo alimento y protección para los huevecillos (56).

En los reptiles se conocen pocas acciones de la prolactina. Entre ellas se sabe que tiene acciones antigonadotrópicas, además de estimular el crecimiento somático, de favorecer la regeneración de la cola de las lagartijas y los lagartos, así como, de promover la muda de piel en algunas especies de culebras (56, 57).

A diferencia de lo acontecido en el grupo anterior, en las aves se

conocen numerosas acciones de la prolactina que se hallan relacionadas principalmente con la reproducción. Una de las acciones fisiológicas características y específica de esta hormona es la de estimular el crecimiento epitelial del buche de paloma, la producción y secreción de una sustancia nutritiva llamada "leche del buche de paloma". Esta sustancia es producida desde pocos días antes de que el período de la incubación de los huevos termine y durante una o dos semanas después de que la cría sale del cascarón. Durante este período las células mucosas epiteliales se hipertrofian y acumulan gránulos de grasa. Eventualmente se descaman, dando lugar a la llamada "leche del buche", la cual es una sustancia blanquizca que el ave

regurgita depositándola en la garganta de las crías para alimentarlas. Este fenómeno ha sido observado tanto en hembras como en machos de diversas variedades de palomas (56, 63).

Asociada a las acciones anteriores la prolactina interviene de manera decisiva en el desarrollo de los patrones de conducta maternal en las aves. En estos animales, antes y durante la expulsión de los huevos, se observa una gran vascularización con pérdida de las plumas de la piel de la región posterior del abdomen, la cual va a ser colocada sobre los huevos para empollarlos. A esta zona de la piel se le llama "placa de incubación" siendo su desarrollo promovido por la acción conjunta de la prolactina y los esteroides gonadales (56).

En este mismo grupo de

vertebrados la prolactina estimula el crecimiento de las plumas y se sabe que interviene en el funcionamiento de las glándulas nasales orbitales, gracias a las cuales, ciertas variedades de aves, son capaces de tomar agua marina (56) y eliminar el exceso de sal mediante la secreción de un moco hiperosmótico con respecto a esta (8).

En los mamíferos, la prolactina tiene a su cargo de manera fundamental una función característica y exclusiva de estas especies que es la de la lactancia. Durante esta etapa del ciclo reproductor de los mamíferos, la prolactina participa en el desarrollo del sistema ductal mamario que se presenta cuando la glándula mamaria pasa del estado postpuberal al estado lactacional (12,56). En la

rata, el crecimiento lóbulo-alveolar mamario es promovido por la prolactina y la progesterona, que actúan de manera sinérgica con los estrógenos, corticoides, insulina, hormona del crecimiento y hormonas tiroideas. Asimismo, la prolactina participa en la lactogénesis, la cual consiste en el inicio de la formación de la leche y su secreción, además, se sabe que para algunas especies de mamíferos la prolactina es indispensable para el mantenimiento de la secreción láctea, el cual es denominado galactopoiesis (12,56). Por otra parte, durante el ciclo estral de algunas especies, como la rata, el ratón, la oveja, etc., la hormona estimula la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo, mientras que al mismo tiempo

ejerce una acción antigonadotrópica (56).

En los mamíferos, al igual que en las aves, esta hormona está involucrada en la conducta maternal aunque a excepción de algunas especies su acción es indirecta. Existen estudios que han mostrado que en algunas especies los niveles de hormona en el plasma aumentan justo antes del parto (52). Asimismo, se ha observado que la inducción experimental de la conducta maternal en ratas por exposición a crías recién nacidas, va asociado a elevaciones en la secreción de la hormona (29). Esto sugiere que la hormona pudiera tener un papel causal en la determinación de la conducta maternal. Sin embargo, el desarrollo de la conducta maternal no está dado primeramente por la acción de

esta hormona, ya que se ha demostrado que su acción se encuentra coordinada con la acción de los esteroides ováricos, los cuales sí se considera que poseen una acción primaria en la determinación de dicha conducta (29). Las acciones indirectas de la hormona en la conducta maternal de los mamíferos son ejercidas a nivel somático sobre el desarrollo de la glándula mamaria, influyendo de esta manera sobre la compleja interacción entre madre y cría que se establece durante la crianza (29).

Se ha sugerido, en adición, que la prolactina tiene acciones osmorreguladoras sobre el epitelio mamario, ya que se ha observado un aumento en la absorción de sodio en células de este, en ratón lactante como respuesta a la

aplicación de la hormona (2). Por otro lado se ha observado, en tejido alveolar mamario de coneja que las concentraciones intra y extracelulares de este ión se ven afectadas al incubar el tejido en presencia de prolactina y que estas son inhibidas por el bloqueador del transporte activo de sodio ouabaina (10).

A manera de resumen puedo señalar que tanto la secreción como, las acciones de la prolactina se encuentran relacionadas, condicionadas, o

ambas, ya por las necesidades adaptativas de un organismo, como por las características anatómicas, así como funcionales que lo constituyen y el estado reproductivo en el que se halle. A continuación presento información adicional introductoria de la presente tesis sobre la manera en que la prolactina es secretada en los diferentes estados reproductivos de la rata, describiendo con mayor amplitud la dinámica y los mecanismos de secreción de esta hormona.

CICLO ESTRAL

Durante el ciclo estral de la rata, la secreción de prolactina es mantenida en niveles bajos, a excepción del período comprendido entre la tarde y la noche del día del proestro, en el cual se presenta un gran aumento en la secreción de la hormona (14,50-53). Este incremento en los niveles de prolactina circulante comienza alrededor del mediodía del proestro, alcanza su valor máximo cuando empieza la noche y regresa a su nivel basal en la mañana del estro (50,52,53).

Se ha observado que el pico de secreción de prolactina del proestro, está acompañado por picos similares en la secreción de varias hormonas: hormona luteinizante (LH),

hormona folículo estimulante (FSH) y progesterona. Todos estos picos hormonales están precedidos y son estimulados directa o indirectamente por una elevación en la tasa de secreción folicular de estrógenos (52,53). (v. gr. Fig. A.)

Este aumento en la secreción de estrógenos que antecede al pico de secreción de prolactina en el proestro, comienza en la tarde del diestro-2, crece paulatinamente para alcanzar sus valores máximos en la mañana del proestro y regresa a su valor basal en la noche del proestro (14,50,52).

Existe evidencia experimental en favor del papel estimulante que tienen los

estrógenos en la secreción de prolactina en el ciclo estral (4,50,52). Se ha visto que si se bloquea la secreción de estrógenos, que antecede a la de la hormona, mediante la administración de un antisuero a estradiol en la mañana del diestro-2, la secreción de la prolactina resulta bloqueada también. Dicho bloqueo es reversible y puede ser anulado con la administración de un

estrógeno sintético (50,52). Estos datos sugieren que en la regulación de la secreción de prolactina en el ciclo estral no se requiere una concentración de estrógenos alta y continua, y que la secreción de estos en las 24 horas que anteceden al día del proestro, actúa como un estímulo fisiológico para la secreción de la prolactina (50,52).

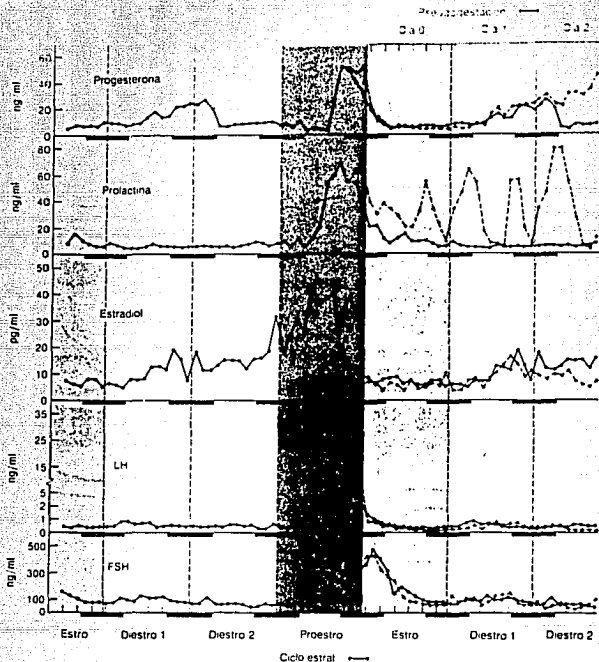


Fig.A. Niveles de hormonas sexuales determinadas en la sangre de la rata de laboratorio durante su ciclo estral de cuatro días y durante tres días de pseudogestación. Los niveles durante el ciclo estral están trazados en negro; los de la pseudogestación lo están en discontinuos. La pseudogestación fue provocada por estimulación mecánica del cuello del útero durante el proestro. Mediante reflejos nerviosos esta estimulación conduce a un aumento brusco de los niveles de prolactina, cuyo efecto inmediato es el

mantenimiento del cuerpo lúteo durante varios días retrasando el siguiente ciclo estral en el mismo tiempo. En el caso de una cópula y una inseminación, estos hechos estarían generalmente acompañados por fecundación, implantación y gestación, a consecuencia de lo cual el cuerpo lúteo sería mantenido por la secreción de las gonadotropinas placentarias. Nótese el crecimiento sostenido de los estrógenos durante el diestro y el proestro, correlacionado con la maduración de los folículos ováricos. [Tomado de Eckert. (8)].

PSEUDOEMBARAZO

El pseudoembarazo es un estado funcional que se observa en algunas especies y durante el cual, sin haber ocurrido fertilización y embarazo sucede una interrupción temporal de la ovulación. En la rata, dicho estado puede ser inducido en los días del proestro y del estro por el apareamiento de la hembra con un macho estéril o por estimulación mecánica o eléctrica del cérvix uterino.

El análisis radioinmunológico de los niveles plasmáticos de prolactina ha confirmado que la secreción de esta hormona se encuentra elevada en ratas en pseudoembarazo o en la primera fase del embarazo (3,13,15,52). Este incremento en los niveles

de prolactina circulante se manifiesta en dos picos diarios, uno diurno y otro nocturno, de secreción aumentada de la hormona (Fig.A.).

El pico diurno empieza en la tarde y alcanza sus valores máximos justo antes del comienzo del período de oscuridad. Este pico es similar en duración y magnitud al pico antes descrito que se observa durante el proestro. El pico nocturno se inicia después de medianoche y alcanza sus valores máximos al final del período de oscuridad. En promedio, este pico tiene una mayor duración y es de mayor magnitud que el pico diurno (15).

