

03086
3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

Colegio de Ciencias y Humanidades
Unidad Académica de los Ciclos Profesional y de Posgrado
Instituto de Investigaciones Biomédicas

18



ESTUDIO DEL PROCESO DE SECRECION DE PROLACTINA
Y SU REGULACION EN LA RATA LACTANTE

EJEMPLAR UNICO

T E S I S

Que para optar por el Título de
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

P r e s e n t a

GONZALO MARTINEZ DE LA ESCALERA

México, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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 esta 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.

ESTUDIO DEL PROCESO DE SECRECION DE
PROLACTINA Y SU REGULACION EN
LA RATA LACTANTE

Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, Ciudad Universitaria, 04510 México D.F.

GONZALO MARTINEZ DE LA ESCALERA

Septiembre, 1984.



I N D I C E .

RESUMEN	IV
INTRODUCCION	1
Generalidades de la Secreción de Prolactina en Diferentes Estadios Fisiológicos.....	1
Generalidades sobre el Proceso de Secreción de Prolactina: Diversos Enfoques.....	3
El Proceso de Secreción de PRL desde el Punto de Vista de la Biología Celular..	5
Generalidades Sobre la Fisiología de la Secreción de PRL en la Rata Lactante....	5
Objetivos.....	7
PROCESO DE SECRECION DE PROLACTINA	9
Biosíntesis de Prolactina.....	9
Síntesis Ribosomal y Segregación al Re- tículo Endoplásmico Rugoso.....	9
Transporte de PRL a Través del Retículo Endoplásmico Rugoso.....	10
Formación y Maduración de Gránulos de Prolac- tina	11
Mecanismos del Empaque Granular de PRL.	13
Exocitosis	14
Fusión de los Gránulos de PRL con la Membrana Plasmática.....	14
Fisión de la Membrana Gránulo-Celular y Liberación del Contenido Granular en el Espacio Extracelular.....	16
Incorporación de la Membrana Granular a la Superficie Celular.....	18
Reciclaje Membranal	18
Crinofagia	19

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Depleción y Liberación de Prolactina.....	19
General	19
Depleción de PRL	20
Liberación de PRL	21
Relación Existente entre la Depleción y la Liberación de la PRL	21
Transformación de la Prolactina	23
Posibles Mecanismos Involucrados en la Transformación de la PRL	24
Cambio en la Solubilidad de la PRL Du- rante la Transformación de la Misma ..	25
Transformación de la PRL en Condicio- nes <u>In Vitro</u>	31
Transformación y Liberación de PRL to- tal y PRL Marcada Isotópicamente, en Hipófisis Incubadas <u>In Vitro</u>	32
REGULACION DE LA SECRECION DE PROLACTINA	39
Diversos Niveles de Regulación	39
Regulación Hipotálmica del Proceso de Se- creción de PRL	40
Factores Hipotálamicos Inhibidores de la Secreción de PRL	41
Factores Hipotálamicos Facilitadores de la Secreción de PRL	42
Regulación Hipotalámica del Proceso Multifásico de Secreción de PRL	43
Factores Hipofisiarios que Intervienen en la Regulación del Proceso de Secreción de PRL	47
Influencia de la Edad de la PRL en su Secretabilidad	49
Retención de Prolactina Joven	58
Secreción Preferencial de PRL Madura .	61

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Retención Selectiva de la Hormona vieja	64
CONCLUSIONES Y DISCUSION GENERAL	67
BIBLIOGRAFIA	77

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESUMEN

El proceso de secreción de prolactina (PRI) se inicia con la síntesis de la hormona en el retículo endoplásmico rugoso, para continuar 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 entran en exocitosis, por medio de la 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 ejercen durante la succión. Cuando las ratas permanecen de 2 a 8 hs sin ser succionadas, la concentración de PRI en la adenohipófisis se incrementa mientras que el nivel circulante disminuye. En estas condiciones, la succión de las crías induce una desaparición (depleción) brusca del 30 al 50 % de la concentración de PRI adenohipofisiaria, así como el inicio de la liberación gradual de la hormona 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. A medida que la succión continúa, la discrepancia tiende a disminuir hasta desaparecer en caso de que la estimulación sea sostenida el tiempo suficiente. Debido a ésta y otras evidencias, se originó la hipótesis de que la depleción de la hormona precede en el tiempo y determina la liberación de la misma hacia la circulación. En el presente estudio investigamos el mecanismo por el cual ocurre la depleción de la hormona. Para ello, comparamos la concentración de la hormona en las hipófisis de animales succionados 15 min después de 8 hs sin succión y la de animales mantenidos sin succión por 8 hs, mediante dos tipos de extracción química: a) en amortiguador tris-HCl 0.13 M pH 7.2, así como, b) en amortiguador de carbonatos 0.05 M pH 10. Mediante este procedimiento encontramos que la depleción de PRI que se detecta en las hipófisis de animales succionados con respecto a las glándulas de los animales testigo cuando se realiza la extracción en Tris-HCl pH 7.2, no ocurre cuando la extracción se lleva a cabo en amortiguador de carbonatos a pH 10. Incluso se obtuvo el mismo resultado midiendo a la PRI marcada radioactivamente 8 horas antes de la succión y/o el sacrificio.

Para establecer comparaciones entre la depleción y la liberación de PRI marcada isotópicamente, se analizó la ocurrencia de estos fenómenos in vitro, situación que permite cuantificar con un mismo método (electroforesis en poliacrilamida) el contenido hormonal en la adenohipófisis así como en el medio de incubación. Encontramos que las hipófisis de ratas lactantes privadas de la succión de sus crías por 8 horas e incubadas 4 horas, mostraron un cambio del contenido de PRI a los 30 minutos de la incubación semejante al inducido in vivo por la succión de las crías (depleción), y opuesto al observado en las hipófisis de los animales succionados 15 minutos antes del sacrificio (repleción). Durante los siguientes 30 a 60 min de la incubación las hipófisis mostraron oscilaciones en el contenido de PRI. Las semihipófisis extraídas en carbonatos a pH 10, mostraron una disminución gradual del contenido de PRI. La liberación por su parte mostró una tendencia a la

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

a la disminución a medida que transcurrió la incubación. Por lo que respecta a la PRL sintetizada y marcada 8 horas antes del sacrificio, los cambios en el tejido y en el medio fueron semejantes a los descritos para la PRL total. El establecimiento de la actividad específica de la PRL liberada en comparación a la actividad específica de la PRL en el tejido, sugirió que la primera procede de aquella que se encuentra en forma indetectable en la hipófisis. Todos estos resultados sugieren que el estímulo de la succión de las crías induce un cambio en la PRL de su condición detectable a una condición indetectable, a partir de la cual ocurre la liberación hacia el exterior de la hipófisis.

Por otro lado, con el fin de estudiar la regulación intrínseca del proceso de secreción de la PRL, sobre la cual se ejerce el control de origen hipotalámico, analizamos la relación de la edad de la PRL con su actividad secretoria. Así, administramos un marcador radioactivo (leucina tritiada) a diversos tiempos antes de someter a las ratas a la succión de sus crías o bien de sacrificar e incubar sus hipófisis in vitro. Encontramos que la PRL de 1 hora o menos de edad a partir de su síntesis, así como PRL de 16 ó 24 horas de edad mostraron un nivel de marcaje muy bajo (< 50%) y no mostraron la depleción característica de la PRL de 4 ó 8 horas de edad y de la PRL total bajo la acción del estímulo de la succión. Asimismo, estas poblaciones hormonales mostraron una baja actividad en lo que a su liberación in vitro se refiere en comparación a poblaciones de 4 y 8 horas de edad. Todos estos resultados sugieren que las poblaciones más jóvenes son retenidas selectivamente y que requieren de cierto tiempo hasta alcanzar su secretabilidad máxima tanto por criterios de la depleción in vivo como de la liberación in vitro. Asimismo, las poblaciones más viejas de PRL, evidenciaron una posible degradación intracelular así como una retención selectiva posiblemente asociada al período prolongado (16-24 horas) en que estos animales no recibieron el estímulo de sus crías.

INTRODUCCION.

Generalidades de la Secreción de Prolactina en Diferentes
Estadíos Fisiológicos.

Los mamíferos se caracterizan por poseer glándulas especializadas en la secreción de un compuesto con propiedades nutritivas, destinado a la alimentación de las crías en el período inmediatamente posterior al parto. La regulación de esta secreción se lleva a cabo por medio de un complejo de hormonas (Cowie y Tindal, 1971), cuyos componentes varían de acuerdo con las especies, y entre las cuales destaca la Prolactina (PRL) (ver Cowie y Folley, 1961). Esta hormona es producida en la hipófisis anterior o adenohipófisis y es secretada en respuesta a la succión de las crías (Grosvenor y Mena, 1971). Es importante mencionar, que además de estimular la secreción láctea, la PRL ejerce por lo menos 85 diversos efectos identificados en toda la escala de los vertebrados, tanto dentro como fuera de la esfera de la biología reproductiva (Nicoll, 1974). Así, en peces, anfibios, reptiles, aves y mamíferos, la PRL ha sido involucrada en una serie de efectos que Nicoll (Nicoll, 1974) catalogó en tres grandes categorías: acciones relacionadas con la reproducción, acciones relacionadas con el crecimiento y acciones osmorreguladoras. Dada la gran diversidad de sus acciones, como es de esperarse la regulación de la secreción de la PRL involucra mecanismos muy variados. Entre

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

estos, los más estudiados son aquellos asociados a la fisiología reproductiva en los mamíferos. Así por ejemplo, en la rata, especie predilecta para el estudio de la secreción de la hormona, la PRL estimula el crecimiento y la secreción de las glándulas mamarias (Tucker, 1974; Cowie y Tindal, 1971), estimula la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo (Smith y col., 1976), y el crecimiento y funcionamiento de la próstata en el macho (Negro-Vilar y col., 1977). La concentración de PRL circulante se mantiene baja durante el diestro en la rata; se incrementa bruscamente durante la tarde y la noche del proestro, y declina nuevamente hasta valores basales en la mañana del estro (Neill, 1974). Este incremento en los niveles de PRL se encuentra precedido y es estimulado, directa o indirectamente, por la secreción folicular de estrógenos (Smith y col., 1975). Durante los primeros 10 a 11 días del embarazo, los niveles circulantes de PRL se incrementan dos veces al día a partir de la estimulación cervical proporcionada durante el coito. Puesto que dichos incrementos se repiten espontáneamente durante 10 a 11 días (Smith y Neill, 1976), se ha sugerido que la hormona es secretada durante ésta fase con un verdadero ritmo circádico controlado por el sistema nervioso central (Bethea y Neill, 1979) en el cual es mínima la participación de los esteroides ováricos (Freeman y col., 1974). A partir del día 11 del embarazo la concentración circulante de PRL se mantiene en valores muy bajos hasta uno ó dos días antes del parto cuando ocurre un incremento significa-

tivo (Amenomori y col., 1970), aparentemente causado por el incremento en la secreción de estrógenos y la depresión en la secreción de progesterona que ocurren en ese momento. Durante la lactancia y a diferencia de lo que acontece fuera de este estado fisiológico, la secreción de PRL ocurre de manera fásica en respuesta a la estimulación proporcionada por las crías (Neill, 1974; Neill, 1980). En esta fase, el principal estímulo para la secreción de la PRL es el estímulo neurogénico de la succión, el cual activa un reflejo neuroendócrino que genera una liberación de PRL hacia la circulación. El aumento en la concentración sérica de PRL que comienza a ser significativo a los pocos minutos de iniciado el estímulo, alcanza valores máximos a los 30 min, los cuales se mantienen hasta los 60 min ó aún más. En cuanto se suspende la aplicación del estímulo, los niveles circulantes de PRL comienzan a declinar (Grosvenor y Mena, 1971; Grosvenor y Whitworth, 1974).

Generalidades Sobre el Proceso de Secreción de Prolactina:
Diversos Enfoques.

El estudio de la secreción de PRL ha sido multidisciplinario, incluyendo tanto un enfoque puramente analítico intentando dilucidar los mecanismos celulares, bioquímicos y moleculares involucrados en el proceso de secreción, como un enfoque integrativo de la relación funcional hipofisaria con el medio interno y con el sistema nervioso central.

Debido a ésta variedad de puntos de vista, muchas veces resulta difícil realizar comparaciones entre conceptos establecidos en distintos niveles de estudio, máxime si se considera que en general las condiciones experimentales utilizadas suelen ser diferentes. Dada la complejidad del proceso de secreción de la PRL y considerando como esencial para su comprensión el conservar el enfoque integrativo de estudio del fenómeno en cuestión, los experimentos que se presentan en ésta tesis han sido realizados con el propósito de establecer vínculos entre conceptos generados por estudios desarrollados a diversos niveles de integración. La intención implícita de los trabajos desarrollados en esta línea ha sido la de establecer las condiciones funcionales del proceso de secreción de la PRL, en base a las cuales profundizar en los mecanismos celulares y moleculares involucrados, sin apartarse del marco integral de referencia.

En general, el proceso de secreción de PRL se desenvuelve en gran medida como el proceso de secreción de todas las proteínas cuyo destino es la secreción, ya sean éstas secreciones endócrinas o exócrinas. Por esta razón, y dado que este sistema posee algunas ventajas en cuanto a la manipulación para su estudio experimental, se ha utilizado frecuentemente como modelo del proceso de secreción proteínica. Así, tanto desde el punto de vista de la fisiología celular como de los mecanismos moleculares comprendidos en su proceso, la secreción de PRL se ha estudiado intensamente.

El Proceso de la Secreción de PRL Desde el Punto de Vista de la Biología Celular.

El proceso de secreción de PRL por el lactotrofo, que es la estirpe celular hipofisiaria responsable de la producción de ésta hormona, consta de una serie de etapas continuas, desde la síntesis polipeptídica de la hormona hasta la liberación de la misma hacia el espacio extracelular, que han sido divididas en una serie de eventos discretos para facilitar su estudio. El proceso se inicia con la síntesis de la PRL en el retículo endoplásmico rugoso (RER), continúa con la translocación de la hormona hacia el aparato de Golgi, donde ésta es empacada en forma de vesículas o gránulos rodeados de membrana, forma en la cual permanece hasta su liberación hacia el exterior o su degradación por las estructuras digestivas celulares. La hormona en forma granular sufre un proceso de maduración, el cual ha sido asociado a una serie de cambios químicos y morfológicos en la estructura de la matriz del gránulo, hasta iniciarse la etapa final del proceso de secreción de la hormona, es decir, la exocitosis.

Generalidades Sobre la Fisiología de la Secreción de PRL en la Rata Lactante.

La secreción de la PRL es un evento complejo que involucra una transformación de la hormona, previa a la li-



beración propiamente dicha de la misma hacia el espacio extracelular. La primera observación en este sentido fue realizada en 1937 por Reece y Turner, quienes describieron que en la rata lactante, la aplicación de un período de succión por parte de las crías, provocaba una reducción drástica en la concentración de la PRL en la hipófisis. Dicha reducción del contenido hormonal de la glándula fue calificada como de depleción*, suponiéndose que representaba la salida de la hormona hacia la circulación. Sin embargo con el advenimiento del radioinmunoanálisis (RIA) y la posibilidad de cuantificar a la hormona en la circulación, se encontró que la depleción del nivel de PRL en la glándula no se acompañaba de un incremento de igual magnitud en la concentración de la hormona en la circulación (Subramanian y Reece, 1975; Grosvenor y Whitworth, 1974; 1979; Grosvenor y col., 1979a; 1979b). En lugar de ello, la liberación de la hormona hacia la circulación ocurría de manera constante durante el tiempo que duraba la succión, con lo cual, al cabo del tiempo, la cantidad total de hormona liberada correspondía con aquella previamente depletada de la hipófisis (Grosvenor y col., 1979a). Esta correlación temporal entre la depleción rápida de la hormona en el tejido y la liberación

* El término "depleción" se emplea para referirse al término "depletion" que en inglés es utilizado para denotar: agotamiento, disminución rápida, vaciamiento, etc. Dado que el término "depleción" no existe en idioma español, su uso en la presente tesis es con el propósito de conservar su connotación original y evitar posibles confusiones.

lenta de la misma hacia la circulación, llevó a postular la hipótesis de que la hormona liberada provenía precisamente de aquella previamente depletada del tejido, la cual había sufrido una transformación que la hacía indetectable a los métodos de identificación (véase más adelante) y que representaba la forma liberable de la hormona. Recientemente, se ha encontrado que la depleción de la hormona difiere de la liberación de ésta en varias características funcionales tales como la cinética de ambos procesos (Grosvenor y col., 1979a; Mena y col., 1980, Grosvenor y Whitworth, 1974), el umbral de activación de éstos (Grosvenor y col., 1979b; Grosvenor y col., 1981), así como los mecanismos hipotalámicos encargados de su regulación (Grosvenor y col., 1980; Grosvenor y Mena, 1980). Sin embargo a pesar de estos conocimientos sobre las características funcionales de la depleción y de la liberación de la PRL durante la lactancia en la rata, nada se sabe acerca de la naturaleza de la transformación que sufre la hormona y que tiene como consecuencia dicha depleción.

Objetivos.

Uno de los objetivos principales del presente trabajo consistió en analizar el tipo de mecanismo responsable de la depleción-transformación de la hormona en la glándula por efecto de la succión, así como de la posible naturaleza del cambio sufrido por la hormona. Dentro de este objetivo y encaminado a facilitar su estudio, se analizó también la

existencia del fenómeno de la depleción en condiciones de in cubación de hipófisis in vitro.

El segundo de los objetivos fue analizar la posible relación entre la edad de la prolactina a partir de su síntesis y la secretabilidad de la misma por la hipófisis en condiciones fisiológicas. Este análisis fue considerado importante para establecer la participación de factores locales intrahipofisarios en la regulación del proceso de secreción.