El primer pico nocturno se

observa después de la cópula, la cual debido a la mayor receptividad de la hembra, normalmente se realiza en la tarde del proestro. En la rata que no ha copulado, los niveles de prolactina en el plasma regresan a un nivel basal en la mañana del estro. La sucesión de picos diarios, diurnos y nocturnos ocurre en las ratas pseudoembarazadas, por lo menos durante los primeros seis días de dicho estado (15,52,53).

Se sabe que el pico nocturno de secreción de prolactina continúa presentándose hasta el último día del pseudoembarazo, v.gr., generalmente el 11 día después de haber sido inducido dicho estado. Posteriormente desaparece también dicho pico nocturno y se reanuda el patrón normal de secreción de prolactina propio de un nuevo ciclo estral (3,13,15,52,53).

EMBARAZO

Se ha observado durante la primera mitad del embarazo en la rata que la secreción de prolactina se encuentra elevada, pero que prevalece un nivel bajo de la hormona durante la última mitad del mismo.

Cuando la cópula se efectúa en el día del proestro o en el estro, esta da lugar a dos picos diarios de secreción de prolactina, de manera similar a los observados durante el pseudoembarazo. Este nivel alto se mantiene por 11 días a partir de los cuales decrece abruptamente, manteniendo este nivel a lo largo de los restantes días de la gestación. Aparentemente, la secreción de prolactina por

la hipófisis se inhibe al comenzar la secreción de la misma hormona por la placenta (52,53).

Estudios hechos en ratas muestran que, justo antes del parto, la secreción de prolactina hipofisiaria se incrementa significativamente como lo refleja el aumento en las concentraciones de la hormona en el plasma y en la hipófisis (1,52,53). Es probable que el aumento significativo en la secreción de estrógenos ováricos que se observa en las últimas fases del embarazo, sirvan como estímulo para este incremento en la secreción de la hormona (1,52,53).

LACTANCIA

Entre las diversas hormonas que intervienen en la lactancia, la prolactina juega un papel importante en los mecanismos de iniciación y mantenimiento de la secreción de leche en varias especies. Esta hormona presenta una alta tasa de secreción a lo largo de los 21 días del período de lactancia en la rata (1,52).

A diferencia de lo que ocurre en el ciclo estral, en el cual, la regulación de la secreción de prolactina es interna y está dada por los esteroides ováricos, la secreción de la hormona durante la lactancia está, prácticamente en su totalidad, sujeta al control de los impulsos aferentes generados en la periferia por el estímulo de

la succión o por estímulos exteroceptivos procedentes de la camada (25,41). Como consecuencia de dicha regulación, la prolactina, en respuesta a la estimulación, no es secretada tónicamente durante la lactancia, sino fásicamente. Así, en ausencia de dicha estimulación, los niveles circulantes de la hormona son muy bajos. Se ha determinado que cuando las ratas lactantes son separadas de sus crías durante varias horas y posteriormente son succionadas por ellas, el inicio de dicha succión es seguido de una liberación rápida de prolactina a la circulación (53).

La prolactina es liberada de la hipófisis en respuesta al

estímulo de la succión a lo largo del ciclo de lactancia; la eficiencia de dicha estimulación asegura el mantenimiento de la función hasta el final del ciclo (53).

La lactancia llega eventualmente a su fin debido,

al menos en parte, a que las crías succionan a la madre con menor frecuencia a medida que van creciendo. De esta manera, la intensidad del estímulo para la secreción de la hormona disminuye considerablemente al final de dicho período (41,52).

DIFERENCIAS SEXUALES EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA

La prolactina es secretada por la hipófisis tanto de ratas hembras como de ratas machos. Si bien las funciones de la prolactina en el macho no están bien establecidas, se sabe que el hipotálamo del macho inhibe la secreción de prolactina (52).

Numerosas observaciones han demostrado que las ratas macho no poseen la capacidad de presentar un patrón de secreción de prolactina similar al de las hembras (52). Cuando las ratas macho son tratadas con estrógenos, sus niveles circulantes de la hormona se ven incrementados, sin que se observe una secreción a manera de picos. Sin embargo, cuando un macho es castrado neonatalmente y es tratado con estrógenos siendo adulto, puede

secretar la hormona de manera fásica (51,53).

Las diferencias sexuales en la secreción de prolactina residen probablemente en el hipotálamo más que en la hipófisis. Se ha observado que al transplantar hipófisis masculinas bajo la eminencia media de ratas hembras hipofisectomizadas, estas pueden presentar pseudoembarazo, embarazo y lactancia (52).

Por otra parte, la secreción de estrógenos que estimula la secreción de prolactina en el ciclo estral, es bloqueada mediante un corte en el hipotálamo hecho inmediatamente detrás del quiasma óptico, semejando la secreción en el macho; sugiriendo, de esta forma, que

esta incapacidad del macho de secretar la hormona a manera de picos es causada por una acción de los andrógenos sobre el hipotálamo (53).

Así, la regulación hipotalámica de la secreción

de prolactina es más compleja en la hembra, y esto podría deberse a que el hipotálamo de la hembra consta de características funcionales que están ausentes en el hipotálamo del macho (52).

SECRETION DE PROLACTINA DURANTE LA LACTANCIA
INFLUENCIA DEL ESTIMULO DE LA SUCCION

El estímulo de la succión ejerce una poderosa influencia en la lactancia ya que representa un mecanismo indispensable tanto para mantener la función secretora de la mama como para el desarrollo de la compleja interacción conductual y de otro tipo, entre madre y cría (52).

Se sabe que la separación de la madre de su cría afecta seriamente la secreción láctea y la conducta maternal, especialmente si esta separación se efectúa al inicio de la lactancia. Sin embargo, si el período de separación no es muy prolongado, reuniendo a la madre con su cría es posible restablecer la función que

empezaba a perderse (52). El desarrollo de los mecanismos de secreción endócrina propios de la lactancia, que son principalmente los relacionados con la síntesis y liberación a la circulación de las hormonas hipofisarias es el resultado, en buena parte, del estímulo de la succión (52).

La influencia de la succión sobre la secreción de prolactina ha sido caracterizada en numerosos estudios. A continuación se describen algunos de estos estudios en relación con la importancia de factores tales como la intensidad, duración, frecuencia, etc., de la succión sobre la secreción.

EFFECTO DE LA SUCCION

La prolactina es liberada por la adenohipófisis de la rata lactante como resultado de la activación de un reflejo neuroendócrino por el estímulo neurogénico de la succión (20,25). El efecto de la succión sobre la secreción de prolactina consiste en una depleción¹ inicial rápida (1-2 min.) y extensa (15-60 $\mu\text{m}\backslash\text{mg}$) de la hormona dentro de la hipófisis. Se ha demostrado que un período de estimulación de dos minutos es tan efectivo para reducir el contenido hipofisiario de la hormona, como lo son 30 minutos (22). Después de ser depletada, la prolactina adenohipofisiaria se reacumula, es decir, se repleta, pudiendo pasar varias horas antes de que sean

restablecidos los niveles previos a la succión (20, 46).

Estos procesos de depleción, seguidos por la liberación y la repleción de la hormona constituyen los elementos básicos de la secreción de prolactina influenciada por la succión.

Ha sido determinado que el grado de la depleción de prolactina hipofisiaria que se presenta por efecto de la succión así como la tasa de repleción de la hormona, dependen de dos factores: la intensidad de la succión, es decir, el número de crías presente en la camada y de la duración del intervalo sin succión, previo a la aplicación de un período de succión.

Una vez iniciada la

succión por parte de las crías y concomitante a la depleción, se presenta una rápida elevación en los niveles de prolactina en el plasma (52).

La liberación de la hormona puede continuar durante 2 a 3 horas después del principio de la succión, siempre y cuando el estímulo se mantenga constante (52).

Un trabajo que ilustra el efecto de la duración de la succión sobre la concentración de prolactina circulante, es el realizado por Grosvenor y Whitworth (1974), en el cual la succión fue aplicada durante diferentes períodos de tiempo (5, 30, 60 o 90 min.) a ratas que no habían recibido dicho estímulo durante 8 horas. Las muestras de sangre en las que se determinó la concentración de la hormona se colectaron sin perturbar a la madre, por medio

de un catéter implantado varios días antes del experimento en la aurícula cardíaca derecha de la rata.

Los resultados obtenidos mostraron que la concentración de prolactina inmunoreactiva en la circulación estuvo en relación directa con la duración del período de succión. Así, la concentración de la hormona en el plasma se incrementó levemente en el grupo succionado durante 5 minutos, mientras que la concentración máxima de la prolactina en la circulación fue alcanzada en aquellos grupos que fueron succionados durante 15 a 30 minutos. Este nivel se mantuvo durante los 45 a 75 minutos restantes del período de succión.

La tasa de secreción de la prolactina durante cada minuto de succión fue calculada como

correspondiente a 400 a 600 ng/min. La curva de concentración de la hormona en la circulación como respuesta a dicha estimulación pudo ser producida mediante la infusión constante, más no rápida, de prolactina exógena (46).

En numerosos trabajos realizados por Grosvenor y Mena (1971) encaminados a conocer las características fisiológicas de la regulación de la secreción de prolactina por el estímulo de la succión, se ha observado que tanto la secreción de la hormona hacia la circulación como el funcionamiento adecuado de los mecanismos de ajuste

hipotálamo-hipofisarios para adaptar la producción hormonal a la demanda de las crías y el mantenimiento de un nivel adecuado de síntesis de la hormona por la hipófisis dependen de manera fundamental de que el estímulo de la succión sea aplicado periódicamente a intervalos no mayores de 8h. (43).

Esto ha permitido sugerir que la secreción de esta hormona durante la lactancia depende de modo muy crítico de la frecuencia con la que es activado el sistema hipotálamo-hipofisario por el influjo nervioso aferente (20,43).

² Los términos "depleción" y "repleción" se utilizan para referirse a los términos depletion y repletion, que en el idioma inglés denotan agotamiento, disminución rápida, vaciamiento, etc. (depletion); y llenado, acumulación, repleción, etc. (repletion). Dado que el término "depletion" no existe en el idioma español, aunque sí el de repleción, se utilizan ambos en la presente tesis con el propósito de conservar su conotación y evitar posibles confusiones.

INDEPENDENCIA DE LOS FENOMENOS DE DEPLECION Y LIBERACION DE LA PROLACTINA INDUCIDOS POR LA SUCCION

Se ha establecido que existe una clara discrepancia entre la cantidad de prolactina depletada en la hipófisis al inicio de la succión y la cantidad de hormona que es secretada a la circulación en este periodo (21,25). La máxima depleción ocurre al cabo de entre uno y dos minutos de succión, y en ese lapso, solo han aparecido en la circulación cantidades pequeñas de la hormona (1-2 μ g).

En experimentos de estimulación del nervio mamario en ratas, se vió que niveles circulantes bajos de prolactina coincidieron con niveles hipofisiarios depletados, después de 5 minutos de estimulación, mientras que los

niveles plásmaticos altos de hormona observados después de 90 y 180 minutos de estimulación coincidieron con niveles repletados de prolactina en la hipófisis. Estos resultados indican que la depleción, liberación y repleción son procesos independientes (21-25).

El análisis de la relación cuantitativa entre la prolactina depletada y la prolactina liberada se ha hecho en ratas succionadas continuamente durante 90 minutos, después de un periodo de 2, 4 u 8 horas de no succión. Se encontró que fueron liberadas a la circulación 17, 32 y 48 mg de prolactina en los grupos de animales no

succionados por 2, 4 y 8 horas respectivamente. Estos valores fueron semejantes a las cantidades de prolactina depletadas en la hipófisis durante los primeros minutos de succión, al cabo de períodos de no succión similares. La tasa de secreción, así como la tasa de depuración metabólica de la hormona fueron similares en cada grupo. Sin embargo, se encontró variación en el tiempo durante el cual la tasa de secreción de prolactina se mantuvo constante, la que resultó de esta manera, en relación directa con la duración del período de no succión. Así, en el grupo previamente no succionado durante 8 horas, la secreción constante de prolactina se mantuvo a lo largo de los 90 minutos que duró el período de succión; por 60 minutos en el

grupo no succionado durante 4 horas y solo 30 minutos en el grupo no succionado por 2 horas. Estos resultados indicaron que siempre y cuando sus diferentes dinámicas fuesen consideradas, existe una relación cuantitativa entre la hormona depletada y la liberada. De esta forma, ya que la prolactina depletada no se libera directamente a la circulación, se consideró que la depleción de la hormona en la adenohipófisis representa la transformación de la misma, de una forma pre-liberable a una forma liberable (21,25).

En otro estudio, se determinó el significado relativo del proceso de depleción-transformación como evento limitante en la disponibilidad de la prolactina para ser liberada. Para ello se usó vapor de éter como estímulo

ya que, como se sabe, este anestésico es capaz de inducir liberación pero no depleción de prolactina. De esta forma, al aplicar dicho estímulo a ratas no succionadas, se obtuvo un aumento pequeño y transitorio en la concentración de prolactina plasmática. Sin embargo, cuando el éter fue aplicado a ratas que habían sido succionadas por un período breve de 10 minutos, suficiente para inducir la depleción-transformación de la hormona, se obtuvo una liberación alta y sostenida de la misma, similar a la inducida por la succión. Resultados semejantes se observaron utilizando la estimulación exteroceptiva generada por dos crías o bien por el personal del laboratorio. Ninguno de estos estímulos provocó depleción ni liberación de prolactina al ser

aplicados a ratas no depletadas.

Estos resultados apoyan el concepto de que la prolactina liberable proviene de la prolactina depletada. Igualmente, indican que una vez transformada por el estímulo específico de la succión, la hormona permanece disponible para ser liberada por un período prolongado de tiempo y que en dicho estadio, el umbral para ser liberada es menor que el que es necesario alcanzar por el estímulo para inducir su depleción (21,25).

Las discrepancias temporales cuantitativas entre la depleción y la liberación de la hormona han sido mostrados también mediante el análisis *in vitro* de la secreción de prolactina por hipófisis de ratas lactantes y de ratas tratadas con estrógenos. Así,

se observó que podría ocurrir depleción sin liberación concomitante y liberación a partir de una forma no detectable de la misma (21,25). También, se ha demostrado la existencia en la adenohipófisis y su secreción *in vitro* de formas de prolactina con diferentes grados de actividad biológica y radioinmunológica. Se ha observado, en adición, que las fases de depleción-

repleción del proceso secretor de prolactina oscilan de manera intrínseca en la hipófisis de la rata lactante incubada en condiciones *in vitro*. Dado que en estas condiciones el tejido está libre de influencias reguladoras hipotalámicas, es de suponerse que dichas influencias sean ejercidas sobre las fases señaladas (21,25).

REGULACION HIPOTALAMICA DE LA SECRECION DE PROLACTINA

La naturaleza del control hipotalámico de la secreción de prolactina es bastante compleja y aún está lejos de ser completamente dilucidada. En la rata lactante se han obtenido evidencias que implican al hipotálamo en el control de la depleción, liberación y repleción de la prolactina.

Por un lado, se sabe que parte de este control es a través de influencias inhibitorias, mediadas por un factor hipotalámico inhibitor (PIF) y/o dopamina. Recientemente se ha reportado que después de la aplicación de la succión o de la estimulación periférica, se presentan cambios en los niveles de dopamina en el hipotálamo, en la sangre portal hipofisiaria y

en la adenohipófisis (21,25).

Por otro lado, se tienen evidencias experimentales que apoyan la existencia de factores hipotalámicos que estimulan la secreción de prolactina, entre ellos la hormona liberadora de tirotrópina (TRH). La serotonina (5-Ht), también ha sido asociada a los mecanismos de control de la secreción de prolactina. Se ha observado que esta amina es capaz de estimular la secreción de TRH de hipotálamos incubados *in vitro*, así como de otro factor estimulante de la hormona *in vivo* (PRF) (21,25).

Por su parte, la TRH, es capaz de inducir potenciales de acción en células adenohipofisiarias secretoras

de prolactina (25), lo que sugiere que esta hormona hipotalámica podría ser el punto final de un sistema 5-HT-PRF-TRH, responsable de la liberación de la hormona.

Finalmente, existen evidencias que muestran que la prolactina circulante puede actuar sobre el hipotálamo y regular indirectamente su propia tasa de repleción por la hipófisis (21,25). La repleción de prolactina por la hipófisis después de su depleción puede ocurrir tanto a partir de la síntesis *de novo*, como de un proceso de des-transformación de la hormona depletada previamente (21,25,46).

Diferentes autores han estudiado el papel que ejercen los factores hipotalámicos inhibidores y facilitadores, sobre cada una de las fases del proceso de secreción de

prolactina. En experimentos *in vitro* tanto la fase de depleción-transformación como la de repleción de la hormona, son inhibidas por el factor inhibidor de la prolactina (PIF), que se encuentra en los extractos ácidos de hipotálamo, por la dopamina (DA) y por el agonista dopaminérgico bromocriptina (CB-154). La fase de liberación es poco inhibida por estos agentes, pero es aumentada por un factor estimulante de la prolactina (PRF), o por la hormona estimulante de la tirotrófina o TRH (19,24). Sin embargo, estos últimos agentes no ejercen ningún efecto sobre la fase de depleción-transformación de la hormona. Por otra parte, se observa que en experimentos *in vivo* la tasa de repleción es estimulada tanto por los extractos hipotalámicos como

por la propia prolactina, administrados una vez que la depleción ha ocurrido (23).

En conjunto, estos resultados muestran que la fase de depleción-transformación es el paso limitante para la disponibilidad de la hormona liberable en la hipófisis de la rata lactante y que el control hipotalámico es ejercido selectivamente sobre las fases compartimentalizadas del proceso general.

Es importante mencionar,

que procesos similares a los de la depleción-transformación de la prolactina, han sido descritos para otras hormonas adenohipofisarias (59); y que los resultados obtenidos, que son la base de la hipótesis descrita, han sido confirmados en diferentes laboratorios tanto en ratas lactantes (6,7,61), como en ratas pseudopreñadas (26), preñadas (27) así como, en explantes de hipófisis (9) y en células dispersas (39,40).

ASPECTOS BIOQUIMICO-MOLECULARES DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA

En la hipófisis, la prolactina se encuentra almacenada en forma de gránulos compuestos por una matriz hormonal densa recubierta de membrana (5,11). Desde un punto de vista morfofuncional, la matriz hormonal de los gránulos que van a la exocitosis presenta una estructura estable (68). Asimismo, la insolubilidad química que caracteriza al gránulo de la prolactina, guarda relación directa con la edad de la hormona (tiempo transcurrido desde su síntesis) (17). Existe una gran variedad de cambios postraduccionales posibles, que tendrían influencia sobre la detectabilidad química, biológica e inmunológica de una proteína. Entre estos posibles

cambios, que en general suelen tener una gran importancia para la actividad biológica del compuesto en cuestión, destacan por su frecuencia y ubicuidad las modificaciones covalentes (con residuos de carbohidratos, por ejemplo, la glucosilación), la fosforilación, la formación o la ruptura de puentes disulfuro, la proteólisis, etc. En los últimos cinco años, se han obtenido evidencias de que la molécula de prolactina puede presentar algunos de estos cambios, aunque en muchos casos no se ha establecido el significado funcional de los mismos. Así, se ha descrito que normalmente los hidratos de carbono macromoleculares forman parte de la matriz de los gránulos de prolactina de

bovinos (69). En la rata, se ha mostrado que, durante la exocitosis, los glucoconjugados extracelulares interactúan con los gránulos de prolactina (48). Se han descrito modificaciones postraduccionales de:

a) La glucosilación en las prolactinas de ovino y humano asociada a la disminución en la actividad biológica de las mismas (34); b) la desaminación de las prolactinas de ovino y ratón (28,60); c) la agregación y la oligomerización de las prolactinas de rata, ratón y humano (32,35,67); d) la proteólisis de las prolactinas de rata y ratón, relacionada con la ruptura del asa mayor, formada por uno de los puentes disulfuro de la molécula. La reducción del puente disulfuro, da lugar a formas submonoméricas con actividad

biológica e inmunológica diferente a la de la forma nativa (49); e) la generación de formas reducidas de prolactina ovina carentes de actividad biológica e inmunológica (66).