Nota: El formato de la presente tesis, de tipo monográfico, fue seleccionado por considerarse que dicha presentación enmarca apropiadamente los resultados originales que la sustentan, dentro del cuerpo teórico del tema desarrollado. Dada la amplitud y variedad del material recopilado que no es original del autor, la exposición del mismo sigue un curso en el cual se conjuntan las evidencias experimentales acerca de la heterogeneidad intrínseca del proceso de secreción de la PRL y posteriormente se describen las evidencias experimentales de la regulación y control de las etapas que conforman dicho proceso. Enmarcados en este cuadro general, los resultados originales fueron intercalados dentro de los capítulos correspondientes. (Ver secciones: "Transformación de la Prolactina", pp.23-39 y "Factores Hipofisarios que Intervienen en la Regulación del Proceso de Secreción de Prolactina", pp.47-67).

complejo de Golgi. No se han identificado aún fuerzas específicas que pudiesen ser responsables de los movimientos de la PRL recién sintetizada hacia la periferia del Golgi. De acuerdo con Zanini y col. (1980), dado que las moléculas de PRL muy probablemente son solubles durante su estado en las cisternas del RER, es de esperarse que su movimiento ocurra al azar por difusión simple. Esta difusión al azar puede convertirse en un movimiento vectorial si se considera la existencia de un adecuado mecanismo de atrapamiento que restrinja el movimiento de las moléculas en un punto específico del sistema. Una de las consideraciones que se derivan de esta situación, es la existencia de sitios de unión a la PRL en los elementos celulares de transición, que algunos han propuesto como verdaderos receptores unidos a la membrana en su cara luminal (Jamieson, 1979). De esta manera, la unión de la hormona a un receptor resultaría en su acumulación como paso previo a su translación al aparato de Golgi. De ser cierta esta última posibilidad, así se iniciaría el proceso de "empaquetado" que tiene lugar en el complejo de Golgi, a partir del cuál, la hormona va a encontrarse formando vesículas, aparentemente no en forma soluble, sino en estado "sólido".

Formación y Maduración de Gránulos de PRL.

La posibilidad de que la hormona no se encuentre en forma soluble en el gránulo, partió de un trabajo de Gian



nattasio y col. (1975) en el cual describen que los gránulos de PRL despojados de su membrana limitante por un detergente moderado (lubrol Px), e incubados in vitro, conservan su estructura. Muy importantes para la interpretación de los resultados del presente trabajo, como se verá más adelante, resultaron las maniobras utilizadas por éstos mismos autores para determinar las condiciones necesarias para la solubilización de los gránulos. Como ya mencioné, los gránulos sin membrana se mantuvieron estables en condiciones isotónicas, en un rango de pH de 3.5 a 6.5. Sin embargo, fueron parcialmente disueltos cuando la incubación se efectuó en un amortiguador isotónico de fosfatos en sacarosa a pH 7.4. En estas condiciones se solubilizó un 40% de la PRL al cabo de una hora, a 24°C. La solubilización mostró una relación directa con el valor del pH entre 6.5 y 9.0, y fué dependiente de la composición iónica del fluido de incubación, siendo un amortiguador de carbonatos más efectivo que el de fosfatos. Respecto a la fisiología del fenómeno, los autores encontraron que la estabilidad de los gránulos guarda una relación directa con la edad de los mismos. Esto, en base a que la solubilización de PRL recién sintetizada, marcada isotópicamente, resultó ser mayor que la de la hormona más antigua (analizada a través de la actividad específica de la hormona soluble). Asimismo, en experimentos con doble marca isotópica aplicada a intervalos diferentes, la proporción de solubilización de la hormona más joven ocurrió a una tasa mayor que la mostrada por la hormona más antigua (Zanini y

col., 1980).

Mecanismos del Empaque Granular de PRL.

Se han sugerido varios mecanismos de concentración de la PRL en gránulos, asociados a las funciones del aparato de Golgi de transporte iónico y de síntesis de glicoproteínas y glicosaminoglicanos. En relación al transporte iónico, se ha sugerido que la presencia de bombas iónicas específicas en las membranas del aparato de Golgi (Selinger y col., 1970; Argent y col., 1975; Baumrucker y Keenan, 1975) puede mantener un ambiente iónico específico en el interior de ésta estructura, como se ha demostrado mediante técnicas citoquímicas, incluso en lactotopos, a partir de lo cual se ha postulado la existencia de un ambiente con alta concentración catiónica en las cisternas de Golgi (Clemente y Meldolesi, 1975; Stoeckel y col., 1975; Reith, 1976). Basados en la capacidad del calcio de establecer puentes entre cargas negativas adyacentes y en que ciertos gránulos de secreción (como los existentes en glándulas suprarrenales y parótidas) contienen una alta concentración de calcio, se ha considerado la hipótesis de que el calcio, así como otros iones divalentes, puedan jugar un papel importante en el empaque de los gránulos. Contra la participación exclusiva del calcio en éste fenómeno, existen datos como el de la relación molar Ca^{++}/PRL (Zanini y Giannattasio, 1974) que resulta demasiado baja para considerar una posible unión de toda la PRL con calcio.

Respecto a la participación de glicoproteínas y glicosaminoglicanos en el empaque de los gránulos de PRL, a partir de observaciones citoquímicas, Rambourg y Racadot (1968) han postulado que moléculas glicosiladas serían las responsables de formar una coraza de condensación alrededor de la matriz de prolactina.

Por otro lado, más recientemente, Giannattasio y colaboradores (Giannattasio y Zanini, 1976; Zanini y col., 1979) analizaron la composición de los gránulos de PRL de la hipófisis de la rata y de la vaca, y encontraron que en la matriz del gránulo, además de la hormona, existen otros componentes en muy bajas concentraciones. Muchos de éstos se han identificado como glicoproteínas y otros como glicosaminoglicanos, aparentemente asociados a la PRL por puentes iónicos. Estas observaciones apoyan por consiguiente la hipótesis mencionada. Sin embargo, dado que la dinámica de la liberación de PRL es diferente a la que se observa durante la liberación de macromoléculas de azúcar en condiciones in vitro, no es posible pensar en una unión simple de estos dos compuestos. Junto a lo ya mencionado sobre la participación iónica en el evento, el empaque de los gránulos parece ser un proceso complejo.

Exocitosis

Fusión de los Gránulos de PRL con la Membrana Plásmatica.

La liberación de la PRL hacia el exterior de la célula ocurre a través del fenómeno conocido como exocitosis ó emiocitosis. Este fenómeno consiste en la transferencia del contenido de los gránulos, del compartimiento intracelular hacia el espacio extracelular mediante un complejo proceso membranaral, en el cual no ocurre en ningún momento una discontinuidad en la superficie que delimita a la célula. Como ya se mencionó, a partir del momento en el que la hormona abandona el complejo de Golgi, ésta se encuentra concentrada formando una matriz densa, delimitada y a la vez aislada de los demás componentes del citoplasma, por una membrana (Zanini y col., 1980). Esta membrana es aparentemente igual a las demás membranas celulares, y como hemos visto, en la actualidad es difícil definir con precisión el tipo de relación que se establece entre ésta y la matriz granular. Los gránulos de PRL, como se mencionó en la sección anterior, sufren una serie de modificaciones estructurales y químicas hasta alcanzar su plena madurez. En estas condiciones ocurre la exocitosis, a la cual se le ha dividido convencionalmente en tres etapas para su estudio y descripción (Vila-Porcile y Oliver, 1980). La primera etapa comienza con el establecimiento de un punto de contacto entre la membrana granular y la membrana celular, seguido inmediatamente por la fusión de ambas membranas y la formación de un poro o diafragma. La formación de este diafragma y su consecuente apertura implican el establecimiento de una continuidad física entre el interior del gránulo y el

espacio extracelular. Esta primera fase del evento parece ocurrir muy rápidamente, a juzgar por la bajísima frecuencia con la que ha llegado a ser observada por ultramicroscopía (Vila-Porcile y Oliver, 1980). En contraposición, la frecuencia con la que se han observado los gránulos en la segunda fase, indica una duración considerablemente mayor de los gránulos en ésta fase.

Fisión de la Membrana Gránulo-Celular y Liberación del Contenido Granular en el Espacio Extracelular.

Esta segunda fase o fase omega (Ω) consiste en la apertura total del diafragma, permitiendo así la salida del contenido granular (Norman, 1976). En esta fase el contenido granular es transferido al espacio extracelular. Morfológicamente se observan ciertos cambios en la matriz del gránulo, como la reducción gradual de su densidad electrónica y su gradual separación de la membrana del saco exocitótico (Vila-Porcile y Oliver, 1980). Obviamente, se ha considerado que en esta fase, el fluido extracelular puede penetrar al interior del saco exocitótico e interactuar con el contenido granular. Así se encontró experimentalmente la penetración de marcadores extracelulares como son la peroxidasa de rábano (Vila-Porcile, 1975) y la ferritina (Farquhar, 1978).

En estos trabajos se describieron diversos fenómenos tales como la polarización de la exocitosis, la que ocu

rre exclusivamente en ciertas porciones de la célula (Vila-Porcile, 1975), eventos asociados a la exocitosis como el reciclaje de la membrana mediante la formación de vesículas endocitóticas y la internalización de diversos materiales (Farquhar, 1978; Pelletier, 1973; Farquhar y col., 1975; Tixier-Vidal y col., 1976; Vila Pocile y Oliver, 1978).

Recientemente con el empleo de lectinas como la concanavalina A y la aglutinina del germen de trigo, se observó una interacción entre ciertos glicoconjugados y gránulos secretores durante la exocitosis (Merchant-Larios y Mena, 1982). Células previamente fijadas en diversos estados fisiológicos, fueron expuestas a las lectinas, moléculas que reaccionan con ciertos compuestos glicoconjugados, revelando su ubicación. Así se encontró que los gránulos de PRL durante la exocitosis interactúan con glicoconjugados extracelulares normalmente presentes en el medio que baña a las células. Esta interacción puede tener relevancia funcional durante la secreción de la PRL. Como se verá en detalle más adelante, coincidiendo con el evento de la exocitosis, la PRL sufre una transformación que origina la depleción de la hormona de la hipófisis (Mena y col., 1982). Probablemente, la interacción de los gránulos con los glicoconjugados extracelulares intervenga en la transformación de la PRL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Incorporación de la Membrana Granular a la Superficie Celular.

La tercera y última fase de la exocitosis, casi tan hipotética como la primera, consiste en la adhesión del saco exocitótico vacío a la membrana plasmática.

A pesar de la aposición de las membranas de numerosos gránulos a la membrana celular, la superficie de ésta última no aumenta sino transitoriamente, puesto que existe un mecanismo inverso a la exocitosis, el cual es responsable de la reinternalización de las membranas granulares.

Reciclaje Membranal.

El exceso de membrana que tiende a aumentar la superficie celular durante la exocitosis granular, es reincorporado al interior de la célula para integrarse nuevamente a la vía secretoria. Mediante el empleo de marcadores específicos de membrana como la ferritina cationizada, así como marcadores no membranales como la ferritina nativa, Farquhar (1978) encontró que la membrana que es reincorporada al interior celular se integra al Golgi, a lisosomas, a estructuras del sistema Golgi-retículo endoplásmico-lisosomas, así como a gránulos de PRL en diversos estadios de madurez. Por su parte, el contenido de las vesículas endocitóticas, de origen extracelular es siempre incorporado a lisosomas. Así, por medio de este reciclaje continuo de membranas, el

mamotropo conserva constante su superficie, a pesar de la actividad exocitótica que presente en un momento dado.

Crinofagia.

La descarga del contenido granular no ocurre exclusivamente hacia el exterior de la célula, sino que puede ocurrir hacia otro compartimiento celular: los lisosomas (Farquhar y col., 1975; Farquhar, 1977). Este proceso, denominado crinofagia ocurre principalmente en estados de baja actividad secretora, como por ejemplo en la hipófisis de la rata lactante cuando las crías son retiradas de la madre por 24 hs ó más, impidiéndose así la aplicación del estímulo de la succión. Una vez que los gránulos entran en contacto con los lisosomas, el contenido de los primeros es degradado por las enzimas digestivas presentes en los segundos.

Depleción y Liberación de Prolactina.

General.

Como ya se mencionó, se sabe que la liberación de PRL por la adenohipófisis de la rata lactante ocurre como resultado de la activación de un reflejo neuroendócrino inducido por el estímulo neurogénico de la succión (Ver: Grosvenor y Mena, 1971).

Sin embargo, esta liberación no ocurre de manera directa, sino que se encuentra precedida por un evento intracelular que aparentemente involucra una transformación de la PRL de un estado detectable a otro indetectable, por lo cual ha sido referido como una depleción.

Depleción de PRL.

Reece y Turner (1937) encontraron que la aplicación del estímulo de la succión a ratas lactantes, reduce significativamente la concentración de PRL, medida por bioensayo, en la adenohipófisis. Posteriormente esta observación se extendió a otras especies como el conejo y el cobayo (Holst y Turner, 1939). Posteriormente esto fué confirmado tanto con la medición de la hormona por bioensayo (Grosvenor y col., 1967; Sar y Meites, 1969; Convey y Reece, 1969), como mediante el uso del radioinmunoensayo (Subramanian y Reece, 1975; Amenomori y col., 1970) y de la electroforesis en gel de poliacrilamida (Grosvenor y col., 1979b; Mena y col., 1982). En síntesis la depleción de la PRL hipofisiaria es un evento rápido; puesto que ocurre en unos minutos (Grosvenor y col., 1967) y masivo; dado que involucra entre un 30 y 50% del contenido total de la PRL hipofisiaria (Grosvenor y col., 1979b; Mena y col., 1980; Grosvenor y col., 1981; Mena y col., 1982).

La magnitud de la depleción inducida por la aplicación de un estímulo, no se suma ni en el tiempo ni en el

FALLA DE ORIGEN

espacio con la aplicación de otros estímulos (Grosvenor y col., 1979b).

Liberación de PRL.

La liberación de la PRL valorada por el nivel circulante de ésta y tomando en cuenta su depuración metabólica, se calculó que ocurre a una tasa constante entre 400 y 600 ng por minuto (Grosvenor y Whitworth; 1974; Grosvenor y col., 1979a). Esta tasa de liberación se sostiene durante el tiempo que se aplica el estímulo a la succión.

Relación Existente Entre la Depleción y la Liberación de la PRL.

Mediante el empleo del método de incubación de hipófisis en condiciones in vitro, Swearingen (1971) y Nicoll (1972) analizaron la concentración de PRL en el tejido, así como la liberación al medio, por hipófisis provenientes de animales estrogenizados en el primer caso, y lactantes en el segundo. Ambos trabajos señalan una discrepancia cuantitativa entre la hormona depletada y la liberada. En el primer trabajo se concluye que es posible la liberación de la hormona a partir de un reservorio indetectable, mientras que en el segundo se afirma que la depleción de la hormona puede ocurrir sin que sea liberada.

Como se señaló previamente, existen claras dife-

rencias en la dinámica de ambos eventos. A los pocos minutos de iniciada la succión, la depleción de la hormona alcanza proporciones del 30 al 50% del contenido hipofisiario, lo que representa varias decenas de microgramos de PRL, valorada a través de la electroforesis en gel de acrilamida (Grosvenor y col., 1979b, Mena y col., 1980; Grosvenor y col., 1980; Grosvenor y col., 1981; Mena y col., 1982). En este mismo tiempo, la cantidad de hormona liberada a la circulación sólo alcanza unos dos o tres microgramos. Esta clara discrepancia se observa pocos minutos después de iniciada la succión y tiende a disminuir a medida que la aplicación del estímulo continúa, pues la magnitud de la depleción no aumenta después de los primeros minutos, mientras que la liberación mantiene una tasa constante durante el tiempo que se aplica el estímulo. Por consiguiente, si la succión se sostiene el tiempo suficiente, la magnitud de la liberación alcanza un valor aproximado al de la depleción.

Existe una relación directa entre la duración del período sin succión previo a la aplicación del estímulo y la magnitud de la depleción, cuando este período varía entre 2 y 12 horas (Amenomori y col., 1970; Subramanian y Reece, 1975; Nicoll y col., 1976). La misma relación directa se encuentra entre dicho período sin succión y la liberación de PRL al plasma, mientras que no se aprecia cambio alguno en la depuración metabólica de la hormona (Grosvenor y col. 1979a). La conjugación de estos resultados obtenidos por diferentes grupos de trabajo, sugieren la existencia de una

relación cuantitativa entre la depleción de la PRL y la liberación de la misma, cuando son tomadas en cuenta sus diferentes dinámicas. Grosvenor y col. (1979a) concluyeron que durante la fase de depleción, la PRL sufre una transformación de algún tipo, la cual la hace indetectable a los métodos de cuantificación y a su vez la convierte en la forma liberable de la hormona, la cual irá siendo liberada en la medida en que el estímulo continúa siendo aplicado.

Transformación de la Prolactina.

En la actualidad podemos distinguir al evento de la depleción-transformación del evento de la liberación tanto por las características ya descritas de cada uno como por la naturaleza de la regulación superior que ejercen sobre ellos ciertos factores de origen hipotalámico. En la sección: REGULACION DEL PROCESO DE SECRECION DE PROLACTINA, se detallarán las diferencias en las respuestas que ambos eventos presentan a dichos factores, mientras que en la presente sección se presentan las diferencias intrínsecas entre ambos eventos. De hecho, algunas de las características que distinguen a un evento del otro ya fueron señaladas. Así, tenemos que mientras que la depleción-transformación ocurre en forma masiva en unos cuantos minutos y su magnitud no aumenta por más que el estímulo continúa, la liberación ocurre de manera constante y a una tasa estable durante el tiempo que se mantiene la estimulación. Otra de las di-

ferencias que caracterizan ambos procesos se refiere a su sensibilidad para ser activados, en otras palabras, a su umbral de activación. En este sentido, Grosvenor y col. (1979b) observaron que la aplicación de un estímulo inespecífico como es la inhalación de éter, el cual no es capaz de inducir la depleción de la PRL hipofisiaria, provoca en la rata un incremento pequeño y transitorio en el nivel circulante de PRL. Por el contrario, la aplicación de este estímulo a ratas cuya PRL hipofisiaria ha sido previamente depletada por un período breve de succión (10 min), induce una liberación de PRL comparable a la producida por el estímulo de la succión. Estos resultados se interpretaron en el sentido de que el umbral de la depleción-transformación de la hormona es superior al umbral de activación de la liberación de la misma (Grosvenor y col., 1981). Asimismo, estos resultados resaltan la significancia que como paso limitante para la liberación tiene la transformación de la hormona. En otras palabras, la liberación de la PRL sólo parece ocurrir cuando la hormona en el interior de la glándula ha sufrido la transformación. Más aún, estos estudios mostraron que la hormona una vez transformada permanece disponible para ser liberada durante varias horas.

Possible Mechanisms Involved in the Transformation of the PRL.

Como hemos visto, se desconocen tanto el mecanismo a través del cual la hormona es transformada, como la

naturaleza del cambio sufrido por la hormona en dicha transformación. De hecho, la existencia de esta transformación se ha inferido en base a la relación cuantitativa y funcional entre la depleción de la PRL en el tejido y la liberación de ésta hacia el exterior. La hormona transformada no es detectada con bioensayo, con radioinmunoensayo, ni con electroforesis en acrilamida. Esto podría sugerir que la hormona, por efecto de la transformación pierde sus actividades biológica e inmunológica así como que se altera su detección química. Otra forma alternativa de explicar la depleción general, sería en el sentido de que el cambio sufrido por la PRL durante la transformación interfiere de alguna forma en común con todos los métodos de cuantificación empleados, impidiendo así su detección.

Cambio en la Solubilidad de la PRL Durante la Transformación de la Misma.

Dado que los métodos que registran la depleción de la PRL tienen en común el empleo de condiciones de extracción consideradas moderadas, nosotros analizamos la depleción bajo condiciones de extracción más rigurosas. Para ello comparamos el efecto de un período breve de succión, sobre la concentración de PRL hipofisiaria, medida ésta por electroforesis en el gel de poliacrilamida, bajo dos condiciones diferentes de extracción. La extracción en un amortiguador de tris-HCl (0.13M) a pH 7.2 que es la base del método de electroforesis descrito por Nicoll y col., (1969)

con el que se detecta la depleción de manera reproducible, se comparó con la extracción en un amortiguador de carbonatos (0.05M) a pH 10. Además, y con el propósito de analizar los cambios sufridos no sólo por la PRL en su totalidad sino en particular por la hormona madura, las ratas recibieron una inyección de un aminoácido marcado isotópicamente, 8 horas antes del sacrificio. En concreto, 29 ratas Wistar en los días 13-14 post-partum, se separaron de sus crías por un período de 8 horas y se les administró una dosis de leucina tritiada (3 μ Ci/g p.c. I.V, NET-135H, 40-60 Ci/mmol New England Nuclear), al momento de la separación. La mitad de los animales fueron succionados por un período de 15 minutos inmediatamente antes del sacrificio, mientras que la otra mitad se sacrificó sin la succión previa. En todos los animales la adenohipófisis fué inmediatamente extraída y seccionada en dos partes iguales, destinándose una semihipófisis a la extracción en amortiguador de tris-HCl (0.13M) a pH 7.2 (0.1 ml/mg de tejido) y la otra a la extracción en amortiguador de carbonatos (0.05M) a pH 10 (0.1 ml/mg de tejido). Todas las muestras se sometieron a electroforesis de acrilamida de acuerdo con el método de Nicoll y col., (1969), método que se utilizó para cuantificar la concentración de PRL en cada muestra por densitometría. Una vez registrada la concentración de PRL en la banda correspondiente de cada gel, ésta fué cortada, eluida en 1.0 ml de agua oxigenada al 30% a 50°C (Tishler y Epstein, 1968) y la concentración de PRL tritiada cuantificada por espectrometría

de centelleo líquido.

Los resultados de este experimento se ilustran en la figura 1, en la cual puede apreciarse que mediante el uso de la extracción de la PRL en amortiguador de tris a pH 7.2 se observa una depleción de aproximadamente 40% en la concentración total de la hormona (barras blancas), así como de la PRL tritiada (barras achuradas), por efecto de la succión.

En contraste con esto, cuando en las semihipófisis contralaterales la extracción se llevó a cabo en amortiguador de carbonatos a pH 10, las concentraciones de PRL total así como de PRL tritiada no sufrieron ningún cambio por la aplicación del estímulo de la succión. Recientemente hemos determinado si la detección de la depleción depende de la composición iónica del amortiguador o del pH, extrayendo a la PRL en amortiguador de tris tanto a pH neutro como a pH 9.2 y en amortiguador de carbonatos a pH 10 y a pH 7.4. Encontramos que la detección de la depleción no depende del pH sino de la composición del amortiguador vgr., se detecta en tris y no en carbonatos. Este resultado demuestra que la hormona depletada por efecto de la succión se encuentra aún en el tejido. Asimismo, sugiere que ha sufrido una transformación tal, que mediante el empleo de condiciones moderadas (amortiguador de tris-HCl), ésta hormona no es extraída y por consiguiente no es detectada. Por el contrario, cuando las condiciones empleadas fueron más severas (amortiguador de carbonatos), la hormona fué extraída y detectada.

Todo esto permite sugerir que durante la primera fase de la liberación de la PRL por efecto de la succión, la

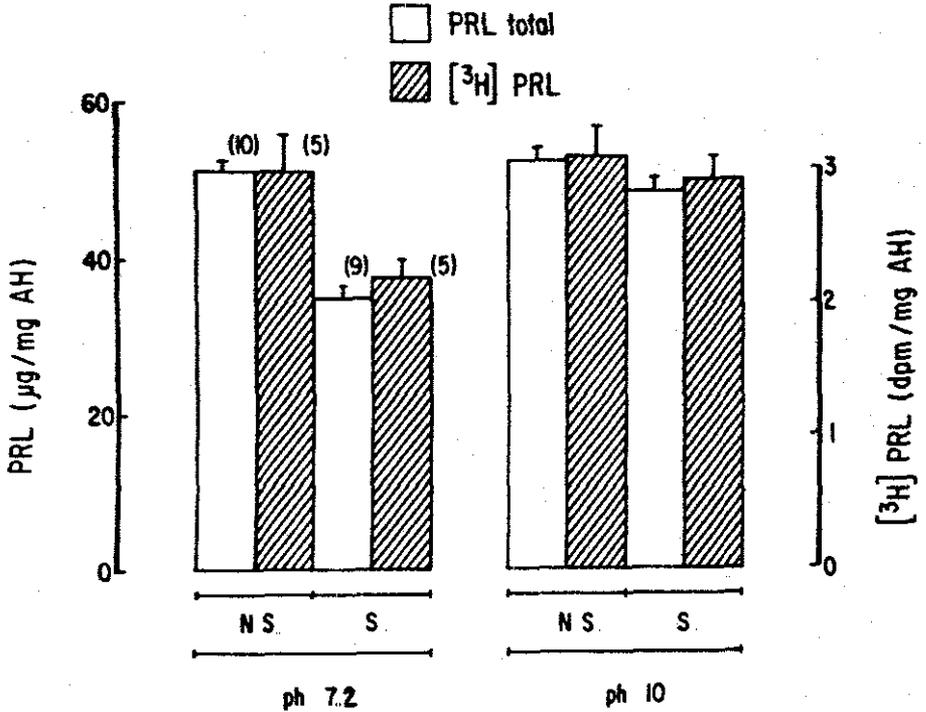


Fig. 1. Efecto de dos distintos métodos de extracción sobre la depleción del contenido hipofisiario de PRL y de ^{3}H PRL inducida por la succión en la rata lactante. Todos los animales recibieron una administración i.v. de ^{3}H leucina 8 horas antes del sacrificio, permaneciendo separados de sus crías por ese período. La mitad de los animales fueron succionados por sus crías durante 15 min previos al sacrificio (S.), mientras la otra mitad no fueron succionados (N.S.). Cada hipófisis fué biseccionada, extrayéndose la hormona de una semihipófisis en amortiguador de tris-HCL (0.13M) a pH 7.2 y la otra semihipófisis en amortiguador de carbonatos (0.05M) a pH 10. Nótese la depleción de la PRL y de la ^{3}H -PRL por efecto de la succión bajo extracción en tris y la ausencia de la misma bajo extracción en carbonatos. Cada barra representa el promedio \pm E.E. de los animales señalados entre paréntesis. (Mena, Martínez-Escalera, Clapp, Aguayo, Forray y Gosvenor, 1982).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

hormona es convertida de una forma relativamente soluble, a otra forma menos soluble, que no es extraíble en amortiguador de tris, la cual representa la forma liberable de la hormona.

Sin embargo, la naturaleza íntima de la transformación de la PRL, que le confiere una disminución en el grado de solubilidad, es aún desconocida. Se ha reportado previamente, en base a observaciones morfológicas, que la matriz del gránulo de PRL presenta una estructura estable (Vila Porcile y Oliver, 1980). Esta misma conclusión partió de un estudio de tipo bioquímico en el que se analizó la solubilización de gránulos separados de su membrana limitante, incubados bajo diversas condiciones de temperatura, pH y composición del medio (Giannattasio y col., 1975). Entre los resultados de este trabajo, se encontró que la disolución de la matriz de PRL aumenta en relación directa con el pH y la temperatura, y que es favorecida por la presencia de ciertos iones como el bicarbonato. Además los autores reportaron que la insolubilidad del gránulo se encuentra directamente relacionada al tiempo transcurrido a partir de la síntesis de la PRL, es decir, al estado de madurez de la misma (Zanini y col., 1980). Otro estudio del mismo grupo de trabajo, sugiere que la insolubilidad granular puede ser debida a la interacción de la PRL con hidratos de carbono macromoleculares (Giannattasio y col., 1980). Recientemente, Merchant y Mená (1982) han mostrado evidencias de una interacción de glicoconjugados de origen extracelular con los

gránulos de PRL durante la exocitosis. Una interacción de este tipo podría afectar la movilidad electroforética de la PRL.

La PRL de rata posee dos puentes disulfuro que participan en el establecimiento de la estructura terciaria de la molécula. La reducción parcial o total de éstos, acarrea cambios importantes en la actividad y en la detectabilidad de la PRL (resultados no publicados)*. En bovinos, se ha sugerido que la PRL es almacenada en una estructura supramolecular formada por varias moléculas de hormona unidas por puentes disulfuro y que la regulación de la liberación es mediada por glutatión y zinc (Lorenson y Jacobs, 1982; Lorenson y col., 1983). Si bien en la rata no parece existir esta estructura supramolecular, recientemente hemos encontrado que el glutatión reducido facilita la depleción in vitro de la PRL mientras que el zinc la inhibe (resultados no publicados). En asociación con esto, se sabe que el tris es capaz de quelar iones como el calcio (Ca^{++}) y el zinc (Zn^{++}) mientras que los carbonatos facilitan el intercambio tiol-disulfuro. Estos resultados sugieren de manera preliminar que la reducción-oxidación de la PRL y/o algunos otros componentes intracelulares podrían estar participando directamente en la pérdida de detectabilidad que sufre la PRL durante la depleción-transformación.

* La composición iónica del medio (fosfatos, boratos, carbonatos) determina cambios importantes en la conformación de la PRL.

Transformación de la PRL en Condiciones In Vitro.

El uso del marcaje radioactivo de una población particular de moléculas de PRL fué de suma utilidad en el experimento antes descrito, para precisar que la transformación ocurre en la hormona que ha alcanzado un grado determinado de madurez. Sin embargo, en condiciones in vivo no es posible establecer comparaciones entre la hormona que sufre la depleción-transformación y aquella que es liberada a la circulación, principalmente porque la dilución de ésta última en el torrente sanguíneo impide su medición. Este tipo de comparaciones, sin embargo, es muy importante realizarlas, puesto que es una manera de analizar en forma directa la procedencia de la hormona liberada, es decir, si la hormona que es liberada proviene o no de aquella previamente transformada.

Para resolver el impedimento de la medición de la hormona liberada con marcaje isotópico, analizamos el comportamiento de la hipófisis en condiciones in vitro. El empleo de este método permite medir directamente la hormona liberada, tanto la total como la marcada, y compararla con los cambios en la concentración hipofisiaria de la hormona usando el mismo método de cuantificación (electroforesis en poliacrilamida).

Transformación y Liberación de PRL Total y PRL Marcada Isotópicamente, en Hipófisis Incubadas In Vitro.

Al igual que en el experimento anterior, se utilizaron ratas Wistar lactantes entre los días 7 y 14 post-partum. Todos los animales recibieron una inyección de leucina tritiada ($3 \mu\text{Ci/g p.c. I.V.}$) al momento de separárseles de sus crías. Al cabo de 8 horas, la mitad de los animales fueron sacrificados, grupo al que denominaré en lo sucesivo "no succionado" ó "NS", mientras que la otra mitad de los animales fueron previamente succionados por sus crías durante 15 minutos e inmediatamente sacrificados, grupo al que denominaré "succionado" ó "S". Inmediatamente después del sacrificio, las adenohipófisis fueron extraídas y seccionadas en dos partes iguales, de las cuales una semihipófisis de cada animal fué congelada para determinar la concentración inicial tanto de PRL total, así como de PRL marcada isotópicamente. La restante semihipófisis de cada rata fue incubada inmediatamente en $300 \mu\text{l}$ de medio 199, a 37°C en un agitador metabólico a 125 rpm bajo una atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2 . Las incubaciones tuvieron duraciones de 30, 60, 90, 120 y 240 minutos, cambiándose el medio de incubación por medio fresco en los tiempos antes señalados en aquellas incubaciones cuya duración lo permitió. La de terminación de la PRL se llevó a cabo por electroforesis en poliacrilamida y la cuantificación por densitometría (Nicolli y col., 1969). La cuantificación de la PRL tritiada

se llevó a cabo por espectrometría de centelleo líquido. Al igual que en el experimento in vivo, la extracción de la hormona del tejido se realizó tanto en amortiguador de tris HCl (0.13M) a pH 7.2 como en el amortiguador de carbonatos (0.05M) a pH 10.

Los resultados de este experimento se ilustran en las figuras 2, 3 y 4. En la figura 2, se representa la cuantificación de la PRL en el tejido, extraída en amortiguador de tris (0.13M) a pH 7.2 (gráfica izquierda), extraída en amortiguador de carbonatos (0.05M) a pH 10 (gráfica central) y también representa la secreción al medio de incubación expresada en tasa de secreción (ng/min/mg de adenohipofisis, gráfica derecha). La concentración de PRL en las semihipofisis extraídas en tris a pH 7.2 sufrió una depleción de aproximadamente 40% por efecto de la succión (círculo vs triángulo al tiempo 0). Cuando las mitades contralaterales de estas mismas hipofisis fueron incubadas, se observaron ciertos cambios opuestos en la concentración de PRL hipofisiaria, de acuerdo al estado de la hipofisis en cuestión. La concentración de PRL en las glándulas de animales no succionados sufrió una depleción de aproximadamente 40% a los 30 minutos de la incubación con una repleción a los 60 minutos y una segunda depleción a los 90 minutos, y a partir de este punto disminuyó en forma muy gradual hasta los 240 minutos de la incubación. La concentración de PRL en las hipofisis de los animales succionados, la cual ya había sido depletada in vivo, sufrió una repleción total a los

ADENOHIPOFISIS

MEDIO

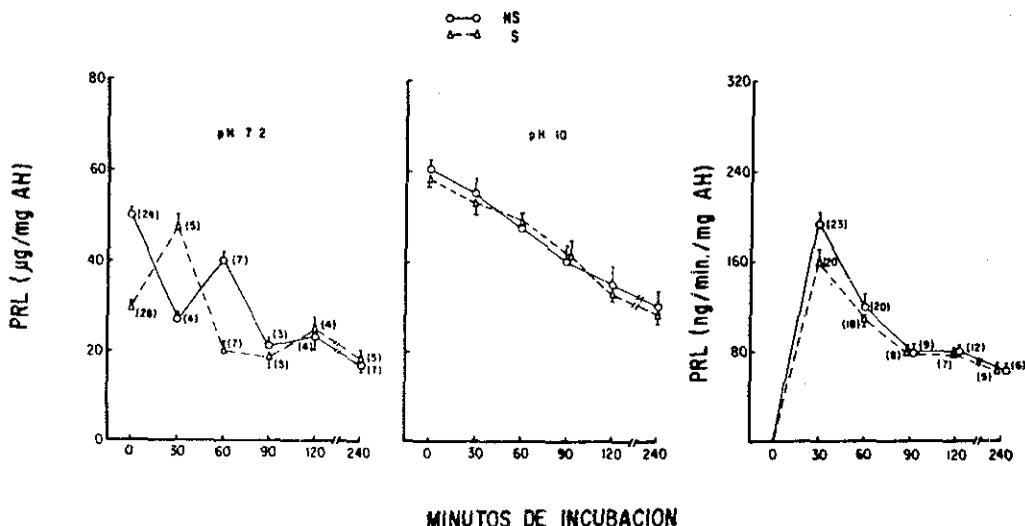


Fig. 2. Efecto de la incubación *in vitro* de semihipófisis de ratas lactantes separadas de sus crías durante las 8 horas previas a la incubación (N.S.) o bien succionadas 15 min inmediatamente antes del sacrificio (S.), sobre la concentración hipofisiaria de PRL detectada bajo distintos procedimientos de extracción, así como sobre la liberación de la hormona al medio de incubación. La hormona se cuantificó por electroforesis en poliacrilamida y densitometría, tanto en el medio de incubación (gráfica derecha) como en la hipófisis extraída ya sea en amortiguador de tris HCl a pH 7.2 (gráfica izquierda) como en amortiguador de carbonatos a pH 10 (gráfica central). Nótese las oscilaciones en la concentración de PRL en las semihipófisis extraídas en tris, en contraste con la disminución constante en aquellas extraídas en carbonatos. Cada punto representa el promedio + E.E. y los números entre paréntesis el número de animales. (Mena, Martínez-Escalera, Clapp, Aguayo, Forray y Grosvenor, 1982).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

30 minutos, seguida de una segunda depleción a los 60 minutos, y a partir de este momento disminuyó gradualmente hasta el final de la incubación. En contraste a las oscilaciones desfasadas 30 min que sufre el contenido hipofisiario de PRL cuando la extracción se realiza en amortiguador de tris (pH 7.2), cuando la extracción se realizó en el amortiguador de carbonatos (pH 10) la concentración de PRL en el tejido no sólo no cambió en forma brusca por efecto de la succión, sino que mostró una disminución gradual a todo lo largo de la incubación. Esta disminución guardó una relación directa con la cantidad de hormona que se fué acumulando en el medio de incubación.

Los resultados obtenidos midiendo a la PRL marcada isotópicamente fueron semejantes a los recién descritos (Fig. 3). Estos resultados sugieren en primer término, que la depleción de PRL in vitro es análoga a la que ocurre in vivo por efecto de la succión, y que ambas se deben a un cambio de solubilidad de la PRL. Así, una vez depletada, la PRL reduce su estado de solubilidad y por consiguiente no es extraíble ni detectable en un amortiguador de tris. Este cambio de solubilidad de la PRL se invierte en la repleción, por lo cual la hormona vuelve a ser detectada. Por el contrario, bajo otra condición de extracción (amortiguador de carbonatos, pH 10), la hormona es disuelta y detectable en el tejido, por lo que no se observa la depleción, sino una pérdida gradual de prolactina en el tejido que corresponde cuantitativamente en forma íntegra con la hormona liberada al medio de incubación.