Durante la fase de depleción-transformación, la prolactina hipofisiaria es indetectable al análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), radioinmunoanálisis (RIA) y bioensayo (18, 21). Asimismo, la PRL transformada es resistente a la extracción en amortiguador Tris- HCl a pH neutro, pero puede ser extraída en amortiguador de bicarbonato a pH 10 (44). Este resultado sugiere que la depleción-transformación está asociada con un aumento en la estabilidad de la hormona. Por otra parte, dado que las

soluciones alcalinas pueden facilitar el intercambio tiol-disulfuro (31), estos datos sugieren que la hormona puede presentar cambios conformacionales, que involucran la reducción-oxidación de puentes disulfuro antes de la exocitosis y que tales cambios determinan su indetectabilidad a los métodos empleados (36,44).

Por lo anterior, en la rata lactante se investigó recientemente si los fenómenos de óxido-reducción de puentes disulfuro, por medio de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, participan normalmente en los procesos de depleción-transformación, repleción y liberación de la prolactina. Se ha descrito que el uso de tioles, aminotioles, agentes alquilantes, cationes divalentes y amortiguadores

alcalinos, provocan cambios drásticos en la detectabilidad de la prolactina de murinos y bovinos (36), por lo que es posible que los mecanismos de intercambio tiol-disulfuro estén involucrados en el almacenamiento y la secreción de la hormona (36,42). Se ha mostrado que en el cultivo de hipófisis, los agentes reductores de grupos tiólicos, como el glutatión reducido (GSH), el ditionitrito (DTT), el *B*-mercaptoetanol (MCE) y la cisteamina (CSH), aumentan la fase de depleción-transformación de la prolactina. Incluso, la administración *in vivo* de la CSH induce tal respuesta. Por otra parte, se observa que tanto agentes oxidantes [como el glutatión oxidado (GSSG) y el ácido 5,5-(2-nitro-benzóico) (DTNB)], como los agentes

alquilantes [bloqueadores de los radicales tiol como la n-etilmaleimida (NEM) y la iodoacetamida (IAA)], deprimen o bloquean la transformación de la prolactina. La liberación de la prolactina hacia el medio de incubación, es inhibida por los tioles y los alquilantes, mientras que los oxidantes la estimulan de manera significativa (42). Según estos resultados, parecería que las moléculas de prolactina almacenadas en los gránulos, fuesen inicialmente reducidas (por el rompimiento de los puentes intermoleculares) y posteriormente reoxidadas a la forma original, o bien reoxidadas de manera cruzada (formando puentes intermoleculares) y dando origen a formas oligoméricas de alto peso molecular, indetectables con los métodos

empleados. Asimismo, dada la factibilidad de que dichos procesos fuesen reversibles y que una vez alterada la conformación de la molécula de prolactina, esta quedase expuesta a la acción de enzimas proteolíticas (49), es posible que dicha polimerización reversible explique la transformación de la prolactina y los cambios asociados de detectabilidad y de proteólisis mencionados. Por otra parte, también existe la posibilidad de que dichos mecanismos de intercambio tiol-disulfuro actúen sobre otros mecanismos reguladores intracelulares que influyen, directa o indirectamente, sobre la transformación y la liberación de la prolactina. La posible participación fisiológica de los mecanismos de intercambio de óxido-reducción en la

secreción de esta hormona, ha permitido proponer una hipótesis integrativa sobre el proceso de secreción de la prolactina, así como el procesamiento y la síntesis de la misma, en la que tales mecanismos de óxido-reducción desempeñarían una acción fundamental. En apoyo a las posibilidades mencionadas de polimerización reversible y de proteólisis de la prolactina hipofisiaria, se ha observado que la acción de los agentes tiólicos también se manifiesta en homogenados de hipófisis; que su acción inductora de la indetectabilidad se debe a la oligomerización de la forma monomérica (24K.) de la hormona; y que la reversibilidad de dicho fenómeno es dependiente del pH al que son incubados los homogenados (45). Dichos

agentes tiólicos provocan indetectabilidad de la prolactina a pH ácido (pH 5-6), mientras que a pH alcalino (pH 8-10), provocan que la hormona indetectable existente en el homogenado de hipófisis, recupere su detectabilidad. Este efecto es similar al mecanismo previamente descrito del bicarbonato sobre el mismo fenómeno. Dado que la simple incubación (a 37°C durante 1-3 h) de homogenados ácidos o alcalinos, provoca los mismos cambios obtenidos en presencia de tioles, aunque en menor magnitud y puesto que tales cambios son bloqueados por factores alquilantes (NEM, o IAA), se sugiere que los tioles endógenos contenidos en la hipófisis, asociados al pH intracelular o intragranular, son los responsables de los cambios de detectabilidad de la

hormona observados en condiciones fisiológicas (45).

Recientemente se ha mostrado que la inhibición de la transformación *in vitro* de la prolactina por extractos ácidos de la eminencia media (PIF) de rata, es bloqueada por los agentes tiólicicos antes mencionados. Los cationes divalentes como el Zn^{2+} , Ni^{2+} , etcétera, son capaces de inhibir el intercambio tiol-disulfuro (37). El Zn^{2+} tiene un efecto similar al de la DA y el PIF y su acción inhibitoria es bloqueada por agentes tiólicicos (38). Estos resultados sugieren que en la adenohipófisis de la rata lactante, la inhibición de la transformación, la repleción y la liberación de la prolactina por agentes hipotalámicos, ocurre al inhibir el intercambio tiol-disulfuro, tanto en la

reducción-oxidación inicial que dará lugar a las prolactinas repletada y liberada. En cuanto a la estructura de las formas de la hormona, que estarían asociadas a su transformación y liberación, estudios *in vivo* e *in vitro* muestran que la transformación de la prolactina consiste esencialmente en una polimerización reversible a partir de la forma monomérica (43). Se ha confirmado que a partir de la transformación de la prolactina se facilita la generación de variantes moleculares con reducida inmunoadtividad. Por todo lo anterior, y a manera de conclusión preliminar, se puede considerar que la transformación de la prolactina por la hipófisis de la rata lactante, es un fenómeno postraduccionaI de la hormona madura en forma granular y que

desde el punto de vista fisiológico tiene por objeto regular la disponibilidad de la hormona en forma liberable y

permitir las modificaciones estructurales de la misma que dan lugar a formas con diversa actividad bioinmunológica.

HIPOTESIS DE TRABAJO Y OBJETIVOS

Los cambios en la detectabilidad de la PRL que va seguida de la restitución de la misma, y que ha sido analizada mediante las técnicas de electroforesis en PAGE, RIA y bioensayo, son aspectos característicos de los fenómenos de transformación y repleción de la PRL contenida en las adenohipófisis de las ratas lactantes después de recibir un periodo de succión, o después de la incubación *in vitro* de la hipófisis (43).

Estos cambios en la detectabilidad están relacionados con el procesamiento intracelular de la hormona, que sucede antes de la liberación por exocitosis de la misma (47). Entre los mecanismos involucrados en

estos cambios, trabajos recientes sugieren que la polimerización reversible dependiente de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro de la forma monomérica (24Kd. o 24K.) de la prolactina podrían explicar, al menos en parte, dichos cambios de detectabilidad.

Cambios similares a los observados *in vivo* durante la transformación o repleción de la PRL, se han observado (42) después de incubar homogenados de adenohipófisis (AH) de ratas lactantes en condiciones ácidas (pH 6.5) o alcalinas (pH 8.2). Dado que estos efectos, así como los obtenidos con las AH incubadas, fueron inducidos por glutatión reducido (GSH) y por otros tioles (42) estos

resultados sugieren que de acuerdo al pH, los tioles pueden aumentar o disminuir la detectabilidad de la PRL. Por lo tanto, es posible que la interconversión de formas de PRL suceda durante la transformación y repleción de la misma, mediante un proceso pH dependiente intracelular y/o intragranular de intercambio tiol-disulfuro.

En el presente trabajo de tesis se han realizado observaciones sobre la influencia del pH y de los agentes tiólicicos en los cambios postraduccionales que le acontecen a la prolactina hipofisiaria. De manera específica, se ha investigado:

- 1) sobre el efecto de los agentes antes mencionados en homogenados de hipófisis, sobre las formas variantes de la hormona de ratas lactantes; 2)

si los efectos observados previamente en homogenados de hipófisis de ratas lactantes son similares a los observados en hipófisis de ratas no lactantes; 3) cuál es el tipo y la proporción de formas variantes de la PRL producidas al incubar PRL marcada con I^{125} en homogenados ácidos o alcalinos de hipófisis de ratas lactantes.

Como ya se mencionó en la primera parte de esta tesis, es factible demostrar que cambios de detectabilidad de la PRL, similares a los observados *in vivo*, pueden ser generados mediante la incubación ácida o alcalina de homogenados de hipófisis de ratas lactantes. Por consiguiente, el análisis que se presenta en esta tesis sobre el efecto del pH y los tioles sobre las formas variantes de la PRL, permitirá

correlacionar los cambios observados previamente en
observados en dichas variantes condiciones fisiológicas
con los cambios de particulares.
detectabilidad de la PRL

MATERIAL Y METODOS

Se utilizaron ratas lactantes primíparas (8-10 crías por camada), ratas vírgenes con ciclos regulares de cuatro días y ratas macho, todas de la variedad Wistar.

Los animales fueron mantenidos en jaulas individuales en un cuarto con condiciones controladas de luz (14h. luz, 10h. oscuridad) y temperatura (23°C a 25°C).

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación, después de una ligera anestesia con eter.

Las ratas lactantes fueron sacrificadas entre los días 7-14 *postpartum*, después de ser separadas de sus crías por un periodo de 8 horas (h). Un grupo de ratas lactantes fue inyectado con el amino-tiol

cisteamina (CSH) (120mg/Kg de peso corporal, s.c.) a las 4h. de un periodo de no succión de 8 h. y después fueron sacrificadas.

Otros grupos de estos animales fueron utilizados o bien para ser succionados por sus crías durante 30 min., después de 8 h. de no succión, o bien para ser incubadas sus adenohipófisis *in vitro* durante 2 h. (vease 42 para los detalles metodológicos).

Las ciclantes fueron sacrificadas a las 11:00 A.M. de cada día del ciclo.