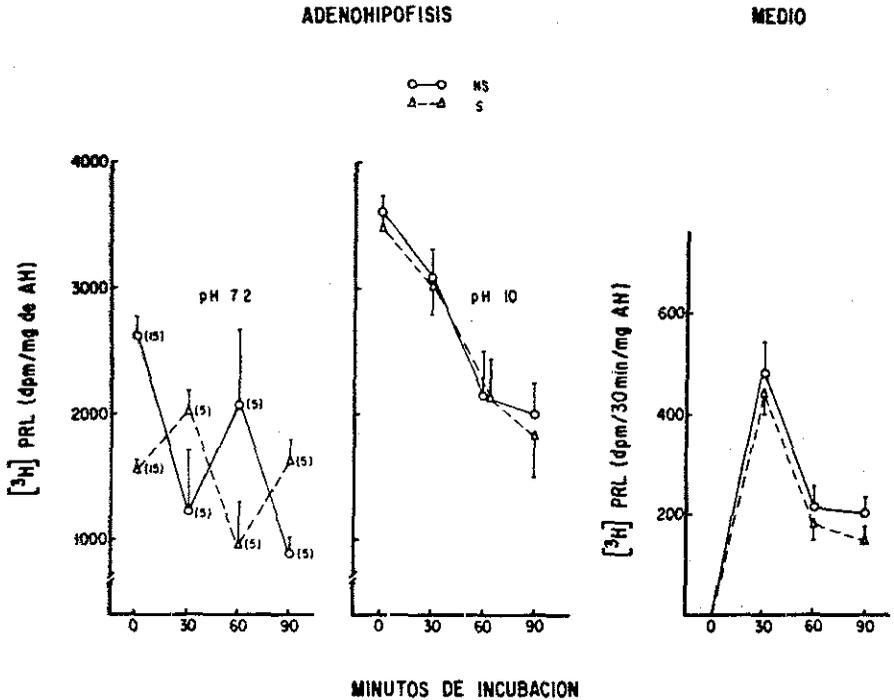


Fig. 3. Efecto de la incubación in vitro de semihipófisis de ratas lactantes separadas de sus crías durante las 8 horas previas a la incubación (N.S.), o bien succionadas 15 min inmediatamente antes del sacrificio (S.), sobre la concentración hipofisiaria de PRL tritiada (^3H PRL), detectada bajo dos distintos procedimientos de extracción, así como sobre la liberación de la hormona marcada al medio de incubación (gráfica derecha). La marca (^3H) leucina, 3 μCi /g p.c. I.V.) se administró 8 horas antes del sacrificio. La cuantificación se realizó por espectrometría de centelleo líquido de la banda de PRL determinada por electroforesis en poliacrilamida. La extracción de la hormona en una semihipófisis de cada rata se realizó en amortiguador de tris-HCl a pH 7.2 (gráfica izquierda) y en la contraparte en amortiguador de carbonatos a pH 10 (gráfica central). Nóten se las oscilaciones en la concentración de (^3H) PRL en las semihipófisis extraídas en tris, en contraste con la disminución constante en aquellas extraídas en carbonatos. Cada punto representa el promedio \pm E.E. y los números entre paréntesis el número de animales (Mena, Martínez-Escalera, Clapp, Aguayo, Forray y Grosvenor, 1982).

Con el objeto de precisar el posible origen de la hormona liberada, analizamos la actividad específica de la PRL tanto en el tejido como en el medio de incubación. La expresión actividad específica se refiere a la proporción de hormona marcada en relación al total de la hormona detectable. Como se puede observar en la figura 4, la actividad específica de la hormona liberada al medio de incubación guarda un estrecho paralelismo con la actividad específica de la hormona extraída del tejido en carbonatos a pH 10. Además, éstas actividades específicas no fueron diferentes a aquellas obtenidas en el tejido extraído en tris a pH 7.2 en los tiempos en que la hormona mostró ausencia de depleción o una clara repleción, vgr: a los 60 minutos en el caso del grupo N.S. y a los 30 y 90 minutos en el grupo S. Por el contrario, la actividad específica de la hormona liberada al medio fué claramente mayor a la de la PRL detectada en el tejido extraído en tris a pH 7.2 en los tiempos en que la PRL se encuentra depletada; vgr: a los 30 y 90 minutos en el grupo NS. El hecho de que la actividad específica de la PRL liberada al medio de incubación sea mayor que la actividad específica en las hipófisis que han sufrido depleción de PRL sólo cuando la extracción empleada preservó dicha depleción pero no cuando la extracción revirtió a ésta, sugiere que en paralelo con la depleción del nivel de PRL en la hipófisis disminuye la actividad específica de la hormona detectable, o lo que es lo mismo, que la PRL que es transformada durante la depleción posee una actividad espe-

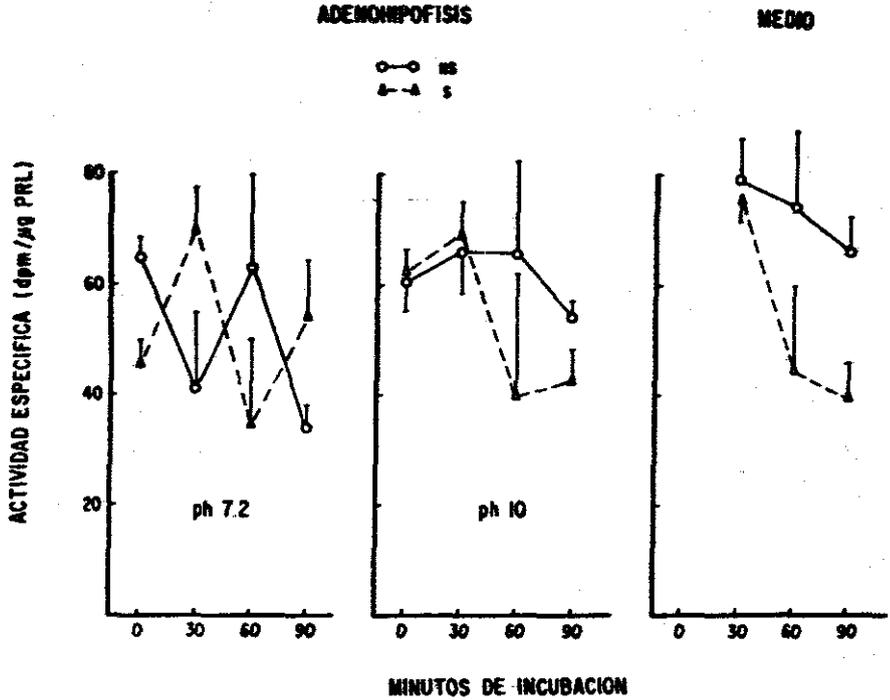


Fig. 4. Efecto de la incubación *in vitro* de semihipófisis de ratas lactantes separadas de sus crías durante las 8 horas previas a la incubación (N.S.), o bien succionadas 15 min inmediatamente antes del sacrificio (S.), inyectadas con leucina tritiada (3 μ Ci/g p.c. I.V.) al momento de la separación de las crías, sobre la actividad específica tanto de la PRL liberada al medio de incubación (gráfica derecha), como de la PRL extraída del tejido ya sea en amortiguador de tris-HCl (0.13M) a pH 7.2 (gráfica izquierda) o bien en amortiguador de carbonatos (0.05M) a pH 10 (gráfica central). La actividad específica es la expresión del cociente de la PRL marcada sobre el total de la hormona. Nótese las semejanzas de los valores de la PRL liberada con aquellos de la PRL extraída del tejido con carbonatos. Cada punto representa el promedio + E.E. (Mena, Martínez-Escalera, Clapp, Aguayo, Forray y Grosvenor, 1982).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

cífica alta. Dado que la alta actividad específica de la PRL liberada al medio se correlaciona con la actividad específica inferida de la PRL transformada y difiere de la de PRL detectable en amortiguador de tris coincidente con la depleción, estos resultados sugieren fuertemente que la hormona liberada proviene precisamente de aquella que se encuentra transformada. Las oscilaciones observadas in vitro en el contenido tisular de la hormona, que no se observaron in vivo, podrían ser consecuencia de la ausencia del control hipotalámico inhibitor. Recientemente observamos que la adición de dopamina al medio de incubación bloquea tanto la depleción de la PRL de las hipófisis de animales no succionados, como la repleción de la hormona en hipófisis de animales succionados, además de reducir marcadamente en ambos casos la liberación de la hormona al medio de incubación.

REGULACION DE LA SECRECION DE PROLACTINA.

Diversos Niveles de Regulación.

Al igual que lo que ocurre con las demás hormonas hipofisiarias, la secreción de PRL se encuentra influida por factores de origen hipotalámico, los cuales tienen acceso a la glándula a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario. Sin embargo, la hipófisis y en particular los lactotropos, no representan órganos blanco que responden pasivamente a las influencias hipotalámicas. Por el contra-

cífica alta. Dado que la alta actividad específica de la PRL liberada al medio se correlaciona con la actividad específica inferida de la PRL transformada y difiere de la de PRL detectable en amortiguador de tris coincidente con la depleción, estos resultados sugieren fuertemente que la hormona liberada proviene precisamente de aquella que se encuentra transformada. Las oscilaciones observadas in vitro en el contenido tisular de la hormona, que no se observaron in vivo, podrían ser consecuencia de la ausencia del control hipotalámico inhibitor. Recientemente observamos que la adición de dopamina al medio de incubación bloquea tanto la depleción de la PRL de las hipófisis de animales no succionados, como la repleción de la hormona en hipófisis de animales succionados, además de reducir marcadamente en ambos casos la liberación de la hormona al medio de incubación.

REGULACION DE LA SECRECION DE PROLACTINA.

Diversos Niveles de Regulación.

Al igual que lo que ocurre con las demás hormonas hipofisiarias, la secreción de PRL se encuentra influida por factores de origen hipotalámico, los cuales tienen acceso a la glándula a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario. Sin embargo, la hipófisis y en particular los lactotropos, no representan órganos blanco que responden pasivamente a las influencias hipotalámicas. Por el contra-

rio, cada vez resulta más evidente el que la respuesta de la hipófisis cambia drásticamente de acuerdo con el estado fisiológico en que se encuentra. Por otro lado, recientemente se han identificado efectos específicos de factores hipotalámicos sobre los eventos celulares que conforman el proceso de secreción de la PRL, los cuales pueden alterar eventos subsecuentes dentro de la secuencia del proceso. Por todo esto, la regulación de la secreción de la PRL durante la lactancia parece ser el resultado de una fina interacción hipotálamo-hipofisiaria donde la respuesta del sistema depende tanto del control aferente como de factores locales en la propia glándula.

Regulación Hipotalámica del Proceso de Secreción de PRL.

La regulación que el hipotálamo ejerce sobre la secreción de PRL dista mucho de haber sido completamente esclarecida. En parte el hipotálamo ejerce sobre los lactotropos una influencia de tipo inhibitoria, mediada por uno o más factores inhibidores de la secreción de la PRL (PIF), entre los cuales se sugiere a la dopamina. La otra parte implicada en esta regulación es de tipo facilitador, por lo que se ha postulado a posibles factores facilitadores de la liberación de PRL (PRF) así como a la TRH (hormona hipotalámica liberadora de la Tirotrófina) como responsable de ésta.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Factores Hipotalámicos Inhibidores de la Secreción de PRL.

La influencia directa de factores hipotalámicos sobre la secreción de PRL se encuentra ampliamente documentada. Originalmente se pensó que ésta influencia era exclusiva o predominantemente inhibidora. Esta idea surgió de experimentos en los cuales, tanto trasplantes ectópicos de adenohipófisis (Everett, 1954), deaferentación hipotálamo-hipofisiaria (Chen y col., 1970; Bishop y col., 1971; MacLeod y Lehmyer, 1972), como la incubación in vitro de tejido adenohipofisiario (Pasteels, 1961; 1962; Talwalkery col., 1963) resultaron en todos los casos en una secreción importante de PRL. Todos estos trabajos sugieren la posible existencia de un factor producido por el hipotálamo con efecto inhibidor sobre la liberación de PRL.

Por otro lado, una serie de estudios farmacológicos han mostrado que la dopamina (DA) ejerce un efecto inhibidor sobre la secreción de PRL (ver: MacLeod y Lehmyer, 1972; MacLeod, 1976) actuando directamente sobre los lactotropos (Birge y col., 1970; Koch y col., 1970; Shaar y Clemens, 1974). Asociado a ésto, se ha descrito la existencia de neuronas tubero-infundibulares dopaminérgicas con terminaciones adyacentes a los vasos portales a nivel de la eminencia media hipotalámica (Hökfelt, 1967). Recientemente se ha detectado dopamina en la sangre portal (Ben-Jonathan y col., 1977; Gibbs y Neill, 1978; Plotsky y col., 1978) así como cambios en los niveles de ésta en relación al esta

do fisiológico y en respuesta a la estimulación periférica (Neill, 1980; de Greef y col., 1981).

Se han realizado algunos intentos para caracterizar compuestos peptídicos, así como de otra naturaleza, como factores inhibidores de la secreción de PRL. Esto es debido principalmente a que la dopamina por sí misma, no alcanza a explicar todo el efecto inhibitorio presente en extractos hipotalámicos (Grosvenor y col., 1980), así como la persistencia del efecto en extractos hipotalámicos libres de DA.

Factores Hipotalámicos Facilitadores de la Secreción de PRL.

La primera evidencia de este tipo se encontró en hipófisis de aves, incubadas in vitro, en las cuales el efecto facilitador de la secreción de PRL en extractos hipotalámicos predomina sobre el efecto inhibitorio (Nicoll y col., 1970). En los mamíferos, la hipótesis de la existencia de un factor facilitador de la secreción de PRL (PRF) surgió en experimentos de incubación in vitro de hipófisis, en los cuales extractos hipotalámicos causaron un incremento tardío en la secreción de PRL, subsecuente a la inhibición inicial ya conocida (Nicoll y col., 1970).

El efecto facilitador de la secreción de PRL que posee la hormona hipotalámica estimulante de la tirotrófina (TRH) se describió inicialmente en células tumorales adenohipofisiarias en cultivo (Tashjian y col., 1971). Posterior



mente éste efecto se confirmó tanto sobre células normales en cultivo, como sobre hipófisis también en cultivo. Asimismo, se ha descrito un incremento en la concentración de TRH en sangre portal por efecto de la estimulación periférica de un nervio mamario (De Greef y Visser, 1981). Se han reportado también factores distintos a la TRH con efecto facilitador de la secreción de PRL (Valverde-R. y col., 1972).

Regulación Hipotalámica del Proceso Multifásico de Secreción de PRL.

La depleción de PRL hipofisiaria inducida por la succión es bloqueado tanto por la administración de extractos hipotalámicos (Grosvenor, 1965; Grosvenor y col., 1965; Dhariwal y col., 1968) como por la administración del agonista dopaminérgico 2 Br- α -ergocriptina (Flückiger y Kovacs, 1974; Häusler y col., 1978). Asimismo, la magnitud de la liberación de la hormona hacia la circulación también evocada por la succión se deprimió importantemente por la administración de los extractos hipotalámicos (Kuhn y col., 1974; Milmore y Reece, 1975), así como por la administración del precursor de la dopamina, L-dopa (Prilusky y Deis, 1975; Chen y col., 1974). De acuerdo con todos estos datos, el efecto de PIF o bien de la dopamina, podrían darse tanto a nivel de la depleción de la hormona, como a nivel de la liberación de ésta. La alternativa a esta situación era que el efecto de los factores inhibidores sólo ocurriera a ni-

vel de la depleción de la hormona.

Para analizar estas dos posibilidades, Grosvenor, Mena y Whitworth (1980) probaron el efecto de la succión, por una parte sobre la depleción de la hormona tanto en animales tratados con dopamina, extractos de eminencia media hipotalámica o bien con 2-Br- α -ergocriptina, y por otra parte, sobre la liberación de la hormona en animales tratados con extractos de eminencia media o 2-Br- α -ergocriptina, ya sea antes o después de haber inducido la depleción de la hormona hipofisiaria por la succión. El pretratamiento de las ratas con 625 ng de dopamina, el extracto equivalente a una eminencia media, o bien 0.5 mg de 2-Br- α -ergocriptina, bloqueó la depleción de la PRL hipofisiaria por efecto de la succión de las crías, así como también redujo significativamente la liberación de la hormona hacia la circulación. Contrariamente, cuando la 2-Br- α -ergocriptina o bien el extracto de eminencia media fueron administrados a animales que previamente habían sufrido la depleción-transformación de la PRL por efecto de un episodio de 10 minutos de succión, la liberación evocada por una nueva succión fué equivalente a aquella ocurrida en los animales testigo.

El hecho de que tanto el PIF como el agonista dopaminérgico no inhibiesen la liberación de la PRL en aquellos animales cuya hormona se encontraba ya depletada, sugirió a los autores que el efecto inhibitor de la secreción de PRL se ejerce únicamente a nivel de la depleción-transformación de la hormona.

La contraparte de éste estudio, consistió en analizar los efectos del factor facilitador de la liberación de PRL (PRF), así como de la TRH, tanto sobre la depleción de la hormona como sobre la liberación misma (Grosvenor y Mena, 1980). En este caso, la administración de 1.25 µg de TRH ó bien del equivalente a 2.5 extractos de eminencia media pretratada para eliminar la TRH, no mostraron ningún efecto sobre el nivel de PRL hipofisiaria, mientras que su efecto sobre la liberación de PRL al plasma fué prácticamente inexistente. Por el contrario, después de que las ratas fueron sometidas a 10 minutos de succión, lo que provoca la depleción de la PRL hipofisiaria, la administración de cantidades tan bajas de TRH como 50, 10 o incluso 2 ng, así como el equivalente a 1, 0.5 y 0.2 eminencias medias indujeron una liberación comparable a la evocada por la propia succión. Estos resultados confirmaron datos de otros autores que habían obtenido una liberación muy baja de PRL por efecto de la TRH (Blake, 1974) ó bien no habían encontrado ningún efecto (Burnet y Wakerley, 1976).

Los resultados de estos dos trabajos en conjunto, sugieren que la regulación hipotalámica se ejerce sobre varios de los eventos que constituyen el proceso de secreción de PRL. Por una parte la inhibición ejercida por el PIF y la dopamina afecta principalmente el evento de la depleción-transformación mientras que la estimulación representada por el PRF y la TRH se ejerce exclusivamente sobre la liberación de la hormona.

Esta hipótesis ha recibido recientemente un fuerte apoyo tanto en un sistema de periperfusión de hipófisis (Fagin y Neill, 1981), como in vivo (de Greef y Visser, 1981). En este segundo estudio, se trataron ratas lactantes con α -metil-p-tirosina (AMPT), un inhibidor competitivo de la síntesis de dopamina, a la vez que se infundieron exogenamente con dopamina a dosis tales que el aporte de esta catecolamina a la hipófisis ocurriese en una proporción semejante al aporte normal en el animal intacto. En esta situación, la administración exógena de TRH no produjo más que un insignificante incremento en el nivel circulante de PRL, comparable al producido en el animal normal.

Sin embargo, la misma administración de TRH pero precedida de una disminución del 50% en la infusión de dopamina durante 15 minutos, provocó un marcado incremento en el nivel circulante de PRL.

Así aparentemente, la estimulación neurogénica de la succión induce una disminución pasajera en el nivel de DA en sangre portal, nivel que posteriormente retorna a su valor normal, o incluso a un valor superior (de Greef y col., 1981). Esta disminución en el aporte de dopamina a la hipófisis, de acuerdo con Grosvenor y col. (1980), induce la transformación de la PRL de un estado no liberable a otro liberable. Simultáneamente y también por efecto de la succión, se incrementa la secreción hipotálica de la TRH (de Greef y Visser, 1981) que tiene como función la estimulación de la liberación de PRL a partir de aquella hormona que se encuentra transformada en la hipófisis (Grosvenor y Mena, 1980).

Factores Hipofisiarios que Intervienen en la Regulación del
Proceso de Secreción de PRL.

Como ya vimos, la regulación hipotalámica de la secreción de la PRL no es un proceso sencillo, sino por el contrario presenta una gran complejidad. Es quizás debido a ésta complejidad, que los estudios realizados en éste sentido han conferido poca atención a factores extrahipotalámicos que en primera instancia pudiesen parecer o bien desligados, o por el contrario, que tendiesen a complicar aún más el problema. Por ésta razón, en éstos estudios a que hago mención, la hipófisis se ha considerado prácticamente como una caja negra sobre la cual se ejerce una regulación sobrepuesta que controla el sistema. En consideraciones de este tipo, la salida del sistema se explica a través de la interacción de las entradas, despreciando cualquier procesamiento que sufra la señal dentro de ésta caja negra.

En contra de ésta postura, existen ciertos datos que sugieren la participación de factores locales en la determinación de la respuesta del sistema, de tal forma que un mismo estímulo evocase diversas respuestas de acuerdo al estado fisiológico en que se encuentre dicho sistema.

Así, la cantidad de hormona que es susceptible de ser depletada por efecto de la succión guarda una relación directa con el tiempo transcurrido sin succión, cuando éste se encuentra entre 2 y 12 horas (Grosvenor y Mena, 1971; Grosvenor y col., 1979a; 1979b). Si el intervalo de tiempo



entre dos estímulos se prolonga más allá de este período, ya sea a 16 o 24 horas, entonces deja de presentarse la depleción de la PRL por efecto de la succión (Grosvenor y col., 1967). En estas condiciones de ausencia prolongada de estimulación, Smith y Farquhar (1966) reportaron por medio de un estudio morfológico la aparición de lisosomas en los lactotopos, así como la fusión de éstos con los gránulos de secreción en un proceso que bautizaron crinofagia.

Por lo que respecta a la hormona en sí, Zanini y col., (1980b) han reportado que a medida que transcurre el tiempo a partir de la síntesis ribosomal de la PRL, la estabilidad de la matriz del gránulo de PRL se incrementa. En otras palabras, un gránulo que contiene PRL de menor edad se disuelve más fácilmente que aquel cuya PRL tiene más tiempo de haber sido sintetizada.

Todos estos resultados sugerían algún tipo de relación entre el tiempo que la hormona es almacenada en la glándula y la secreción y/o degradación de la misma. Sin embargo, poco se sabía acerca de la relación temporal entre el proceso de secreción y el destino de la hormona (liberación, degradación, etc.).

Con el propósito de determinar la relación que guarda la edad de la PRL con la liberación y/o degradación de la misma, analizamos tanto in vivo como in vitro la magnitud de la depleción y de la liberación de PRL, distintos tiempos después de su síntesis.

Influencia de la Edad de la PRL en su Secretabilidad.

Con el propósito de analizar ésta relación, inyectamos varios grupos de ratas lactantes con leucina tritiada ($3 \mu\text{Ci}/\text{g p.c. I.V.}$) a diversos tiempos. La administración del aminoácido radioactivo se llevó a cabo 10 minutos, media hora, 1, 4, 8, 16 o 24 horas antes del sacrificio, con el fin de marcar poblaciones discretas de hormona que al tiempo de la medición de sus niveles bajo diferentes circunstancias, reflejasen el comportamiento de poblaciones de hormona de distintas edades, definida ésta última como el tiempo transcurrido a partir de la síntesis. Los grupos de animales que recibieron la inyección de la marca radioactiva 10 min, 30 min, 1, 4 u 8 horas antes del sacrificio, se mantuvieron sin sus crías durante las 8 horas previas a dicho sacrificio, mientras que aquellos que recibieron la marca 16 ó 24 horas antes del sacrificio, se mantuvieron sin sus crías sendas horas. Algunos de los animales de los grupos inyectados 1, 4, 8, 16 y 24 hs antes del sacrificio se sacrificaron al cabo del tiempo señalado, mientras que el resto recibió sus crías para un episodio de succión de 15 minutos inmediatamente antes del sacrificio. Ninguno de los animales de los grupos inyectados 10 y 30 minutos antes del sacrificio fueron succionados. A cada animal se le tomó una muestra de sangre al momento del sacrificio con el propósito de valorar la cantidad de leucina tritiada circulante, aún presente en ese momento. Para ésto, el plasma fué sepa

rado por centrifugación y sus proteínas precipitadas con ácido tricloroacético (10%). Una muestra de 100 μ l de cada plasma fué evaporada a sequedad para eliminar todo rastro de agua tritiada, redisuelta en 100 μ l de agua destilada y procesada para conteo por centelleo líquido. Una semihipófi- sis de cada animal se destinó a medir los niveles iniciales de PRL y de PRL tritiada, mientras que la otra semihipófi- sis fué incubada in vitro durante 4 horas. Las condiciones de incubación así como los métodos de cuantificación emplea- dos fueron idénticos a los ya descritos en la sección ante- rior.

Como se muestra en la figura 5, la marca soluble no proteica en el plasma fué 27×10^5 dpm/ml en las ratas in yectadas 10 minutos antes y 9.9×10^5 dpm/ml en aquellas in yectadas 30 minutos antes. Estos valores representan res- pectivamente el 2 y el 1 por ciento del nivel alcanzado por la marca (1100×10^5 dpm/ml) inmediatamente después de su admi- nistración, calculado a partir de la dosis administrada y del volumen de fluido extracelular (20 ml) que en la rata es de 7.8% de su peso corporal (Wang, 1959). Estos resulta- dos, en concordancia con otros estudios previos (Swearingen y Nicoll, 1972; Caro y Palade, 1964), sugieren que la incor- poración de la marca radioactiva a la síntesis de nuevas proteínas ocurre fundamentalmente durante los pocos minutos que siguen a la administración de la misma, con lo cual, es- te método permite marcar poblaciones muy discretas de la hormona.

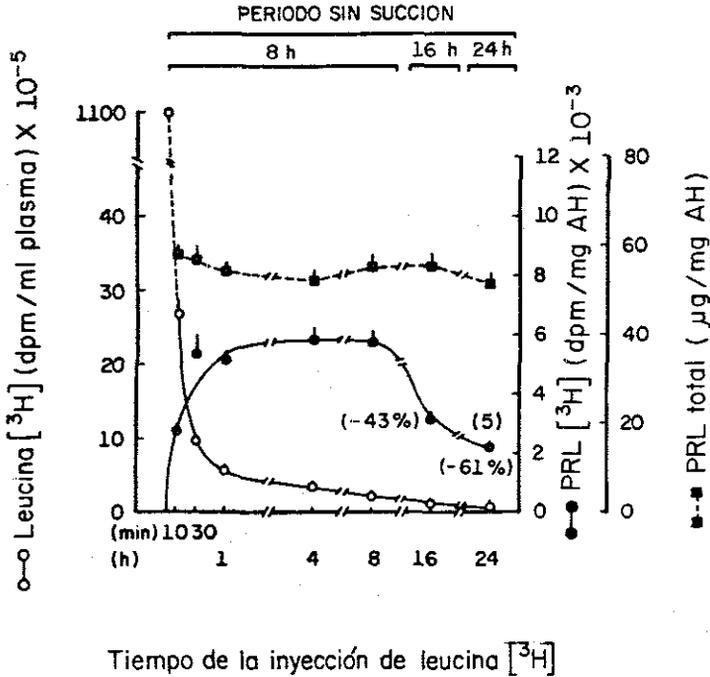


Fig. 5. Decaimiento en la concentración plasmática de leucina tritiada e incorporación de ésta a la forma de PRL tritiada, consecuente a una administración única de 3 $\mu\text{Ci/g}$ p. c. i. v. de leucina tritiada a ratas lactantes. El valor inicial de la concentración plasmática de leucina tritiada se calculó considerando un volúmen extracelular de líquido de 20 ml. Los valores subsecuentes se determinaron excluyendo las proteínas precipitables por 10% de ácido tricloroacético así como el agua por evaporación, cuantificándose la radioactividad restante por centelleo líquido (círculos blancos). La concentración de PRL tritiada 10 y 30 minutos; 1 hora, 4, 8, 16 y 24 horas después de la administración del isótopo unido a la leucina, se determinó por electroforesis en poliacrilamida y centelleo líquido (círculos negros). Los niveles hipofisarios de PRL en estos animales se ilustran en la curva con cuadrados llenos. Cada punto representa el promedio + E.E. de los valores de 5 animales. (Mena, Martínez-Escalera, Clapp y Gosvenor, 1984).

La sugerencia de que la duración efectiva del pulso sólo alcanza unos pocos minutos fué también sustentada por el hecho de que el nivel hipofisiario de PRL tritiada alcanzó su máximo 30 minutos después de la administración del isótopo, y se sostuvo a ese nivel por lo menos durante 8 horas más.

Sin embargo, dado que 10 minutos después de la administración del aminoácido radioactivo, el nivel de PRL tritiada en la hipófisis sólo alcanzó el 50% del valor máximo, esto podría sugerir que en ese tiempo no toda la marca que ha sido incorporada a la PRL se encuentra ya en la forma de PRL extraíble y cuantificable por electroforesis (Zanini, Giannattasio y Meldolesi, 1974), sino que podría encontrarse una gran proporción aún en organelos subcelulares resistentes a la solubilización y sólo una parte en gránulos de secreción. Por otra parte, 16 h después de la administración del aminoácido marcado, los animales mantenidos sin succión por igual período mostraron una drástica disminución en los niveles de PRL tritiada, equivalente al 45% del nivel observado entre 30 minutos y 8 horas. Esta reducción fué aún mayor a las 24 horas (61%). Dicha reducción no parece ser debida a una extracción incompleta de la hormona puesto que en todos los casos la extracción se llevó a cabo a pH 10. Por lo tanto, la disminución significativa de PRL tritiada en las hipófisis de esos animales probablenmte representa una verdadera desaparición de la hormona del tejido.

Con respecto a la disponibilidad de PRL de distinta edad para ser secretada, se encontró que la aplicación de un período de 15 minutos de succión a los animales separados de sus crías por 8 horas, indujo una depleción del contenido hipofisiario de PRL que no fué observada en los animales separados de sus crías por 16 ó 24 horas (figura 6, barras blancas). Asimismo, las hormonas marcadas 4 y 8 horas antes de la succión mostraron una depleción comparable cuando la extracción se llevó a cabo en amortiguador de tris a pH 7.2, no así la PRL marcada 1, 16 ó 24 horas antes de la succión (barras achurradas). Bajo la extracción en amortiguador de carbonatos a pH 10, ninguna de las hormonas marcadas mostró una reducción en su nivel en comparación con el valor de los testigos sin succión. La liberación de PRL al medio, por parte de las semihipófisis incubadas, se muestra en la figura 7. La secreción de PRL total y de PRL marcada está expresada como porcentaje del contenido hipofisiario respectivo al inicio de la incubación. La gráfica del lado izquierdo muestra que la secreción porcentual de PRL marcada de 4 horas de edad (triángulos blancos) fué significativamente mayor que la secreción porcentual de la hormona total (círculos negros) durante los primeros 90 minutos de incubación. La PRL marcada de 8 horas de edad (triángulos negros) fué secretada en paralelo con la PRL total, mientras que la PRL más joven, (aquella marcada 1 hora o 10 minutos antes y representadas por los círculos blancos y cuadrados blancos respectivamente) fué secretada en baja proporción

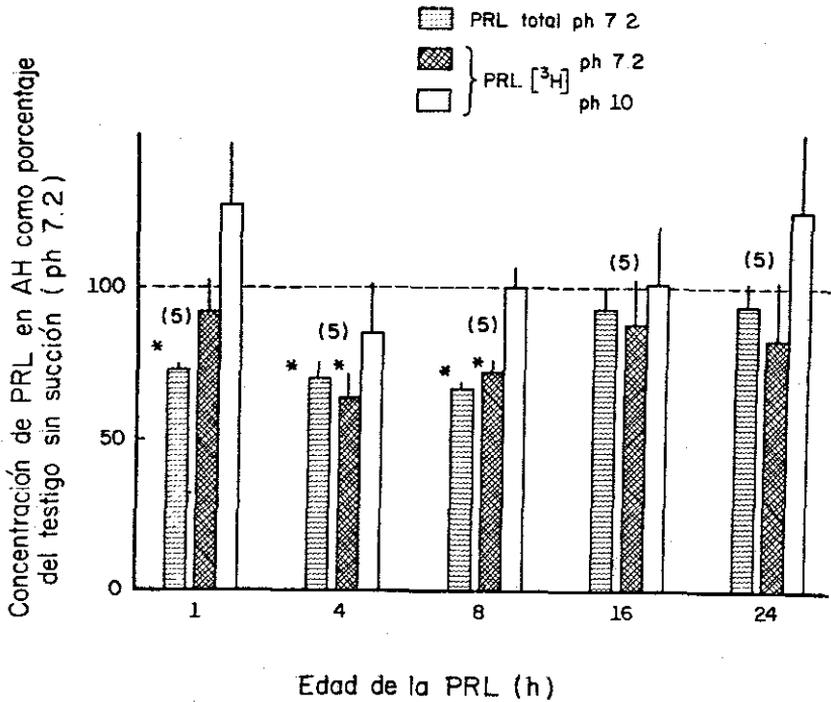


Fig. 6. Efecto de la succión sobre la concentración hipofisiaria de PRL total extraída en amortiguador de tris-HCl (0.13M) a pH 7.2 así como de (³H) PRL extraída tanto en amortiguador de tris como en amortiguador de carbonatos (0.05M) pH 10, en ratas lactantes separadas de sus crías por distintos períodos de tiempo. El isótopo radioactivo ((³H) leucina) se administró por vía endovenosa 1 hora, 4 horas u 8 horas antes del sacrificio en animales separados de sus crías por 8 horas, o bien 16 ó 24 horas antes del sacrificio en animales separados de sus crías 16 ó 24 horas respectivamente. Inmediatamente antes del sacrificio, la mitad de los animales fueron succionados por sus crías durante 15 min y la concentración de PRL total y marcada en sus hipófisis comparada porcentualmente con la concentración medida en sus grupos testigo de animales sin succionar (representados por la línea horizontal punteada). Nótese la depleción por efecto de la succión del total de la PRL en los grupos separados de sus crías por 8 horas, así como la depleción de la (³H)-PRL, marcada 4 y 8 horas antes. Cada barra representa el promedio + E.E. de 5 animales. Los asteriscos denotan diferencias significativas (p < 0.05) vs. el valor del grupo testigo sin succionar. (Mena, Martínez-Escalera, Clapp y Grosvenor, 1984).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Secreción in vitro de PRL total y PRL [^3H]
(% de la concentración de las AH preincubadas)

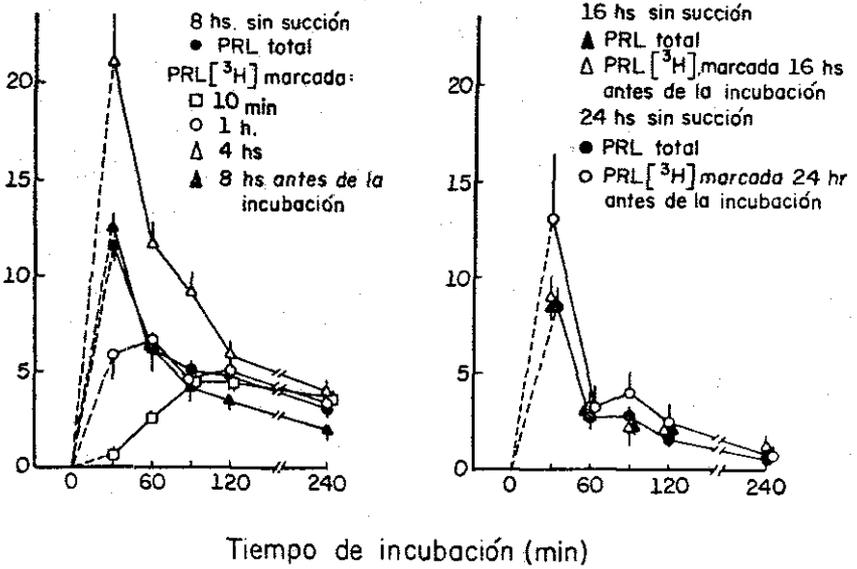


Fig. 7. Secreción de PRL y de (^3H) PRL al medio de incubación por parte de semihipófisis de ratas lactantes inyectadas i.v. con (^3H) leucina 0.2, 1, 4, 8, 16 ó 24 horas antes de ser incubadas por un período de 4 horas. En las otras semihipófisis de cada animal se determinaron los contenidos iniciales de PRL y de (^3H) PRL, expresando la secreción al medio como porcentaje de éstos. Cada valor representa el promedio \pm E. E. de 5 ó 6 animales. Los asteriscos denotan diferencias significativas ($p < 0.05$) vs el valor de secreción de PRL correspondiente. (Mena, Martínez-Escalera, Clapp y Grosvenor, 1984).

durante los primeros minutos de la incubación (30% para la PRL de 1 hora y 60% para la de 10 min) alcanzando posteriormente niveles de secreción porcentual comparables a los de la hormona total. En el lado derecho de la figura, se ilustra la secreción de las hormonas totales y marcadas de 16 y 24 horas. La secreción de PRL marcada de 16 horas así como la de 24 horas, guarda un paralelismo estrecho con las secreciones de PRL total en ambos grupos, secretándose en ambos casos una proporción muy baja de la ^3H -PRL contenida en el tejido.

La figura 8 muestra la magnitud de la secreción total acumulada al cabo de las 4 horas de incubación, de las diversas hormonas en forma porcentual al contenido de PRL en las hipófisis. Como se puede apreciar, la PRL de 4 horas de edad se secretó en una proporción mayor (65.0 ± 4.9 por ciento del contenido de las hipófisis) que las prolactinas de 10 min ($15.5 \pm 1.8\%$), 1 hora ($38.2 \pm 4.9\%$) y de 8 horas de edad ($34.3 \pm 2.4\%$). Asimismo las hormonas de 16 y 24 horas de edad se secretaron en una proporción de $18.4 \pm 2\%$ y $24.5 \pm 6.8\%$ respectivamente.