Se realizaron los siguientes experimentos:

Experimento 1:

Se determinó el efecto de homogenizar las adenohipófisis de los animales utilizados, así

como, de incubar el homogenado, sobre la concentración adenohipofisiaria de prolactina (PRL); y se realizó la evaluación cualitativa de las variantes de masa de la hormona.

Las adenohipófisis fueron homogenizadas en una solución amortiguadora 0.05 M. de TRIS-HCl (rango de pH de 4.0 a 9.5) e incubadas a 37°C durante 0-3 h. Se tomaron alícuotas de estos homogenados a los 0, 30, 90, 180 min. de incubación. La PRL fue analizada tanto mediante electroforesis no desnaturizante en poliacrilamida (PAGE) (7 y 12.5%) y densitometría (38,42,54), así como en geles conteniendo duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE, 12.5%), bajo condiciones no reductoras y reductoras (NR y R), v.gr., con y sin la adición de

mercaptoetanol al 5%, seguido por inmuno-electrotransferencia (IET) (33,65,30).

Experimento 2:

La iodación del estándar de PRL (std. R-P 1 NIH) se llevó a cabo con el método descrito anteriormente [y alrededor de 1 mCi. de la misma fue añadido a los homogenados de adenohipófisis de ratas lactantes (pH 8.2 y 5.2)], los cuales fueron incubados por 0-4h., en presencia o no, de 10mM de GSH y 50mM de glutatión oxidado (GSSG). Se tomaron muestras de estos homogenados a los 0,5,15,30,60,90,180,240 min. de incubación. La PRL-I¹²⁵ fue analizada mediante autorradiografía de las placas de SDS-PAGE NR y R. Se realizó el análisis cuantitativo después de cortar las bandas de la hormona y contar la radioactividad en un contador

de radiaciones beta.

RESULTADOS

EFFECTO DEL pH SOBRE EL CONTENIDO DE PRL DE LOS HOMOGENADOS INCUBADOS DE ADENOHIPOFISIS.

En el presente estudio el efecto de incubaciones ácidas o alcalinas de homogenados de adenohipófisis de ratas lactantes (separadas de sus crías por 8h. y ratas inyectadas con CSH) fue comparado con lo obtenido en incubados de ratas ciclantes y ratas machos. Asimismo, el rango de valores de pH usando homogenados de adenohipófisis de ratas lactantes fue extendido a 5.5, 6.5, 7, 7.5, 8, 8.5, 9.5 y 10.

Como se observa en la fig.1, la concentración de prolactina disminuyó en homogenados ácidos (pH 5.5-6.5) y neutrales (pH

7.0-7.5) pero no en homogenados alcalinos (pH 8.5-10.0) de ratas lactantes no succionadas por 8h. Estos decrementos de la prolactina asociados al pH fueron bloqueados parcialmente por la preincubación de los homogenados con los alquilantes: iodoacetamida (IAA) o N-etilmaleimida [(NEM) (fig.2)], mientras que la adición de GSH aumentó, aún más, la indetectabilidad de la prolactina (fig.3). Por otra parte, la disminución en la detectabilidad de la PRL inducida por la administración CSH fue revertida en homogenados alcalinos (pH 8.0-10.0), v.gr., fig. 4, y

esta reversión fue incrementada por 1-5mM GSH (fig.3). Sin embargo, se observó que una mayor disminución en la

concentración ocurrió tanto en condiciones ácidas como neutrales (pH 5.5-7.5) (fig.4) y que la presencia de GSH

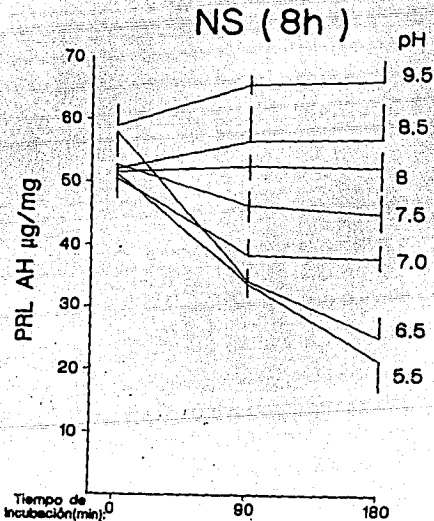
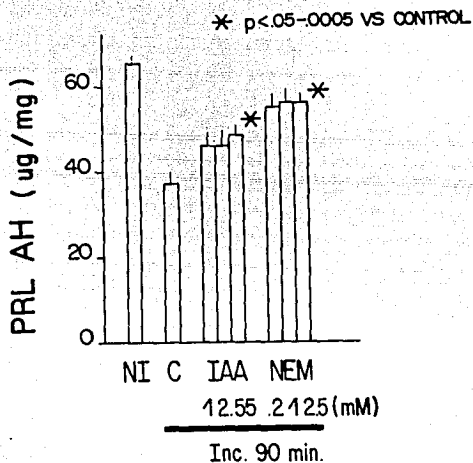


Fig.1. Efecto sobre la concentración de prolactina adenohipofisaria de rata lactante, no succionada por 8h., incubada durante 90 y 180 min. a 37°C. La PRL de los homogenados fue analizada mediante PAGE y densitometría.



pH 6.5

Fig.2. Efecto sobre la concentración de prolactina adenohipofisaria de incubar homogenados ácidos (pH 6.5) de ratas lactantes durante 90 min. a 37°C, con o sin las condiciones indicadas de los agentes alquilantes iodoacetamina (IAA) y N-etilmaleimida (NEM). La PRL fue analizada mediante PAGE y densitometría.

provoca aún mayor decremento en la concentración de la hormona (fig. 3). Al comparar los

efectos del pH en homogenados de ratas lactantes con las no lactantes, se observó que

mientras la incubación ácida (pH 6.0) de ratas en proestro disminuyó la detectabilidad de la hormona (-50%) la incubación alcalina (pH 8.0) provocó un incremento de la misma (+20%). Sin embargo, tanto en homogenados de ratas

en diestro, estro y machos se observó un menor efecto (-20%) de la incubación ácida y ningún efecto de la incubación alcalina (fig.5).

El análisis, por inmunoelectro-transferencia (Western-Blot), de los geles

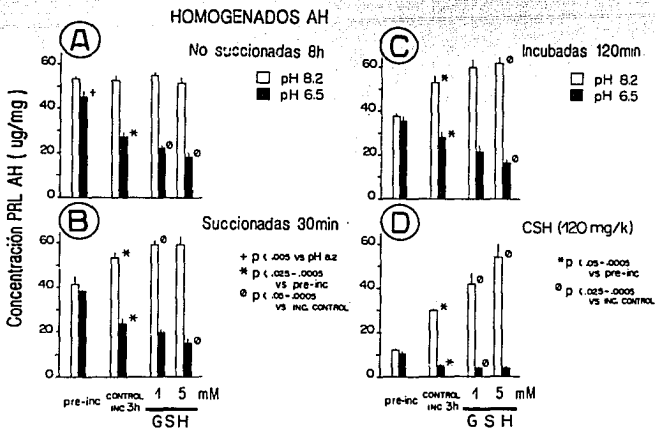


Fig.3. Efectos sobre la concentración de prolactina adenohipofisaria, de incubar homogenados ácidos (pH 6.5) y alcalinos (pH 8.2) por 3h. a 37°C, con y sin, las concentraciones indicadas de glutatión reducido (GSH): A) Homogenados de ratas no succionadas después de 8h.; B) homogenados de ratas succionadas 30 min. después de un periodo de no succión de 8h.; C) homogenados de adenohipófisis incubados por 2h.; D) homogenados de ratas inyectadas con cisteamina (CSH) a la 4ªh. de un periodo de no succión de 8h.

desnaturalizantes SDS-PAGE R y NR de homogenados de adenohipófisis de ratas lactantes reveló la presencia de 8-10 (pesos moleculares en rangos de 97-43K., 27K., 23K. y 22 - 16K.) bandas de PRL inmunorreactivas

respectivamente (fig.6).

Con relación al efecto del pH sobre las variantes de PRL, se observó que la incubación de los mismos por 90 min. a pH ácido (6.5), neutral (7.5) y alcalino (8.5) estuvo asociado con efectos diversos en dichas

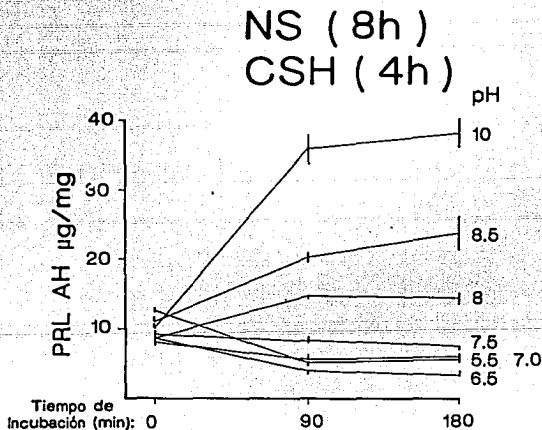


Fig.4.Efecto de diferentes pHs sobre la concentración de prolactina adenohipofisiaria de ratas lactantes no succionadas por 8h. e inyectadas con cisteamina (CSH) (120mg/Kg. P.C. S.C.) a la 4ªh. de un periodo de no succión de 8h., incubadas durante 90 y 180 min. a 37°C. La PRL fue analizada mediante PAGE y densitometría.

variantes, así como se observa en la fig.7., mientras que la forma monomérica de PRL de 24 K. disminuyó y las variantes poliméricas de alto peso molecular mayores de 100K., aumentan en incubaciones ácidas, tales efectos no se observan en los incubados a pH

neutro y alcalino. Por otra parte, se observó que la incubación de homogenados a pH neutral, aún sin incubación, dió lugar a la producción de variantes submonoméricas de PRL vrg. 18K. y 16K.; mientras que la incubación a pH alcalino hizo lo mismo en

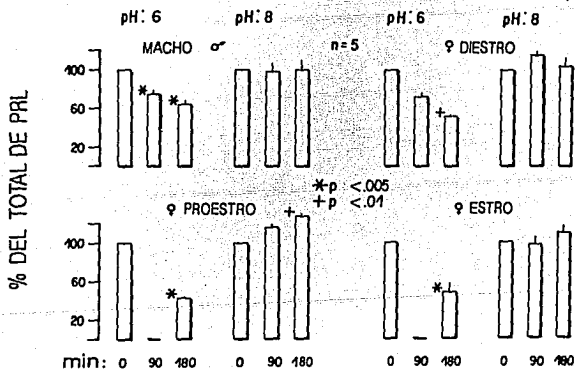


Fig.5. Cambios en la concentración de prolactina adenohipofisaria como resultado de incubar homogenados ácidos (pH6) y alcalinos (pH8) de hipófisis de ratas machos, en diestro, proestro y estro, durante 90 y 180 min. a 37°C. La concentración de PRL fue determinada mediante PAGE y densitometría. (No existen datos de 90min. para estro y proestro). (2 Muest. perd. 90min.)

IET: SDS - PAGE 12%

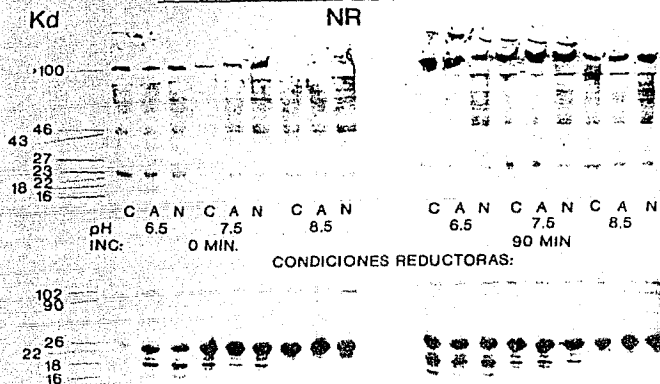


Fig. 6. Inmunolectrotransferencia (IET) de prolactina en homogenado de adenohipófisis de rata lactante después de electroforesis en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) de poliacrilamida al 12.5% bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). Los tejidos fueron homogenizados en amortiguador Tris-HCl (0.05M) pH 6.5, 7.5, y 8.5 durante 0-90 min., con o sin (C), aprotinina (A) 25µm/ml y N-etilmaleimida (N).

relación con las variantes de 21 y 22 K.

Los efectos de la incubación ácida sobre la PRL

24K. fueron bloqueados parcialmente con el alquilante NEM pero no por el inhibidor enzimático aprotinina (A).

EFFECTO DE INCUBAR PRL-I¹²⁵ EN HOMOGENADOS ACIDOS O ALCALINOS
DE HIPOFISIS DE RATA LACTANTE.

Como se mencionó en la primera parte de esta tesis, la hipótesis actual sobre la transformación fisiológica de la PRL en la hipófisis, considera que dicho fenómeno es debido a una polimerización reversible de la forma monomérica (24K.) de la misma, la cual es consecuencia de un proceso de intercambio tiol-disulfuro pH dependiente. Asimismo, asociado a este proceso, se considera como factible la proteólisis de la hormona con la consiguiente generación de variantes submonoméricas de la misma. Por estas consideraciones en los presentes experimentos se utilizó el estándar marcado de la hormona, el cual es en su

mayor parte monómero y se determinaron los efectos de la incubación ácida o alcalina, en presencia de agentes tiólicos reductores y oxidantes.

Los resultados obtenidos mostraron que la incubación alcalina (pH 8.2) de la PRL-I¹²⁵ no modificó, por si sola, la conformación de la molécula hormonal. Sin embargo, cuando dicha incubación se llevó a cabo en presencia de glutatión reducido (GSH), se observó una reducción inicial de dicha molécula de aproximadamente 30%, la cual fue seguida por la reoxidación gradual de la misma tanto hacia la forma monomérica como hacia la oligomérica (mayor de 100K.). Por otra parte, se observó también que

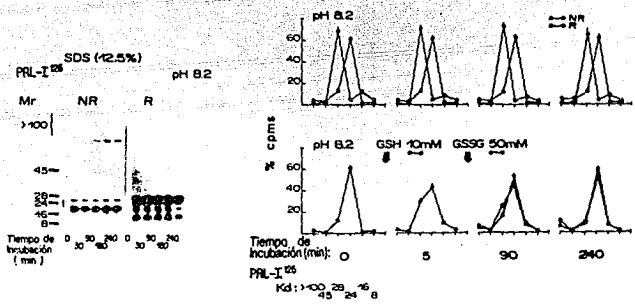


Fig.7. Efecto de incubar las variantes de masa de la PRL-I²⁵ en homogenizados alcalinos (pH 8.2) de ratas no succionadas por 8h., durante 0-4h., a 37°C con y sin la concentración indicada de glutati6n reducido (GSH) y oxidado (GSSG). La PRL fue analizada mediante auto-radiografía de geles de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). Se realizó el análisis cuantitativo mediante el conteo de la radioactividad de cada una de las bandas de PRL v.gr., 8K.>100K. (fig. derecha).

dichos cambios reoxidativos sucedieron con mayor rapidez cuando el glutati6n oxidado (GSSG) fue a~adido a la incubaci6n 15 minutos despu6s de haber agregado el GSH. (vease fig. 7). Con relaci6n a la

incubación ácida (pH 5.2), se observó que esta provocó reducción y se polimerización de las moléculas de PRL-I²³,

en adición, tales efectos se incrementaron en presencia de GSH (fig. 8).

Asimismo, se constató que

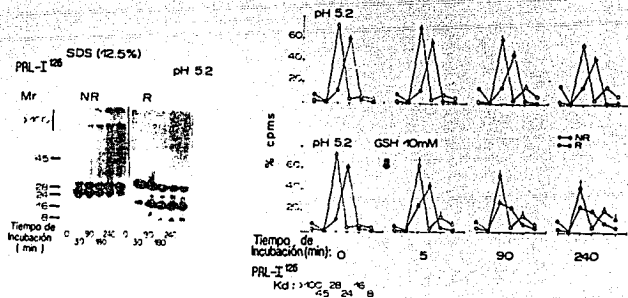


Fig.8. Efecto de incubar las variantes de masa de la PRL-I²³ en homogenados ácidos (pH 5.2) de ratas no succionadas por 8h., durante 0-4h., a 37°C con y sin la concentración indicada de glutatión reducido (GSH). La PRL fue analizada mediante autoradiografía de geles de SDS-PAGE bajo condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). Se realizó el análisis cuantitativo mediante

dicha incubación dió lugar a la generación de la forma "rota" de PRL-I", lo cual fue confirmado por la presencia de las variantes de 16K. y 8K. en geles de SDS - PAGE en condiciones reductoras (fig. 8).

DISCUSION

En un estudio anterior (42) se observó que la disminución en la detectabilidad de la PRL en homogenados de hipófisis de ratas lactantes en las que la PRL había sido inicialmente depletada por succión, la incubación *in vitro* de los tejidos o el tratamiento *in vivo* con cisteamina (CSH) pudo ser revertido mediante la incubación de los homogenados a pH 8.2; mientras que a pH 6.5 independientemente del tratamiento previo a la incubación, provocó el efecto opuesto y se obtuvo una disminución en la detectabilidad de la hormona (vease la fig. 3). Sin embargo, en este estudio no se determinó el efecto de otros valores de

pH ni se analizó el efecto de los mismos sobre homogenados de hipófisis no lactantes. Los resultados de la presente tesis apoyan la hipótesis de que los cambios en la detectabilidad electroforética y en la inmunoreactividad de la PRL hipofisiaria están asociados con mecanismos de intercambio tiol-disulfuro pH dependientes, que dichos mecanismos suceden a nivel postraducciona l y afectan sobre todo a la variante monomérica (24K.) de la hormona. De acuerdo a los resultados presentados, tanto de las incubaciones en diferentes pHs de homogenados de adenohipófisis de ratas lactantes no succionadas intactas, como de las tratadas con cisteamina (CSH) (Figs. 1 y

4), los efectos respectivos de disminución (homogenados de ratas intactas) o de aumento (homogenados de ratas tratadas con CSH) de la detectabilidad de la PRL se empezaron a manifestar dentro del rango de pH de 7.0 a 8.5 y posteriormente, a pHs mayores y menores, dichos efectos se incrementaron. Estos datos sugieren que dentro de dicho rango de pH se dispara la actividad enzimática que selectivamente aumentará o disminuirá la detectabilidad de la PRL-AH por la acción respectiva sobre el polímero o el monómero de la hormona. En efecto, dado que el glutatión reducido (GSH) existe en grandes concentraciones en los gránulos de PRL (36), es de suponerse que los efectos observados durante las incubaciones hayan sido el

resultado de la activación enzimática, presumiblemente de una tiol-transferasa (36), por el pH de las incubaciones. Asimismo, el hecho de que el efecto del pH haya sido incrementado por la adición a la incubación de GSH (fig.3) y que dicho efecto del pH haya sido bloqueado por los alquilantes NEM e IAA (fig.2), apoya la participación de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro en los cambios de detectabilidad de la PRL hipofisiaria, los cuales resultan de la polimerización reversible de la molécula hormonal (47). Así, por ejemplo, cuando una proporción importante de la hormona se encuentra en el estado polimérico, v.gr. por succión o incubación de la adenohipófisis, o por tratamiento con CSH (fig.3), la

incubación alcalina y la adición de GSH revirtieron la indetectabilidad de la PRL mediante la monomerización de la misma, mientras que el efecto opuesto ocurrió mediante la incubación ácida (fig. 1 y 3).

El efecto de las incubaciones ácida y alcalina se estudió también en homogenados de hipófisis de ratas hembras ciclantes y de ratas machos. Los resultados obtenidos mostraron que los homogenados de ratas en proestro presentaron el mayor efecto, tanto a la acción del pH ácido como del alcalino (fig.5), mientras que los homogenados de las ratas en otras fases del ciclo y las ratas macho mostraron menores efectos a la acción del pH ácido y ningún efecto al pH alcalino. Estos resultados

indican que los mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, responsables de los cambios de detectabilidad de la PRL en las condiciones empleadas, existen en animales no lactantes aunque la susceptibilidad de los mismos a la acción del pH varía de acuerdo a la situación fisiológica del animal. Dado que, como ya fue revisado en la primera parte de esta tesis, los niveles circulantes de estrogénos se incrementan durante el proestro y ejercen una acción estimulante sobre la secreción de PRL, es posible que la interconversión de formas de la hormona en la hipófisis durante el proestro esté incrementada en paralelo a la mayor secreción de la misma, de manera similar a lo que acontece durante la lactancia. Por consiguiente, los mayores efectos del pH observados en

dicha fase de proestro, pueden considerarse como una indicación de que dicha interconversión está incrementada.

Por otra parte, como se describió en la sección de Resultados, la incubación de homogenados de hipófisis de ratas lactantes por 90 min. a pH ácido (6.5), neutro (7.5) o alcalino (8.5) tuvo diversos efectos sobre las variantes inmunoactivas de la PRL (fig.6). Así en las incubaciones ácidas hubo una disminución en la variante monomérica (24K.) pero tal efecto no ocurrió en los incubados a pH neutro y alcalino. Estos efectos de la incubación ácida sobre la PRL de 24K. fueron parcialmente bloqueados por el alquilante NEM, pero no por el inhibidor enzimático aprotinina. En

conjunto, dichos resultados son consistentes con la hipótesis mencionada previamente de que la menor detectabilidad de la PRL en los incubados ácidos haya estado asociada a una disminución en la variante 24K. de la misma. Además, dado que estos efectos desaparecieron en condiciones reductoras, esto indica que dicha indetectabilidad fue debido a una polimerización por enlaces disulfuro de la forma monomérica de la PRL.

Por otro lado, en cuanto a la homogenización a pH ácido o neutral, se observó que aún sin incubación, dicha homogenización dió lugar a la producción de variantes submonoméricas de PRL, v.gr., 18-20K. y 16K., las cuales fueron observadas cuando la extracción se llevó a cabo en condiciones reductoras.

Mientras que, la homogenización e incubación a pH alcalino dió lugar a la aparición de variantes en la región de 21-23K. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la generación de variantes submonoméricas, v.gr. 16K. y 22K. ocurre por la acción de enzimas proteolíticas, las cuales, son activadas por pHs ácido y alcalino respectivamente (49, 62). Por otra parte, con respecto a las variantes de 18-20K., no parece haber descripción previa de su existencia en la literatura, ni del método por el cual esas variantes pueden ser generadas. Por este motivo, los resultados presentes pueden ser considerados como la primera descripción de la generación de dichas variantes por la incubación a pH ácido o neutral de homogenados de hipófisis.

Por ahora es difícil especular sobre la significación fisiológica de estas variantes. Lo único que puede afirmarse es que su producción en las condiciones mencionadas indican la existencia en la molécula de PRL de puntos sensibles a la proteólisis y que la enzima responsable es susceptible de ser activada a pH ácido o neutral.

De acuerdo a los resultados iniciales obtenidos en la presente tesis, así como en estudios previos (38,42,44,47), se planteó la posibilidad de que los cambios conformacionales de la molécula de PRL asociados a los cambios de detectabilidad de la misma ocurriesen preferencialmente a expensas de la variante monomérica de 24K. de la PRL. Por consiguiente, a fin de analizar esta posibilidad se

procedio a incubar un estándar iodado de la PRL, (el cual está constituido casi exclusivamente por la variante monomérica de la misma), con homogenados ácidos o alcalinos de hipófisis de rata lactante, en presencia o no de glutatión reducido y glutatión oxidado (GSSG).

De acuerdo con los resultados obtenidos, se observó que la incubación alcalina (pH 8.2) en presencia de GSH dió lugar a una reducción inicial de la hormona marcada, la cual fue seguida por la reoxidación de la misma tanto hacia la forma monomérica como hacia la oligomérica (mayor de 100K.) y que dichos

cambios ocurrieron con mayor rapidez en presencia de GSSG (FIG.8). Asimismo, fue interesante observar la presencia de una variante de aproximadamente 22K. cuando la extracción de los homogenados fue realizada en condiciones reductoras. Por otra parte, cuando la incubación se llevó a cabo a pH ácido (5.2), se observó reducción, polimerización y proteólisis de la PRL iodada, incluyendo la forma "rota" de la misma, cuando la extracción se realizó en condiciones no reductoras, mientras que, bajo condiciones reductoras, se determinó la presencia de 16 y 8K.

CONCLUSIONES

Estos resultados son confirmatorios de la hipótesis de que los cambios conformacionales de la PRL durante la transformación suceden a expensas de la forma monomérica (24K.) de la misma. Asimismo, estos resultados son consistentes con los observados sobre las variantes inmuoactivas de la PRL discutidos previamente, tanto en lo relativo a la dependencia del pH, para que sucedan los cambios de polimerización reversible de la hormona a partir de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, como para que sucedan, bajo la influencia del pH respectivo, los cambios de proteólisis que dan lugar a las variantes de 22K. y de 16 y 8K. Por lo tanto, estos resultados

sugieren la existencia de enzimas proteolíticas activadas a pH alcalino o ácido, respectivamente, que atacan puntos específicos de la estructura de la hormona. Sin embargo, estas enzimas no son susceptibles de ser inhibidas por el inhibidor enzimático aprotinina.

Aparentemente, la secuencia de eventos moleculares asociada a la indetectabilidad de la PRL durante la depleción, se puede resumir de la siguiente forma: primero los puentes disulfuro de la hormona monomérica se reducen por la activación de reductores tiólicos citosólicos, quedando libres los grupos cistina que son altamente reactivos, lo que favorece su reoxidación, pero

ahora interactuando con otras cadenas de PRL, lo que resulta en la aparición de formas poliméricas (no detectables); esta reacción estaría ligada a la existencia de una o más enzimas, las cuales actuarían en un doble sentido dependiendo del pH, dando como producto el polímero a pH ácido o neutral y el monómero a pH alcalino. Consecuentemente la depleción estaría relacionada con un pH ácido o neutral. Simultáneamente, durante la depleción, una parte del total de la PRL monomérica es atacada por otro grupo de enzimas proteolíticas que originan las variantes de peso molecular 16 y 8 K. Estas enzimas son activadas a pH ácido o neutral.

Las isoformas en cuestión se convierten en indetectables como resultado de su agregación al polímero de PRL. Por otro lado, a pH alcalino existe, también actividad enzimática proteolítica que genera variantes de PRL en el rango de 22K, cuyo significado fisiológico es desconocido.

Este modelo, en conjunto, ayuda a explicar la indetectabilidad de la prolactina en su inmunoadividad y bioactividad, así como la presencia de diversas isoformas de la misma y demuestra que es posible reproducir este tipo de fenómenos fisiológico que están presentes in vivo en condiciones in vitro.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Amemori, Y., C.L. Chen y J. Meites (1970). Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. *Endocrinology* 86: 506.
- 2) Bern, H.A., C.A. Loretz y C.A. Bisbee (1980). Prolactin and transport in fishes and mammals. *Prog. Reprod. Biol.* Vol. 6 Karger. Basel.
- 3) Butcher, R.L., N.W. Fugo y W.E. Collins (1972). Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rats. *Endocrinology* 90: 1125.
- 4) Chen, L. y J. Meites (1970). Effects of estrogen and progesterone on serum and pituitary prolactin levels in ovariectomized rats. *Endocrinology* 86: 503.
- 5) Cowie A.T., Forsyth, I.A. y Hart, I.C. (1980). Lactation. En F. Gross, A. Labhart., T. Mann y J. Zander (eds.), *Hormonal Control of Lactation*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York Cap. 4, pp 146-229.

6) De Greef, W.J., Plotsky, P.M., Neill, J.D. (1981). Dopamine levels in hypophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: Effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* 32: 229-233.

7) De Greef, W.J., Visser, T.S. (1981). Evidence for the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J. Endocrin.* 91: 213-223.

8) Eckert, R., Randall, D., Augustine, G. (1990). En: *Fisiología animal mecanismos y adaptaciones*. Tercera edición en español. Editorial Interamericana, McGraw-Hill, pp. 320, 415-416.

9) Fagin, K.D., Neill, J.D. (1981). The effect of dopamine on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin secretion in vitro. *Endocrinology* 109: 1835-1840.

10) Falconer, I.R., Rowe J.M. (1977). Effect of prolactin on sodium and potassium concentrations in mammary alveolar tissue. *Endocrinology* 101: 181-186.

11) Farquhat, M.G. (1977). Secretion and crinophagy in prolactin cells. En: *Comparative Endocrinology of Prolactin*. Eds. A.D. Dellman, J. A. Johnson, M.D. Klachko. Plenum press. New York. pp. 37-53.

12) Flückiger, E., E. del Pozo y K. von Werder. Prolactin. Physiology, Pharmacology and Clinical Findings. Monographs on Endocrinology. Vol. 23. New York, 1982.

13) Freeman, M.E. y J.D. Neill (1972). The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: A daily nocturnal surge. Endocrinology 90: 1292.

14) Freeman, M.E., L.E. Reichert, Jr. y J.D. Neill (1972). Regulation of the proestrus surge of prolactin secretion by gonadotropin and estrogens in the rat. Endocrinology 90: 232.

15) Freeman, M.E., S. Smith, S.J. Nazian y J.D. Neill (1974). Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. Endocrinology 94: 875.

16) Ganong, W.F. (1980). Prolactin: A general overview. En: Central and Peripheral Regulation of Prolactin Function. (MacLeod, R.M. y Scapagnini, U. Eds.) Raven Press. New York. pp 1-10.

17) Giannattasio, G., Zanini, A., Meldolesi, J. (1975). Molecular organization of rat prolactin granules. I. In vitro stability of intact and "membraneless" granules. J. Cell. Biol. 64: 246-250.

18) Grosvenor, C.E., Mena, F. (1974). Neural and hormonal control of milk secretion and milk ejection. En: Lactation: A Comprehensive Treatise. Eds. B.L. Larson, V.R. Smith (Eds.). Vol.1. Academic Press. New York. pp. 27

19) Grosvenor, C.E., Mena, F. (1980). Evidence that thyrotropin-releasing hormone and hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the rat. *Endocrinology*. 107: 863-868.

20) Grosvenor, C.E., F Mena (1971). Effect of suckling upon the secretion and release of prolactin from the pituitary gland of the lactating rat. *J. Animal Sci.* 32, Suppl. 1, 115.

21) Grosvenor, C.E., F Mena (1982). Regulating mechanisms for oxytocin and prolactin secretion during lactation. *Neuroendocrine Perspectives*. Vol. 1. Elsevier Biomedical Press. Amsterdam pp 69.

22) Grosvenor, C.E., F. Mena y D.A. Schaeffgen (1967). Effect of nonsuckling interval and duration of suckling on the suckling induced fall in pituitary prolactin concentration in the rat. *Endocrinology* 81: 449.

23) Grosvenor, C.E., Mena, F., Maiweg, H., Dhariwal, A.P.S., McCann, S.M. (1980). Effect of crude SME-extract, PIF and exogenous prolactin upon post-suckling reaccumulation of prolactin in the pituitary of the lactating rat. *J. Endocrin.* 47: 339-346.

24) Grosvenor, C.E., Mena, F., Withworth, N.S. (1980). Evidence that the Dopaminergic prolactin-inhibiting-factor mechanism regulates the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. *Endocrinology.* 106: 481-485.

25) Grosvenor, C.E., Martínez-Escalera y Mena F. (1982). Regulación neuroendocrina de la secreción de prolactina durante la lactancia. En: *Nuevos conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisiaria.* CONACYT. México p. 153.

26) Haisenleder, D.J., Moy, J.A., Gala, R.R., Lawson, D.M. (1986). The effect of transient dopamine antagonism on the thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in pseudopregnant rats. *Endocrinology.* 119: 1989-1995.

27) Haisenleder, D.J., Moy, J.A., Gala, R.R., Lawson, D.M. (1986). The effect of transient dopamine antagonism thyropin-releasing hormone-induced prolactin release in pregnant rats. *Endocrinology.* 119: 1980-1988.

28)Haro, L.S., Talamantes, F. (1983). Secreted mouse prolactin and stored ovine prolactin desamido isoforms: Effect of deamidation on both receptor binding and immunoreactivity. *Endocrinology*. (suppl.) 112: 116 (Abst.).

29)Hutchinson, R.E. (1978). Prolactin and parental behavior in birds and mammals. En: *Progress in prolactin physiology and pathology*. (Robyn, C. y M. Harter, Eds.). Elsevier North-Holland Biomedical Press. Amsterdam-Ney York, pp. 243-251

30)Hymer W.C., Motter K.A. (1988). Heterogeneity in mammotrophs prepared from diethylstilbestrol-induced prolactinomas. *Endocrinology* 122:2324-2338.

31)Jocelyn, P.C. (1972). Physical aspects of SH and SS groups. *Biochemistry of the SH group*. Ed. Academic Press. Londres pp. 47.

32)Kiefer, K.A., Malarkey, B. (1978). Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: Experimental conditions that alter gel filtration patterns. *J. Clin. Endocrin. Metab.* 46: 119-124

33)Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.

34) Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Lewis, L.J., Seavey, B.K., Sinha, Y.N. (1984). Glicosylated ovine prolactin. Proc. Natl. Acad. Sci. 81: 385-389.

35) Lawson, D.M., Stevens, R.W. (1980). Size heterogeneity of pituitary and plasma prolactin: Effects of chronic estrogen treatment. Life Sci. 27: 1489-1494.

36) Lorensen, M.Y., Miska, S.P., Jacobs, L.S. (1984). Molecular mechanisms of prolactin release from pituitary secretory granules. In: Prolactin Secretion: A Multidisciplinary Approach. Eds. F. Mena, C.M. Valverde. Academic Press. New York. pp. 141-160.

37) Lorensen, M.Y., Robson, D.L., Jacobs, L.S. (1983). Divalent cation inhibition of hormone release from isolated adenohypophysial secretory granules. J. Biol. Chem. 258: 8618-8622.

38) Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., Morales, M.T., Lorensen, M.Y., Mena, F. (1986). Reversal by thiols of dopamine-, stalk-median eminence-, and zinc-induced inhibition of prolactin transformation in adenohypophyses of lactating rats. Endocrinology. 118: 1803-1807.

39) 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 VIP: Stimulation via Ca^{2+} /protein kinase C pathway, *Neuroendocrinology*. 47: 38-45.

40) Martínez de la Escalera, G., Weiner, R.I. (1988). Mechanism(s) by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing action of TRH. *Neuroendocrinology*. 47: 186-193.

41) Mena, F. (1978). Control neuroendócrino de la lactancia. *Gaceta Médica de México*. 144: 2, 63.

42) Mena, F., Clapp, C., Aguayo, D., Lorensen, M.Y., Martínez de la Escalera, G. (1986). Thiol regulation of depletion-transformation and release of prolactin by the pituitary of the lactating rat. *Endocrinology*. 118: 1795-1802.

43) Mena, F., G. Martínez-Escalera, D. Aguayo, C. Clapp y C.E. Grosvenor (1982). Acción fisiológica de la prolactina sobre la glándula mamaria. Análisis experimental. En: *Nuevos Conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisaria*. CONACYT México: 137-151.

44) Mena, F., Martínez de la Escalera, G., Clapp, C., Aguayo, D., Forray C., Grosvenor, C.E. (1982). A solubility shift occurs during depletion-transformation of prolactin within the lactating rat pituitary. *Endocrin.* 111: 1086-1091.

45) Mena, F., Morales M.T., Clapp, C., Hummelt, G., Martínez de la Escalera, G. (1988). Effect of pH and thiols on polymerization and proteolytic processing of pituitary PRL. 70 Annual Meeting, The Endocrine Society, New Orleans, LA. Abstr. 171.

46) Mena, F., P. Pacheco, N.S. Whitworth y C.E. Grosvenor (1980). Recent data concerning the secretion and function of oxytocin and prolactin during lactation in the rat and rabbit. En: *Front. Hormone Res.* Vol. 6, Karger. Basel, pp.217

47) Mena F., Hummelt G., Aguayo D., Clapp C., Martínez de la Escalera G. y Morales 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.

48) Merchant-Larios, H., Mena, F. (1982). Evidence that extracellular glycoconjugates interact with prolactin granules during exocytosis in lactating rat adenohypophyses. *J. Ultrastructure Research.* 80: 53-61.

49)Mitra, J. (1980). A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I. Biosynthesis, characterization and regulation control. Biochem. Biophys. Res. Com. 95: 1750-1759.

50)Neill, J.D., M.E. Freeman and S.A. Tillson (1971). Control of proestrus surge of prolactin and luteinizing hormone secretion by estrogens in the rat. Endocrinology 89: 1448.

51)Neill, J.D. (1972). Sexual differences in the hypothalamic regulation of prolactin secretion. Endocrinology 90: 1154.

52)Neill, J.D. (1974). Prolactin: Its secretion and control. En: Handbook of Physiology. Eds. E. Knobil, Sawyer. Vol. IV. Part. 2. American Physiological Society. Washington, D.C. pp. 469-488

53)Neill, J.D. (1980). Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. En: Frontiers in Neuroendocrinology. Vol.6. Raven Press. New York. pp.129-141

54)Nicol C.S., Parsons J.A., Fiorindo R.P., Nichols C.W. (1969). Estimation of prolactin and growth hormone levels by polyacrilamide disc electrophoresis. J. Endocrinology 45: 183-196.

55) Nicoll, C.S. y H.A. Bern (1971). On the actions of prolactin among the vertebrates: is there a common denominator?. En: "Ciba Foundation Symposium on Lactogenic Hormones". (Wolstenholme, G.E.W y A. Knight, Eds.) Churchill Livingstone. London, pp. 299-324.

56) Nicoll, C.S. (1974) Physiological actions of prolactin. En: Handbook of Physiology. Vol. IV. Part 2. American Physiological Society. Washington pp.: 253-292.

57) Nicoll, C.S. (1978). Comparative aspects of prolactin physiology: Is the prolactin the initial growth hormone in mammalian species also?. En: Progress in prolactin physiology and pathology. (Robyn, C. y H. Harter, Eds) Elsevier North-Holland Biomedical Press. Amsterdam-New York, pp. 175-187.

58) Nicoll, C.S., B.A. White y F.C. Leung (1980). Evolution of prolactin. Its functions, and its receptors. En: Central and Peripheral Regulation of Prolactin Function. (MacLeod, R.M. y Scapagnini, U. Eds.) Raven Press. New York, pp. 11-25

59) Nicoll, C.S., Swaringen, K.C., Matteij, J.A.M. (1984). Relationship between depletion and release of prolactin in the lactating rat: A quantitative analysis. En: Prolactin Secretion: A Multidisciplinary Approach. Eds. Mena, F., C.M. Valverde. Academic Press. New York. pp. 285-301.

60) Nyberg, F., Roos, P., Wide, L. (1980). Human pituitary prolactin isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Biochim. Biophys. Acta.* 625: 255-259.

61) Plotsky, P.M., Neill, J.D. (1982). Interactions of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in the regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology.* 111: 168-173.

62) Powers C.A., Hatala M.A. (1990). Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: *in vitro* reaction requirements and cleavage

63) Riddle, O. (1963). Prolactin in vertebrate function and organization. *J. Natl. Cancer Inst.* 31: 1039.

64) Salas, A (1982). Aspectos bioquímicos y correlación estructura-función de la hGH, hPRL y hACTH. En: Nuevos conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisiaria. (Valverde, C., G. Fanghenel y F.Mena, Eds) CONACYT. México, pp. 39-57

65) Signorella A.P., Hymer W.C. (1984). An enzyme-linked immunosorbent assay for rat prolactin. *Anal. Biochem.* 136: 372-381.

66) Singh, R.N.P., Lewis, L.J., Seavey, B.K., Lewis, V.J. (1983). An open loop variant of prolactin. *Endocrinology.* (Suppl.). 112: 116 (Abst.).

67)Sinha, Y.N. (1980). Molecular size variations of prolactin and growth hormone in mouse serum: Strain differences and alterations of concentrations by physiological and farmacological stimuli. Endocrionology. 107: 1959-1969.

68)Vila-Porcile, E., Oliver, C. (1980). Exocitosis and related membrane events. En : Synthesis and release of adenohipophyseal hormones. Eds. H. Jutisz, K.W. McKernes. Plenum Press. New York. pp. 67-80.

69)Zanini, A., Giannattasio, G., Nussdorfer, G., Margolis, P.K., Meldolesi, J. (1979). Molecular organization of prolactin granules. II :Characterization of glycosaminoglycans and glucoproteins of bovine prolactin granule matrix. J. Cell. Biol. 86: 260-272.