En la figura 9 se ilustran comparativamente las dinámicas de secreción de cada una de las hormonas marcadas, a través de la actividad específica de las hormonas liberadas en cada grupo. Dado que la actividad específica denota la proporción que guarda la hormona marcada respecto con la hormona total, ésta representación permite la comparación directa de la disponibilidad de cada una de las prolactinas

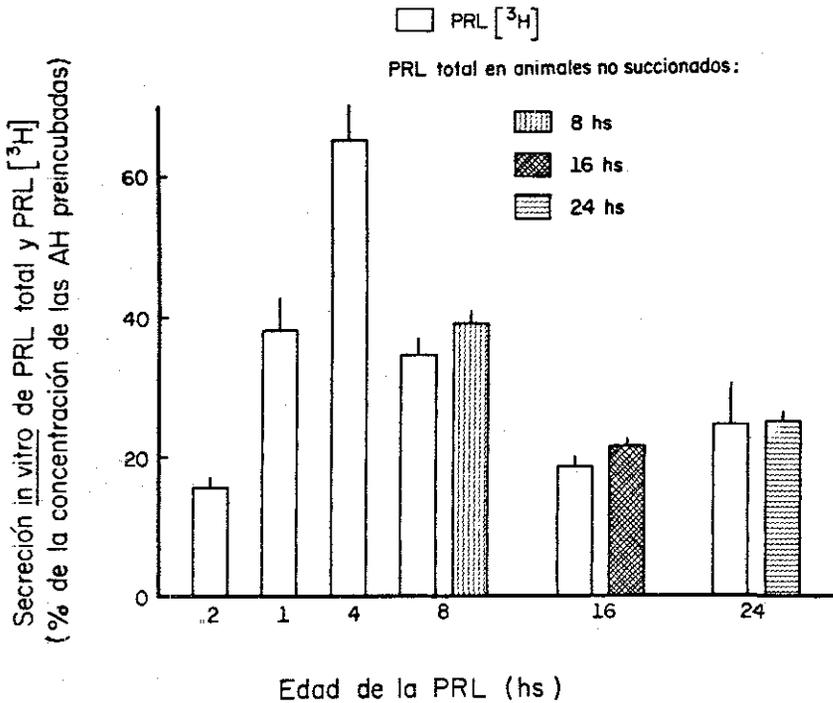


Fig. 8. Secreción acumulada durante 4 horas de incubación de PRL total así como de (^3H) PRL por parte de semihipófisis de ratas lactantes inyectadas i.v. con (^3H) leucina 10 min, 1 hora, 4, 8, 16 o 24 horas antes de ser sacrificadas y sus hipófisis incubadas por un período de 4 horas. La secreción se expresa en forma relativa al contenido inicial de las hipófisis preincubadas. Cada barra representa el promedio \pm E.E. de 5 ó 6 animales

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

marcadas para ser secretadas. Como se aprecia en la figura 9 la PRL de 4 y 8 horas de edad alcanza su máximo nivel de actividad específica en el medio desde el inicio de la incubación. Por su parte, la PRL de 10 minutos y 1 hora de edad tarda de 60 a 120 minutos en alcanzar este valor máximo. La hormona más vieja por su parte, se mantuvo siempre en un bajo nivel de actividad específica.

Retención de Prolactina Joven.

Todos estos resultados muestran que la PRL requiere de cierto tiempo para alcanzar el estado de madurez apropiado para ser secretada. De acuerdo con la medición del contenido de hormona marcada en el tejido, 30 minutos después de su síntesis, la PRL ya es detectable; en cambio la falta de detección de la misma a edades menores a 30 minutos se debe aparentemente a una solubilización incompleta de la hormona recién sintetizada contenida aún en microsomas (Zanini y col., 1974). Esta dificultad en la solubilización de la PRL cesa con la transferencia de la misma a los gránulos de secreción, lo cual parece ocurrir a partir de los 30 minutos de haberse sintetizado la hormona. Esto concuerda con el tiempo estimado en base a estudios autorradiográficos para el empaque de la hormona en gránulos (Farquhar y col., 1978). Sin embargo, a pesar de encontrarse ya detectable como PRL y aparentemente en forma granular, la hormona joven (1 hora después de su síntesis) no fué liberada

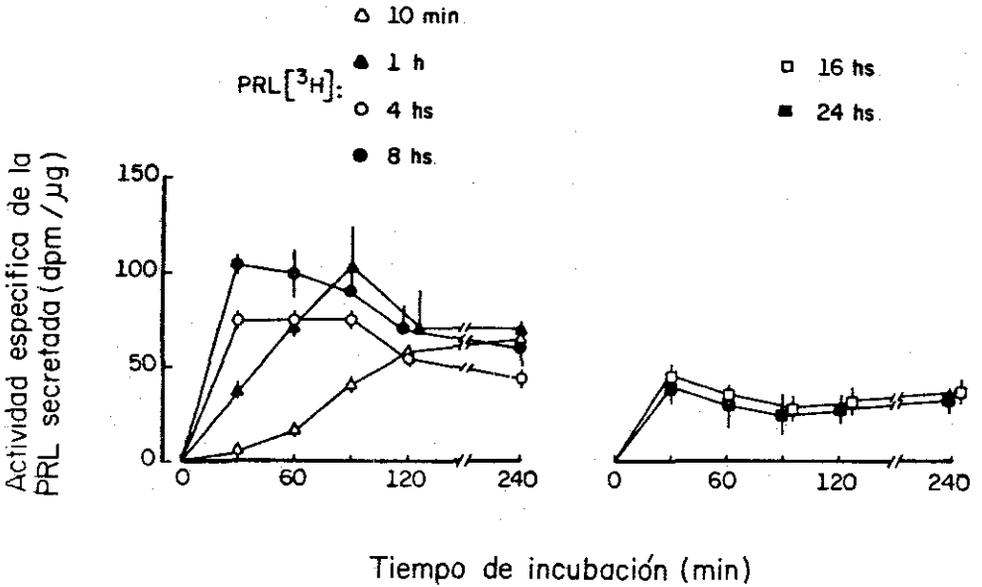


Fig. 9. Actividad específica de la PRL secretada, marcada 1, 4, 8, 16 ó 24 horas antes del inicio de la incubación. La actividad específica se determinó por la razón de la cantidad de (³H) PRL (dpm/mg/AH) dividida entre la cantidad total de PRL secretada al medio en cada tiempo. Nóte se como la actividad específica de la hormona marcada 10 min y 1 hora antes del inicio de la incubación tiene una latencia de 120 y 60 min respectivamente para alcanzar el valor máximo. Condiciones de marcaje iguales a las descritas en la fig. 7. (Mena, Martínez-Escalera, Clapp y Grosvenor, 1984).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fisiológicamente por efecto de la succión de las crías, pues no sufrió depleción, que es el paso limitante para la liberación de la PRL. En forma análoga, la secreción in vitro de esta hormona al medio de incubación fué de baja magnitud durante la fase inicial de la incubación y sólo posteriormente la liberación alcanzó el valor promedio representado por la secreción de la hormona total. Como se apreció con la medición de la actividad específica en el medio, la hormona joven requirió de 60 a 120 minutos para alcanzar su nivel máximo de liberación. Si nosotros sumamos la edad de la hormona al inicio de la incubación, con el tiempo que transcurre hasta que ésta alcanza su grado máximo de liberación, tenemos que el cenit de la secreción ocurre con la PRL que tiene de 2 a 2.5 horas de edad a partir de su síntesis. Este resultado fue interpretado en el sentido de que la hormona joven permanece cierto tiempo en la hipófisis antes de alcanzar la etapa en que es susceptible de ser liberada fisiológicamente. Esto a su vez supone la existencia de algún mecanismo selectivo de retención de la PRL joven, el cual protegería a esta hormona de una posible liberación prematura. Este mecanismo hipotético de retención selectiva de la hormona joven podría estar asociado al sistema hipotalámico dopaminérgico inhibitorio de la secreción, puesto que se ha reportado una inhibición más efectiva de la dopamina sobre la hormona joven que sobre la hormona madura (MacLeod y Lehmeyer, 1974; MacLeod, 1976; Cheung y col., 1981). Recientemente en nuestro laboratorio hemos -

analizado el efecto de la dopamina en estas condiciones (datos no publicados) encontrando que efectivamente la dopamina inhibe proporcionalmente más a la PRL de 1 hora de edad que a las de 4 y 8 horas de edad.

Secreción Preferencial de PRL Madura.

Las hormonas de 4 y 8 horas de edad, que de acuerdo con el estudio autorradiográfico ya referido (Farquhar y col., 1978) deben encontrarse en forma de gránulos maduros, mostraron la mayor secreción tanto in vivo como in vitro. In vitro, estas dos poblaciones fueron las únicas que resultaron depletadas por efecto de la succión. A pesar de que la liberación a la circulación de éstas hormonas no fué posible establecerla por impedimentos metodológicos, sabemos que in vivo la liberación de la hormona es siempre precedida por la depleción (Grosvenor y col., 1979b), por lo cual podemos predecir que in vivo, solamente las hormonas de 4 y 8 horas fueron liberadas a la circulación. Por lo que respecta a la liberación in vitro, estas dos hormonas se secretaron en la misma o en mayor proporción que la PRL total, alcanzando ambas su secreción máxima desde el inicio de la incubación de acuerdo con la actividad específica de la hormona en el medio de incubación. Todo esto sugiere que las edades de 4 y 8 horas se encuentran comprendidas dentro de la etapa óptima de madurez de la hormona por lo que a la secreción se refiere. Recientemente encontramos que la TRH

(Martínez-Escalera y col., 1982) estimula la liberación de estas dos poblaciones de prolactina de manera proporcionalmente mayor de lo que lo hace sobre hormonas más jóvenes y más viejas.

Existen algunos estudios que apoyan la liberación preferencial de la PRL recién sintetizada respecto a hormonas de mayor edad (Swearingen, 1971; MacLeod y Lehmeyer, 1974; MacLeod, 1976; Walker y Farquhar, 1980). Estos estudios parecen a primera vista contradictorios con los datos mostrados en el presente trabajo. Esta aparente contradicción podría ser resultado de las distintas condiciones experimentales de los estudios señalados. Estos fueron realizados o bien en células aisladas en cultivo, obtenidas de animales estrogenizados, o bien de adenohipófisis de ratas ciclantes. La alta tasa de recambio de la PRL hipofisiaria que inducen los estrógenos, implican quizás modificaciones en la organización funcional del lactotrofo. Por otro lado, el patrón de liberación de PRL en células aisladas, presenta claras diferencias con el patrón que ocurre en las condiciones en que se preserva la estructura del tejido (Tixier-Vidal, 1975; Vila-Porcile y Oliver, 1980). Otra condición que provoca dificultades de comparación se establece entre el marcaje de la PRL en condiciones in vitro con el marcaje in vivo. A pesar de esto, tanto Swearingen (1971) como MacLeod y Lehmeyer (1974) señalan que la secreción que ellos llaman preferencial de hormona joven, involucra hormona de más de una hora de haber sido sintetizada. De acuerdo con

el perfil que las actividades específicas de las distintas poblaciones de hormona marcada muestran en el medio de incubación, se hace evidente el carácter discreto de las poblaciones escogidas. La secreción de la hormona total por el contrario, representa la resultante de la integración de múltiples poblaciones discretas de hormonas, cada una de las cuales se desenvuelve como las aquí ejemplificadas. En nuestro estudio, la comparación de los patrones de secreción de hormonas de distintas edades nos permitieron concluir que la PRL tiene una fase óptima de secreción; que esta fase óptima comienza a las 2-2.5 horas posteriores a su biosíntesis; que la hormona permanece en esta fase por lo menos seis horas más y que 14 horas después ya se encuentra en otra fase de menor o nula disponibilidad para ser secretada. En contraste con esta situación, aquellos trabajos que como los ya citados comparan el patrón de secreción de PRL de una edad con el de la otra, sin conocer el perfil integral del fenómeno, corren el riesgo de comparar situaciones no necesariamente análogas, así como de llegar a conclusiones erróneas o bien parciales. Por último, la falta de correlación de los resultados experimentales con observaciones in vivo, no permite a los autores señalados proponer la secreción preferencial de PRL joven como un mecanismo fisiológico, sino únicamente como una observación obtenida en la condición experimental empleada.

Retención Selectiva de la Hormona Vieja.

Por lo que se refiere a la hormona más vieja (16-24 horas posteriores a la síntesis) los resultados de nuestro estudio indican que ésta es retenida selectivamente por lo que su actividad secretora se encuentra muy disminuida con respecto a la PRL de 4 a 8 horas de edad. Esto quedó de *manifiesto cuando las ratas separadas de sus crías por un período de 16 a 24 horas e inyectadas con la leucina tritida al inicio del mismo, fueron sometidas a una succión de 15 min*. En estas condiciones la succión no indujo la transformación ni de la PRL marcada ni de la PRL total, esto último confirmando resultados anteriores (Grosvenor y col., 1967). La falta de depleción de la PRL total y de la PRL marcada, así como la baja magnitud de la liberación de ambas al medio de incubación, sugieren que en el animal que ha permanecido 16 o más horas sin el estímulo de la succión, todas las poblaciones de hormona son afectadas en su actividad secretora. Recientemente en nuestro laboratorio (datos no publicados) encontramos que no solamente la actividad secretora del lactotropo disminuye por el prolongado período sin estimulación, sino también la actividad de otras fases del proceso como la biosíntesis de la hormona. Por lo que respecta al bajo nivel del marcaje detectado tanto en el grupo de 16 horas como el de 24 horas con respecto a los grupos de 1, 4 y 8 horas, un mecanismo de eliminación de ésta hormona parece estar actuando. Smith y Farquhar

(1966) ya habían señalado que en la rata no succionada por 24 horas aparecían estructuras celulares destinadas a la digestión de productos de desecho celular conocidas como liso^{somas}. Recientemente, no solo se ha descrito una enzima lisosomal específica destinada a la digestión de la PRL (de Marco y col., 1981), sino que se ha correlacionado el tiempo que permanece la rata sin la succión de sus crías, con los niveles de ésta y otras enzimas lisosomales y extraliso^{somas}les (de Marco y col., 1982) encontrándose un incremento en la actividad de algunas de ellas a partir de las 24 horas de deprivación de la succión.

En nuestro laboratorio hemos analizado la participación de los lisosomas en la disminución de la actividad secretora de las hipófisis de animales mantenidos sin el estímulo de la succión por muchas horas (datos no publicados). Encontramos que la administración del agente antilisosomal cloroquina, a la mitad del período de privación de la succión en ratas separadas de sus crías por 16 horas, permitió la restitución de la depleción de la PRL hipófisaria inducida por la succión, la cual como sabemos no ocurre en estas condiciones, así como aumentó la magnitud de la liberación de PRL por la hipófisis en animales separados de sus crías durante 16 horas hasta niveles comparables a los observados en ratas separadas por 8 horas.

Con respecto a la señal que dispara la actividad lisosomal, es poco lo que se conoce. Nansel y col. (1981), correlacionaron inversamente la inhibición de la liberación

in vitro de PRL inducida por la administración de distintas dosis de dopamina, con un incremento en la actividad de las enzimas lisosomales en la hipófisis de la rata en diestro. Esto, asociado a que en dichos animales el tratamiento con el precursor dopaminérgico L-dopa incrementó la actividad de una de estas enzimas; a que el tratamiento con haloperidol, un agente antidopaminérgico, así como con α -metil-p-tirosina, un agente inhibidor de la síntesis de dopamina, disminuyeron ambos la actividad de esta enzima; y sobre todo a que la incubación de hipófisis en presencia de cloroquina (agente antilisosomal) deprimió la inhibición de la secreción de PRL por dopamina, inhibiendo asimismo el incremento en la actividad de la enzima lisosomal, llevaron a este grupo a postular que la dopamina induce un incremento en la actividad de los lisosomas, los cuales a su vez son responsables de la inhibición de la liberación de PRL.

Debido a las implicaciones de estos hallazgos, no solo con respecto al generador de la actividad lisosomal, sino principalmente con respecto al mecanismo por el cual la dopamina inhibe la secreción de PRL, hemos analizado experimentalmente este problema. Encontramos que si bien el resultado se reproducía en condiciones semejantes a las descritas por sus autores en la rata en diestro, esto no ocurría modificando la composición del medio de incubación hacia una situación de mayor liberación de PRL. Asimismo, lo que fué verdaderamente importante, es que éste fenómeno no ocurre en la rata lactante, en ninguna de las dos condicioes

nes empleadas (datos no publicados). En la actualidad, si-
gue sin conocerse cuál es el factor que induce la actividad
lisosomal en las ratas deprivadas de la estimulación de sus
crías por muchas horas. Entre las causas probables, se pue
de mencionar a la acumulación de PRL en la hipófisis, que
ocurre en esta circunstancia (Shenai y Wallis, 1979), así
como el incremento en el grado de insolubilidad de la PRL
granular, que se encuentra asociado al tiempo transcurrido
a partir de su biosíntesis (Zanini y col., 1980).

CONCLUSIONES Y DISCUSION GENERAL.

Durante la lactancia en la rata, la PRL es secre-
tada en forma fásica en respuesta a la estimulación neuroge
nica que proporcionan las crías durante la succión. Desde
el punto de vista funcional la secreción de la hormona no
constituye un proceso simple, sino por el contrario parece
estar compuesto por lo menos de dos eventos, donde la libe-
ración de la PRL es precedida por una transformación intra-
celular de la misma. La naturaleza íntima del cambio sufri
do por la hormona durante la transformación es aún descono-
cida. Sin embargo, de acuerdo con los resultados señalados
en el presente estudio (Mena y col., 1982) e ilustrados en
la figura 1, la transformación de la PRL parece estar aso-
ciada a un cambio en la solubilidad de la hormona, respon-
sable en última instancia de la disminución en la detecta-

nes empleadas (datos no publicados). En la actualidad, si-
gue sin conocerse cuál es el factor que induce la actividad
lisosomal en las ratas deprivadas de la estimulación de sus
crías por muchas horas. Entre las causas probables, se pue
de mencionar a la acumulación de PRL en la hipófisis, que
ocurre en esta circunstancia (Shenai y Wallis, 1979), así
como el incremento en el grado de insolubilidad de la PRL
granular, que se encuentra asociado al tiempo transcurrido
a partir de su biosíntesis (Zanini y col., 1980).

CONCLUSIONES Y DISCUSION GENERAL.

Durante la lactancia en la rata, la PRL es secre-
tada en forma fásica en respuesta a la estimulación neuroge
nica que proporcionan las crías durante la succión. Desde
el punto de vista funcional la secreción de la hormona no
constituye un proceso simple, sino por el contrario parece
estar compuesto por lo menos de dos eventos, donde la libe-
ración de la PRL es precedida por una transformación intra-
celular de la misma. La naturaleza íntima del cambio sufrid
o por la hormona durante la transformación es aún descono-
cida. Sin embargo, de acuerdo con los resultados señalados
en el presente estudio (Mena y col., 1982) e ilustrados en
la figura 1, la transformación de la PRL parece estar aso-
ciada a un cambio en la solubilidad de la hormona, respon-
sable en última instancia de la disminución en la detecta-

bilidad de la misma. Asimismo, como se ilustra en el esquema de la figura 10, donde se resumen y compendian las hipótesis expresadas en ésta tesis, la PRL transformada proviene de la hormona que se encuentra en la etapa de gránulo "maduro". Desde el punto de vista morfofuncional, la matriz del gránulo de PRL que entra en exocitosis, parece representar una estructura estable (Vila Porcile y Oliver, 1980). Asimismo, la insolubilidad química que presenta la matriz del gránulo de PRL (Giannattasio y col., 1975; Haggi y Aoki, 1981) muestra una relación directa con la edad de la hormona a partir de su síntesis (Giannattasio y col., 1975).

Entre las múltiples posibles explicaciones del cambio en solubilidad de un compuesto proteico, se encuentra la interacción de éste con compuestos de diversa naturaleza, como por ejemplo hidratos de carbono macromoleculares, los cuales son componentes normales de los gránulos de PRL de bovinos (Zanini y col., 1979; Giannattasio y col., 1980). Asimismo, Merchant y Mena (1982) han mostrado evidencia de la interacción de glicoconjugados extracelulares con los gránulos de PRL durante la exocitosis. Sin embargo, la identificación de la naturaleza del cambio que sufre la PRL durante la transformación requiere aún de mucho trabajo.

Por lo que a la segunda etapa del proceso multifásico de secreción se refiere, vgr: la liberación de la PRL, existen una serie de evidencias indirectas obtenidas en experimentos in vivo, así como la evidencia directa in vitro (Mena y col., 1982) ilustrada en las figuras 2, 3 y 4, que sugieren fuertemente que la liberación de la PRL o-

RECAMBIO DE PRL EN LA HIPOFISIS DE LA RATA LACTANTE -Regulación y Control-

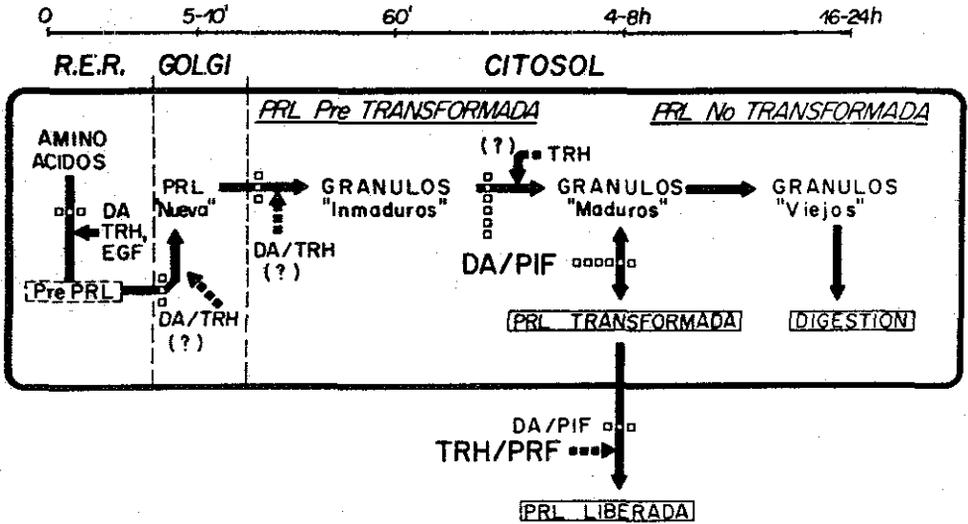


Fig. 10. Esquema representativo del recambio de PRL en la hipófisis de la rata lactante. La escala superior representa la relación temporal del paso de la hormona por los diversos compartimentos celulares. Las flechas compactas representan los cambios de fase de la hormona. Las flechas discontinuas negras simbolizan influencias facilitadoras y los segmentos discontinuos blancos simbolizan influencias inhibidoras. R.E.R.: Retículo endoplásmico rugoso; Golgi: Aparato de Golgi; DA: Dopamina; TRH: Tiroliberina; EGF: factor de crecimiento epidérmico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

curre a partir de la hormona que se encuentra en la fase transformada (ver figura 10).

La distinción entre el evento de la transformación y el de la liberación se da tanto por ciertas características intrínsecas de ambos eventos, así como por la naturaleza de la regulación superior que se ejerce sobre ellos. En cuanto a su dinámica, la depleción-transformación es un fenómeno rápido y masivo, mientras que la liberación de la PRL es un evento continuo que se da en forma sostenida en respuesta al estímulo externo y durante el tiempo que éste actúa. Comparativamente, el umbral de activación de la liberación es menor al de la transformación. Esto aunado al hecho ya descrito, que la hormona liberada parece provenir de aquella previamente transformada, confieren al evento de la depleción-transformación el carácter de paso limitante del proceso de secreción de PRL. Una vez transformada, y en caso de que se sostenga la estimulación periférica, la hormona continúa siendo liberada a una tasa constante. Si por el contrario, después de inducida la transformación, la estimulación periférica se suspende, la hormona transformada permanecerá como tal y conservará su carácter liberable por varias horas. La restitución de la estimulación en ese lapso, si bien induce la liberación de aquella hormona transformada por el primer estímulo, no provoca una segunda depleción-transformación, lo cual habla de un período refractario de éste evento, subsecuente a su activación.

Con respecto a la regulación que el hipotálamo e-

jerce sobre éste proceso multifásico de secreción de PRL, también se distingue el evento de transformación del de liberación. Como ya fué descrito, la transformación de la PRL se encuentra tónicamente inhibida por un factor hipotálamico (PIF) que se ha sugerido es la dopamina, el cual, a parentemente, no afecta a la liberación per se, o la inhibe muy levemente, como se ilustra en la figura 10 (Grosvenor y col., 1980). En cambio, la liberación es facilitada por un factor hipotalámico (PRF) que ha sido identificado con la tiroliberina (TRH), el cual sin embargo no afecta la transformación de la hormona (Grosvenor y Mena, 1980). En un intento por comprender el funcionamiento hipotalámico-hipofisario en la secreción de PRL como respuesta a la succión, proponemos el siguiente esquema secuencial: el estímulo periférico deprime transitoriamente el tono PIF-dopamina (de Greef y col., 1981) a la vez que estimula la liberación hipotalámica de PRF-TRH (de Greef y Visser, 1981); la depresión del tono dopaminérgico en estas circunstancias favorecería la transformación de la PRL a su forma liberable (Grosvenor y col., 1980) mientras que la secreción de PRF-TRH facilitaría la liberación de la hormona previamente transformada (Grosvenor y Mena, 1980). El sostenimiento de la succión mantiene tónicamente estimulado al eje PRF-TRH-liberación de PRL, pero no surte efectos posteriores sobre el eje PIF-DA-transformación de PRL, el cual presenta un período refractario de aproximadamente 2 horas.

Por otro lado, en estudios recientes hemos anali-

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

zando la influencia que los factores hipotalámicos (DA y TRH) ejercen sobre las primeras fases del proceso de secreción de la PRL, durante las etapas previas al estado granular de la hormona. En base a resultados aún preliminares, encontramos que éstos factores ejercen influencias antagónicas sobre la dinámica del procesamiento de la PRL en la fase previa al estado granular (probablemente desde la síntesis en el retículo endoplásmico rugoso hasta la condensación en las vacuolas del aparato de Golgi).

Subyacente al control hipotalámico del proceso de secreción de la PRL, existen una serie de factores locales determinantes en el funcionamiento del sistema.

Entre otros se analizó en el presente estudio un factor que ejemplifica la gran influencia que ejercen procesos locales de la propia hipófisis. Un factor ya señalado, la edad de la hormona, es determinante en el destino que ésta puede tener en un episodio de activación del reflejo de secreción de PRL.

Se sabe que existe una relación directa entre la magnitud de la depleción-transformación inducida por la succión y el período previo sin estimulación dentro del rango de las 2 a las 12 horas (Grosvenor y Mena, 1971 ; Grosvenor y col., 1979a; 1979b). Sin embargo, si dicho período se alarga a 16 ó 24 horas, entonces deja de presentarse la depleción-transformación en respuesta a la succión (Grosvenor y col., 1967; Mena y col., 1984). En éstas condiciones, Smith y Farquhar (1966) reportaron la aparición súbita de lisosomas y su fusión a los gránulos de secreción (crinofagia).

Aunado a todo esto, Zanini y col. (1980) reportaron una relación directa entre el grado de insolubilidad (estabilidad) de la matriz de los gránulos de PRL y la edad de los mismos a partir de su síntesis. En base a éstas evidencias de cambios morfológicos y químicos de la PRL en relación a su edad, analizamos los cambios fisiológicos que la hormona sufre posteriormente a su síntesis en relación a la depleción-transformación in vivo y a la liberación in vitro (Mena y col., 1984). Así encontramos que la PRL se encuentra en forma detectable como tal a partir de los 30 min posteriores a su síntesis (figura 5), tiempo que ha sido reportado por un estudio autorradiográfico como el que requiere la PRL para alcanzar la fase granular (Farquhar y col., 1978). Este resultado también concuerda con la falta de detectabilidad reportada por Zanini y col., (1974) de la PRL recién sintetizada, aún contenida en la fracción microsomal, aparentemente debido a la dificultad de solubilización. Sin embargo, a pesar de encontrarse detectable como tal la PRL sintetizada 30 a 60 min antes, no es secretada fisiológicamente, como se esquematiza en la figura 10. Este resultado supone la existencia de algún factor que selectivamente retenga a la PRL joven de su eventual secreción. En concordancia con esto, se ha reportado una inhibición más efectiva de la dopamina sobre la PRL madura (MacLeod y Lehmyer, 1974; MacLeod, 1976; Cheung y col., 1981). Recientemente hemos analizado el efecto de la dopamina sobre las poblaciones de PRL con diversas edades, encontrando que proporcionalmente el -

efecto de la dopamina es mayor sobre la hormona de 1 hora de edad que sobre aquella madura (4 u 8 hs de edad). La sugerencia derivada de éstos resultados, relativa a la existencia de mecanismos específicos de retención selectiva de la PRL joven ("inmadura"), requiere aún de más estudios para esclarecer su posible naturaleza.

Por lo que respecta a la PRL de 4 y 8 horas de edad, como se ilustra en las figuras 6, 7, 8 y 9, que de acuerdo con criterios morfológicos se encuentra en forma de gránulos "maduros" (Farquhar y col., 1978), desde el punto de vista funcional, tanto in vivo como in vitro constituyen las poblaciones hormonales susceptibles de secreción entre las poblaciones estudiadas (Mena y col., 1984). Como ya fué señalado, ésta secreción secuencial de las diversas poblaciones de PRL, discrepa con los resultados obtenidos por otros grupos de trabajo, quienes sostienen que es la hormona recién sintetizada la que es secretada preferencialmente (Swearingen, 1971; MacLeod y Lehmeyer, 1974; MacLeod, 1976; Walker y Farquhar, 1980). Dejando de lado ciertas diferencias metodológicas entre esos estudios y el nuestro, señalamos que conclusiones de este tipo deben estar sustentadas tanto en estudios que hagan objetiva la comparación de situaciones análogas que no limiten a priori el comportamiento posterior de las poblaciones analizadas, así como también deben mantenerse en el marco de referencia que fijan los conocimientos funcionales del fenómeno en conjunto. De otra manera, las conclusiones derivadas de estudios de éste tipo podrían es-

tar basadas en resultados parciales que al no entenderse como tales, resultarían en un malentendimiento del fenómeno, o en el mejor de los casos, en la descripción de un fenómeno artificial, resultado de las condiciones experimentales.

Otro aspecto señalado en el presente estudio y que requiere aún de mucho análisis para esclarecer su participación en el cuadro general de la secreción de PRL, es el papel que desempeñan vías alternativas de la liberación de la PRL como lo es la degradación intracelular de la hormona más vieja. Como fué descrito en una sección precedente, la suspensión prolongada (16-24 horas) de la actividad del sistema por falta de estimulación periférica resulta en la reducción de los niveles hormonales de las poblaciones más viejas de la PRL (fig. 5) así como también en la reducción de la actividad liberadora de la glándula (figs. 6, 7, 8 y 9). El primero de estos efectos es aparentemente debido a la aparición o activación de un sistema digestivo intracelular representado por los lisosomas (Smith y Farquhar, 1966). A su vez, la supresión farmacológica de los lisosomas, incrementó la actividad secretora del sistema a niveles comparables a los encontrados en animales no estimulados por 8 horas. Como ya vimos, el efecto estimulante de la dopamina sobre la actividad lisosomal que se describió en la rata cicante (Nansel y col., 1981), no parece operar en la rata lactante. Como posibles señales endógenas para el disparo de la actividad del aparato digestivo, se ha sugerido la acumulación de PRL en la hipófisis que tiene lugar después

de muchas horas sin ser activado el sistema (Shenai y Wallis, 1979), así como el incremento en el grado de insolubilidad de la PRL granular, asociado con el tiempo transcurrido a partir de la biosíntesis (Zanini y col., 1980).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA.

Amenomori, Y., Chen, C.L y Meites, J. (1970): Serum prolactin levels in rats during different reproductive states. Endocrinology 86: 506-511.

Argent, B.E., Smith, R.K. y Case, M.R. (1975): The distribution of bivalent cation-stimulated adenosine triphosphate hydrolysis and calcium accumulation by subcellular particles. Biochem. Soc. Trans. 3: 713-718.

Baumrucker, C.R. y Keenan, T.W. (1975): Membranes of mammary gland. X. Adenosine triphosphate-dependent calcium accumulation by Golgi apparatus rich fractions from bovine mammary gland. Exp. Cell Res. 90: 253-261.

Ben-Jonathan, N., Oliver, C., Weiner, H.J., Mical, R.S. y Porter, J.C. (1977): Dopamine in hypophyseal portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. Endocrinology 100: 425-458.

Bethea, C.L. y Neill, J.D. (1979): Prolactin secretion after cervical stimulation of rats maintained in constant dark or constant light. Endocrinology 104: 870-876.

Birge, C.H., Jacobs, L.S., Hammer, C.T. y Daughaday, W.H. (1970): Catecholamine inhibition of prolactin secretion by isolated rat adenohypophyses. Endocrinology 86: 120-130

Bishop, W., Krulich, L., Fawcett, C.P. y McCann, S.M. (1971): The effect of median eminence (ME) lesion on plasma levels of FSH, LH, and prolactin in the rat. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 136: 925-927.

Biswas, D.K. y Tashjian, A.H. Jr. (1974): Intracellular site of prolactin synthesis in rat pituitary cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 60: 241-247.

Blake, C.A. (1974): Stimulation of pituitary prolactin and TSH release in lactating and proestrous rat. Endocrinology 94: 503-508.

Blobel, G., Walter, P., Chang, K.N., Bolman, B.M., Erickson, A.H. y Lingappa, V.R. (1979): Translocation of proteins across membranes: The signal hypothesis and beyond. pp. 9-36. En: Symposia of the society for experimental biology: Secretory Mechanisms. Cambridge University Press, Cambridge.

Boyd, A.E. III., Spencer, E., Jackson, I.M.D. y Reichlin, S. (1976): Prolactin releasing factor in porcine hypothalamic extract distinct from TRH. Endocrinology 99: 861-871.

- Burnet, F.R. y Wakerley, J.B. (1976): Plasma concentrations of prolactin and thyrotropin during suckling in urethane-anesthetized rats. J. Endocr. 70: 429-437.
- Caro, L.G. y Palade, G.E. (1964): Proteins synthesis, storage and discharge in the pancreatic exocrine cell. J. Cell. Biol. 20: 473-495.
- Chen, C.L., Amenomori, Y., Lu, K.H., Voogt, J.L. y Meites, J. (1970): Serum prolactin levels in rats with pituitary transplants or hypothalamic lesions. Neuroendocrinology 6: 220-227.
- Chen, H.J., Mueller, G.P. y Meites, J. (1974): Effect of L-dopa and somatostatin on suckling-induced release of PRL and G H. Endocr. Res. Commun. 1: 283-289.
- Cheung, C.Y., Kuhn, R.W. y Weiner, R.I. (1981): Increased responsiveness of the dopamine-mediated inhibition of prolactin synthesis after destruction of the medial basal hypothalamus. Endocrinology 108: 747-753.
- Clemente, F. y Meldolesi, J. (1975): Calcium and pancreatic secretion. I. Distribution of calcium and magnesium in the acinar cells of the guinea pig pancreas. J. Cell. Biol. 65: 88-95.
- Convey, E.M. y Reece, R.P. (1969): Restoration of pituitary lactogen released in response to suckling. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131: 543-545.
- Cowie, A.T. y Folley, S.J. (1961): The mammary gland and its secretion. pp. 590-632. En: Young, W.C. (Ed.). Sex and internal secretions. Williams and Wilkins, Co., Baltimore.
- Cowie, A.T. y Tindal, J.S. (1971): The physiology of lactation, Monographs of the Physiological Society. Arnold, London.
- De Greef, W.J., Plotsky, P.M. y Neill, J.D. (1981): Dopamine levels in hypophyseal stalk plasma and PRL levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of simulated suckling stimulus. Neuroendocrinology 32: 229-233.
- De Greef, W.J. y 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.
- De Marco, L., Mashiter, K. y Peters, T.J. (1981): Analytical subcellular fractionation of rat pituitary homogenates with special reference to prolactin proteolysis by lysosomes. Biochim. Biophys. Acta 677: 489-495.

De Marco, L., Mashiter, K. y Peters, T.J. (1982): Suckling withdrawal increases pituitary lysosomal enzyme activities and PRL protease in lactating rats. Endocrinology 110: 1178-1182.

Dhariwal, A.P.S., Grosvenor, C.E., Antunes-Rodriguez, J. y McCann, S.M. (1968): Studies on the purification of ovine prolactin-inhibiting factor. Endocrinology 82: 1236-1241.

Evans, G.A. y Rosenfeld, M.G. (1976): Cell free synthesis of prolactin precursor directed by mRNA from cultured rat pituitary cells. J. Biol. Chem. 251: 2842-2847.

Evans, G.A., Hucko, J. y Rosenfeld, M.G. (1977): Preprolactin represents the initial product of prolactin in RNA translation. Endocrinology 101: 1807-1814.

Everett, J.W. (1954): Luteotropic function of autografts of the rat hypophysis. Endocrinology 54: 685-690.

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

Farquhar, M.G. (1977): Secretion and crinophagy in prolactin cells. pp. 37-94. En: Dellmann, H.D., Johnson, J.A. y Klachko, M.D. (Eds.). Comparative Endocrinology of Prolactin. Plenum Press, New York.

Farquhar, M.G. (1978): Recovery of surface membrane in anterior pituitary cells: variations in traffic detected with anionic and cationic ferritin. J. Cell. Biol. 77: R 35-42.

Farquhar, M.G., Skutelski, E.H. y Hopkins, C.R. (1975): Structure and function of the anterior pituitary and dispersed pituitary cells: In vitro studies. pp. 84-128. En: Tixier-Vidal, A. y Farquhar, M.G. (Eds.), The Anterior Pituitary. Academic Press, New York.

Farquhar, M.G., Reid, J.J. y Daniell, L.W. (1978): Intracellular transport and packaging of prolactin: a quantitative electron-microscope autoradiographic study of mammothrophs dissociated from rat pituitaries. Endocrinology 102: 296-302.

Flückiger, E. y Kovacs, E. (1974): Inhibition of 2-Br- α -ergocryptina mesilate (CB-154) of suckling induced pituitary prolactin depletion in lactating rats. Experientia 30: 1173-1177.

ESTA TESIS NO BALI

DE LA BIBLIOTECA

Freeman, M.E., Smith, M.S., Nazian, S.J. y Neill, J.D. (1974): Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. Endocrinology 94: 875-882.

Giannattasio, G. y Zanini, A. (1976): Presence of sulfated proteoglycans in prolactin secretory granules isolated from the rat pituitary gland. Biochim. Biophys. Acta 439: 349-353.

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

Giannattasio, G., Zanini, A., Rosa, P., Meldolesi, J., Margolis, R.K. y Margolis, R.U. (1980): Molecular organization of PRL granules. III. Intracellular transport of sulfated glycosaminoglycans and glycoproteins in the bovine PRL granule matrix. J. Cell. Biol. 86: 273-279.

Gibbs, D.M. y Neill, J.D. (1978): Dopamine levels in hypophyseal stalk blood in the rat are sufficient to inhibit prolactin secretion in vivo. Endocrinology 102: 1895-1900.

Grosvenor, C.E. (1965): Effect of nursing and stress upon prolactin inhibiting activity of the rat hypothalamus. Endocrinology 77: 1037-1042.

Grosvenor, C.E., Mena, F. y Schaeffgen, D.A. (1967): Effects of non-suckling interval and duration of suckling on the suckling induced fall in pituitary prolactin concentration in the rat. Endocrinology 81: 449-453.

Grosvenor, C.E. y Mena, F. (1971): Effect of suckling upon the secretion and release of prolactin from the pituitary gland of the lactating rat. J. Anim. Sci. 32, suppl. 1: 115-136.

Grosvenor, C.E. y Whitworth, N.S. (1974): Evidence for a steady rate of secretion of prolactin following suckling in the rat. J. Dairy Sci. 57: 900-904.

Grosvenor, C.E. y Whitworth, N.S. (1979): Secretion rate and metabolic clearance rate of prolactin in the rat during mid- and late lactation. J. Endocr. 82: 409-414.

Grosvenor, C.E. y Mena, F. (1980): Evidence that TRH and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. Endocrinology 107: 863-868.

Grosvenor, C.E., McCann, S.M. y Nallar, R. (1965): Inhibition of nursing-induced and stress-induced fall in pituitary prolactin concentration in lactating rats by injection of acid extracts of bovine hypothalamus. Endocrinology 76:883-389.

Grosvenor, C.E., Mena, F. y Whitworth, N.S. (1979a): The secretion rate of prolactin in the rat during suckling and its metabolic clearance rate after increasing intervals of non-suckling. Endocrinology 104: 372-376.

Grosvenor, C.E., Mena, F. y Whitworth, N.S. (1979b): Ether releases large amounts of prolactin from rat pituitaries previously depleted by short-term suckling. Endocrinology 105: 884-887.

Grosvenor, C.E., Mena, F. y Whitworth, N.S. (1980): Evidence that the dopaminergic - PIF mechanism regulates the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. Endocrinology 106: 481-485.

Grosvenor, C.E., Withworth, N.S. y Mena, F. (1981): Evidence that the depletion and release phases of prolactin secretion in the lactating rat have different activation threshold in response to exteroceptive stimulation from rat pups. Endocrinology 108: 820-826.

Haggi, E. y Aoki, A. (1981): Prolactin content in rat pituitary gland. RIA of prolactin after different extraction procedures. Acta Endocrinologica 97: 338-342.

Häusler, A., Rohr, H.P., Marbach, P. y Flückiger, E. (1978): Changes in PRL secretion in lactating rats assessed by correlative morphometric and biochemical methods. J. Ultrastruct. Res. 64: 74-80.

Hökfelt, T. (1967): The possible ultrastructural identification of tubero-infundibular dopamine containing nerve endings in the median eminence of the rat. Brain Res. 5: 121-124.

Holst, S. y Turner, C.W. (1939): Lactogen content of pituitary of pregnant and lactating rabbits and guinea pigs. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 42: 479-483.

Jamieson, J.D. (1979): Intracellular transport and discharge of secretory proteins: Present status and future perspectives. pp. 273-288. En: Silverstein, S. (Ed.), Transport of Macromolecules in Cellular System. Dahlem Konferenzen, Berlin.

Jamieson, J.D. y Palade, G.E. (1968): Intracellular transport of secretory proteins in the pancreatic exocrine cell. IV. Metabolic requirements. J. Cell. Biol. 39: 589-595.

Koch, Y., Lu, K.H. y Meites, J. (1970): Biphasic effects of catecholamines on pituitary prolactin release in vitro. Endocrinology 87: 673-675.

Kreibich, G., Ulrich, B.L. y Sabatini, D.D. (1978a): Proteins of rough microsomal membranes related to ribosome binding. I. Identification of ribophorins I and II, membrane proteins characteristic of rough microsomes. J. Cell Biol. 77: 464-470.

Kreibich, G., Freienstein, C.M., Pereyra, B.N., Ulrich, B.L. y Sabatini, D.D. (1978b): Proteins of rough microsomal membrane related to ribosome binding. II. Cross-linking of bound ribosomes to specific membrane proteins exposed at the binding sites. J. Cell Biol. 77: 488-495.

Kuhn, E., Krulich, L., Fawcett, C.P. y McCann, S.M. (1974): The ability of hypothalamic extracts to lower blood PRL levels in lactating rats. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 146: 104-109.

Labrie, F., Pelletier, G., Lemay, A., Borgeat, P., Barden, N., Dupont, A., Savary, M., Côte, J. y Boucher, R. (1973): Control of protein synthesis in anterior pituitary gland. Acta Endocrinol. Suppl. 180: 301-309.

Lingappa, V.R., Devillers-Thierry, A. y Blobel, G. (1977): Nascent prehormones are intermediates in the biosynthesis of authentic bovine pituitary growth hormone and prolactin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74: 2432-2435.

Lorenson, M.Y. y Jacobs, L.S. (1982): Thiol regulation of protein, growth hormone, and prolactin release from isolated adenohypophysial secretory granules. Endocrinology 110: 1164-1172.

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

Machlin, L.J., Jacobs, L.S., Civulis, N., Kimees, R. y Miller, R. (1974): An assay for growth hormone and prolactin releasing activities using a bovine pituitary cell cultured system. Endocrinology 95: 1350-1356.

MacLeod, R.M. (1976): Regulation of prolactin secretion. pp. 169-194. En: Martini, L. y Ganong, W.F. (Eds.), Frontiers in Neuroendocrinology vol. 4. Raven Press, New York.

MacLeod, R.M. y Lehmyer, J.E. (1972): Regulation of the synthesis and release of prolactin. pp. 53-82. En: Wols-thenholme, G.E.W. y Knight, J. (Eds.), Lactogenic Hormones, Churchill Livingstone, London.



MacLeod, R.M. y Lehmeyer, J.E. (1974): Studies on the mechanism of the dopamine-mediated inhibition of prolactin secretion. Endocrinology 94: 1077-1085.

Martínez-Escalera, G., Clapp, C., Grosvenor, C.E. y Mena, F. (1982): In vitro effects of thyrotrophin releasing hormone (TRH) upon secretion of de novo synthesized and mature prolactin (PRL) by lactating rat adenohypophyses (AP). Federation Proceedings 41: 1099.

Maurer, R.A. y McKean, D.J. (1978): Synthesis of preprolactin and conversion to prolactin in intact cell and a cell-free system. J. Biol. Chem. 253: 6315-6317.

Mena, F., Pacheco, P. y Grosvenor, C.E. (1980): Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma concentrations of prolactin in anesthetized lactating rats. Endocrinology 106: 458-463.

Mena, F., Martínez-Escalera, G., Clapp, C., Aguayo, D., Forray, C. y Grosvenor, C.E. (1982): A solubility shift occurs during depletion-transformation of Prolactin within the lactating rat pituitary. Endocrinology 111: 1086-1091.

Mena, F., Martínez-Escalera, G., Clapp, C. y Grosvenor, C.E. (1984): In vivo and in vitro secretion of prolactin by lactating rat adenohypophyses as a function of intracellular age. J. Endocr. 101: 27-32.

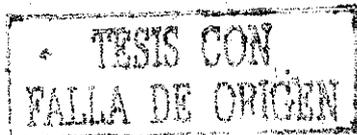
Merchant, H. y Mena, F. (1982): Evidence that extracellular glycoconjugates interact with prolactin in granules during exocytosis in lactating rat adenohypophyses. J. Ultraestruct. Res. 80: 53-61.

Milmore, J.E. y Reece, R.P. (1975): Effects of porcine hypothalamic extract on prolactin release in the rat. Endocrinology 96: 732-738.

Nansel, D.D., Gudelsky, G.A., Raymond, M.J., Neaves, W.B. y Porter, J.C. (1981): A possible role for lysosomes in the inhibitory action of dopamine on PRL release. Endocrinology 108: 896-902.

Negro-Vilar, A., Saad, W.A. y McCann, S.M. (1977): Evidence for a role of prolactin in prostate and seminal vesicle growth in immature male rats. Endocrinology 100: 729-737.

Neill, J.D. (1974): Prolactin: its secretion and control. pp. 469-568. En: Knobil, E. y Sawyer, W.H. (Eds.), Handbook of Physiology, Vol. 4., sect. 7. American Physiological Society, Washington, D.F.



Neill, J.D. (1980): Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. pp. 129-155. En: Martini, L. y Ganong, W.F. (Eds) Frontiers in Neuroendocrinology, vol. 6. Raven Press, New York.

Nicoll, C.S. (1972): Some observations and speculations on the mechanism of "depletion", "repletion", and release of adenyhypophyseal hormones. Gen. Comp. Endocrinol. (Suppl.) 3: 86-96.

Nicoll, C.S. (1974): Physiological actions of prolactin. pp. 253-292. En: Knobil, E. y Sawyer, W.H. (Eds.), Handbook of Physiology, vol. 4, sect. 7. American Physiological Society, Washington, D.C.

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

Nicoll, C.S., Fiorindo, R.P., MacKenee, C.F. y Parsons, J.A. (1970): Assay of hypothalamic factors which regulate prolactin secretion. pp. 115-150. En: Meites, J. (Ed.), Hypophysiotropic hormones of the hypothalamus: Assay and Chemistry, Williams and Wilkins, Baltimore.

Nicoll, C.S., Mena, F., Nichols, C.W. Jr., Green, S.H., Tai, M. y Russell, S.M. (1976). Analysis of suckling induced changes in adenyhypophyseal prolactin concentration in the lactating rat by three assay methods. Acta Endocrinologica 83: 512-521.

Norman, T.C. (1976): Neurosecretion by exocytosis. Int. Rev. Cytol. 46: 1-8.

Pasteels, J.L. (1961): Secretion de prolactine par L'hypophyse en culture de tissus. C.R. Acad. Sci. Paris. 253: 2140-2146.

Pasteels, J.L. (1962): Administration d'extraits hypothalamiques a l'hypophyse de rat *in vitro*, dans le but d'en contrôler la secretion de prolactine. C.R. Acad. Sci. Paris. 254: 2664-2668.

Pelletier, G. (1973): Secretion and uptake of peroxidase by rat adenyhypophyseal cells. J. Ultraestruct. Res. 43: 445-459.

Plotsky, P.M., Gibbs, D.M. y Neill, J.D. (1978): Liquid chromatographic electrochemical measurement of dopamine in hypophyseal stalk blood of rats. Endocrinology 102: 1887-1894.



Prilusky, H. y Deis, R.P. (1975): Effect of L-dopa on milk ejection and prolactin release in lactating rats. J. Endocr. 67: 397-404.

Rambourg, A. y Racadot, J. (1968): Identification en microscopie electronique de six types cellulaires dan l'antehypophyse du rat a l'aide d'una technique de coloration par la mélange acide chromique-phosphotunstique. C. R. Acad. Sci. 266: 153-159.

Reece, R.P. y Turner, C.W. (1937): Effect of the stimulus of suckling upon galactin content of the rat pituitary. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 35: 621-629.

Reith, E.J. (1976): The binding of calcium within the Golgi saccules of the rat odontoblast. Am. J. Anat. 147: 267-271.

Sar, M. y Meites, J. (1969): Effects of suckling on pituitary release of PRL, GH and TSH in postpartum lactating rats. Neuroendocrinology 4: 25-31.

Selinger, Z., Naim, E. y Lasser, M. (1970): ATP-dependent calcium uptake by microsomal preparations from rat parotid and submaxillary glands. Biochim. Biophys. Acta 137: 326-330.

Shaar, C.J. y Clemens, J.A. (1974): The role of catecholamines in the release of anterior pituitary prolactin in vitro. Endocrinology 95: 1202-1212.

Shenai, R. y Wallis, M. (1979): Biosynthesis and degradation of PRL in the rat anterior pituitary gland. Biochem. J. 182: 735-743.

Smith, R.W. y Farquhar, M.G. (1966): Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. J. Cell. Biol. 31: 319-347.

Smith, M.S. y Neill, J.D. (1976): Termination at mid pregnancy of the two daily surges of plasma prolactin initiated by mating in the rat. Endocrinology 98: 696-701.

Smith, M.S., McLean, B.K. y Neill, J.D. (1976): Prolactin: the initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat. Endocrinology 98: 1370-1377.

Stoekel, M.E., Hinderlag-Gertner, C., Dellmann, H.D., Poste, A. y Stutinsky, F. (1975): Subcellular distribution of calcium in mouse hypophysis. I. Calcium distribution in the adeno- and neurohypophysis under normal condition. Cell Tissue Res. 157: 307-311.

Subramanian, M.G. y Reece, R.P. (1975): Anterior pituitary and plasma prolactin in rats after 2 to 90 minutes of suckling. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 149: 754-756.



Swearingen, K.C. (1971): Heterogeneous turnover of adenohipofyseal prolactin. Endocrinology 89: 1380-1385.

Swearingen, K.C. y Nicoll, C.S. (1972): Prolactin turnover in the rat adenohipofyses in vivo: its evaluation as a method for estimating secretion rates. J. Endocr. 53: 1-15.

Talwalker, R.K., Ratner, A. y Meites, J. (1963): In vitro inhibition of pituitary prolactin synthesis and release by hypothalamic extracts. Am. J. Physiol. 205: 213-218.

Tashjian, A.F. Jr., Barowski, N.J. y Jensen, D.K. (1971): Thyrotropin releasing hormone. Direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. Biochem. Biophys. Res. Commun. 81: 798-806.

Tishler, P.V. y Epstein, C.J. (1968): A convenient method of preparing polyacrylamide gels for liquid scintillation spectrometry. Anal. Biochem. 22: 89-94.

Tixier-Vidal, A. (1975): Ultrastructure of anterior pituitary cells in culture. p. 181-212. En: Tixier-Vidal, A. y Farquhar, M.G. (Eds.). The anterior pituitary, Academic Press, N.Y.

Tixier-Vidal, A., Picart, R. y Moreau, M.F. (1976): Endocytose et secretion dans les cellules ante hypophysaires en culture: Action des hormones hypothalamiques. J. Microsc. Biol. Cell. 25: 159-163.

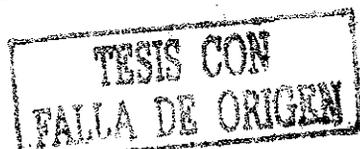
Tucker, H.A. (1974): General endocrinological control of lactation, pp. 277-326. En: Larson, B.L. y Smith, V.R. (Eds.). Lactation: a comprehensive treatise. Vol. 1. Cap. 5. Academic Press, N.Y.

Valverde-R., C., Chieffo, V. y Reichlin, S. (1972): Prolactin releasing factor in porcine and rat hypothalamic tissue. Endocrinology 91: 982-993.

Vila Porcile, E. (1975): Morphological and functional relationship between the different compartments of the rat anterior pituitary. pp. 24. En: Proceedings of the Xth International Congress of Anatomy. Tokyo, Science Council of Japan, Tokyo.

Vila Porcile, E. y Olivier, L. (1978): Exocytose et endocytose dans la cellule aprolactine au cours de la secretion: Etude cinotique in vivo au mayer de la peroxydase. J. Microsc. Biol. Cell. 32: 26a-28a.

Vila Porcile, E. y Olivier, L. (1980): Exocytosis and related membrane events. pp. 67-104. En: Jutisz, M. y McKerns, K.W. (Eds.). Synthesis and release of adenohipofyseal hormones, Plenum Press, New York.



Walker, A.M. y Farquhar, M.G. (1980): Preferential release of newly synthesized prolactin granules is the result of functional heterogeneity among mammatrophs. Endocrinology 107: 1095-1104.

Wang, L. (1959): Plasma volume, cell volume, total blood volume and F cells factor in the normal and splenectomized Sherman rat. Am. J. Physiol. 196: 188-192.

Zanini, A. y Giannattasio, G. (1974): Molecular organization of rat prolactin secretory granules. pp. 329-339. En: Ceccarelli, B., Clemente, F. y Meldolesi, J. (Eds.), Advances in Cytopharmacology. Vol. 2, Raven Press, New York.

Zanini, A., Giannattasio, G. y Meldolesi, J. (1974): Studies on in vitro synthesis and secretion of growth hormone and prolactin. II. Evidence against the existence of precursor molecules. Endocrinology 94: 104-111.

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

Zanini, A., Giannattasio, G. y Meldolesi, J. (1980): Intracellular events in prolactin secretion. pp. 105-123. En: Jutisz, M. y McKerns, K. W. (Eds.), Synthesis and release of adenohipophyseal hormones. Plenum Press, New York.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN