

03068
8
28

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**Colegio de Ciencias y Humanidades,
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado.
Centro de Neurobiología**

Localización Inmuncitoquímica de un antígeno inmunoreactivo a la prolactina 16K en el sistema hipotálamo-neurohipófisis de la rata

TESIS
que para obtener el grado de:

Maestro en Ciencias Fisiológicas
presenta

Gabriel Gutiérrez Ospina

Director de Tesis:

Dra. María del Carmen Clapp Jiménez
Centro de Neurobiología
UNAM

Co-asesores:

Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera
Centro de Neurobiología, UNAM

Dr. Horacio Merchant Larios
Depto. de Biología del Desarrollo
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Este trabajo fue realizado con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, registro no. 56260

MÉXICO, D.F. 1995



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ÍNDICE

Tema	Página
Dedicatorias	i
Testimonios de Agradecimiento	ii
Resumen	1
Introducción	2
Antecedentes	
Generalidades sobre la Prolactina	3
a) Estructura del gen	3
b) Secuencia de aminoácidos y relación estructura-función	4
c) Heterogeneidad estructural	5
d) Sitios de producción	8
e) Regulación de su síntesis y secreción	10
f) Funciones	13
g) Receptores y mecanismos de transducción	14
Antecedentes inmediatos	
Generalidades sobre la Prolactina 16 kDa	16
a) Actividad biológica tipo prolactina	16
b) Actividad biológica propia	16
c) Presencia endógena	17
Objetivo	18
Materiales y Métodos	
- Animales y procesamiento histológico de las muestra	20
- Inmunocitoquímica	20
- Influencia del ciclo estral sobre la inmuno-reactividad a la PRL 16 kDa en el sistema hipotálamo-	

neurohipófisis	22
- Observaciones y Fotomicrografías	23
Resultados	
Hipófisis	
- Inmuno-reactividad a la PRL 23 kDa en la hipófisis de la rata	23
- Inmuno-reactividad a la PRL 16 kDa en la hipófisis de la rata	24
- Doble inmunocitoquímica en la glándula hipófisis	24
Cerebro	
- Inmuno-reactividad a la PRL 23 kDa en el cerebro de la rata	25
- Inmuno-reactividad a la PRL 16 kDa en el cerebro de la rata	25
- Influencia del ciclo estral sobre la inmuno-reactividad a la PRL 16 kDa en el sistema hipotálamo-neurohipofisario.	26
Discusión	
- Inmuno-reactividad para las PRLs 23K y 16K en la hipófisis de la rata	28
- Inmuno-reactividad para las PRL 23K y 16K en el cerebro de la rata	32
- Efectos del ciclo estral sobre la inmuno-reactividad para la PRL 16K en el hipotálamo de la rata	36
Bibliografía	iii

*El verdadero valor del ser humano radica en la capacidad que posee para liberarse de
sí mismo.*

Albert Einstein

1934

**A Lina y Crispín, mis padres,
Para quiénes las palabras de agradecimiento
serán siempre insuficientes.**

**A Omar, Zoraida e Iván
De quiénes he aprendido , día a día, la fraternidad, el deseo y la lucha tenaz por ser.**

**A Elizabeth Hernández Echeagaray, mi esposa,
Quién alienta mi corazón, y a pesar de la distancia, ha dado una nueva esperanza, y
un nuevo horizonte y contenido a mi vida.**

En memoria al Dr. Alejandro Bayón Caso

**De quién cordialmente aprendí que la Ciencia, el Hombre, y la Naturaleza son los
motivos de nuestra existencia.**

Testimonios de Agradecimiento.

Agradezco a Carmen y Gonzálo por la dirección, el apoyo, y sobre todo, por la paciencia siempre necesaria para sobrellevarme.

A Eva por el trabajo y la amistad que compartimos.

A la Dra. Sofía Díaz por su ejemplo, apoyo e integridad.

A los Drs. León Cintra, Flavio Mena, Carlos Valverde, y Horacio Merchant por estos largos años de ejemplo, apoyo y orientación.

Mi especial gratitud a Julieta, Luz María, María Elena y Luis, de quiénes recibí lecciones diarias, mientras compartían su saber con mi ignorancia.

Agradezco al Maestro Nestor Arvizu y al Dr. Manuel Salas quienes siempre confiaron en mí, incluso durante los momentos de locura.

Finalmente, mi infinito agradecimiento a Gerardo, quién además de proveer gentilmente de animales a nuestros experimentos, siempre me brindó un comentario de aliento y optimismo, y a José quién, con paciencia infinita y siempre con una sonrisa, me ayudó a preparar las figuras incluidas en este y en otros trabajos.

Resumen

La prolactina (PRL) es una hormona protéica cuya forma molecular predominante posee un peso molecular de 23 kDa. Se ha propuesto que la PRL podría ejercer sus efectos biológicos tanto directamente como a través de su procesamiento enzimático hacia variantes moleculares con actividades biológicas específicas. A éste respecto, se ha demostrado que el fragmento amino-terminal de 16 kDa de peso molecular de la PRL (PRL 16 kDa) producido a partir de la proteólisis enzimática de esta hormona, inhibe la angiogénesis a través de un receptor específico. También se ha documentado que la PRL 16 kDa estimula la natriuresis en la rata, y que membranas aisladas del riñón contienen sitios de unión específicos y de alta afinidad para este fragmento hormonal. El hecho de que estos efectos no sean evocados por la PRL íntegra, y que su mediación involucre la activación de receptores propios sustentan a la PRL 16 kDa como un regulador fisiológico de la angiogénesis, natriuresis y otras posibles funciones.

Debido a que se sabe poco en relación a la producción endógena de la PRL 16 kDa, en el presente trabajo se utilizaron sueros hiperinmunes contra este fragmento hormonal en combinación con técnicas de inmunocitoquímica con el objeto de identificar sus posibles fuentes de producción en la hipófisis y en el cerebro de rata. Nuestros resultados demostraron la presencia de material inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa en los lactotropos adenohipofisarios, así como en la neurohipófisis y en las neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos, el paraventricular y el supraóptico, cuyas proyecciones constituyen la vía hipotálamo-neurohipofisaria. Estudios preliminares sugirieron también que la producción del material inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa, al menos en el núcleo paraventricular, pudiera estar regulada por los estrógenos durante el ciclo estral. Las observaciones de esta tesis fueron seguidas por trabajo experimental realizado en nuestro laboratorio que demostró que el antígeno hipotalámico inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa posee una masa molecular aproximada de 14 kDa. Asimismo, se documentó que esta proteína inhibe la angiogénesis *in vitro*, y por tanto, muestra algunos efectos biológicos similares a los de la PRL 16 kDa. Asimismo, en apoyo a la naturaleza tipo PRL de este antígeno, se demostró la expresión del gen de la PRL en núcleos paraventriculares aislados.

En resumen, nuestros resultados permiten considerar la hipótesis de que el sistema hipotálamo-neurohipofisario expresa fragmentos moleculares de la PRL con significado funcional.

Introducción

La prolactina (PRL) es una hormona proteica producida principalmente por los lactotropos localizados en la glándula hipófisis de los vertebrados. Variantes poliméricas, monoméricas y procesadas por proteólisis enzimática de esta hormona han sido identificadas en extractos de diferentes tejidos y en fluidos fisiológicos a saber: en el suero, la leche, el líquido amniótico, el fluido folicular ovárico, y el semen (19, 25, 31, 32, 58, 92, 96, 104, 106, 124, 125, 131, 169, 171, 184, 192, 206). En condiciones normales, la variante estructural de la PRL mas abundante en la rata, posee un peso molecular de 23 kilodaltones (23 kDa) y una secuencia primaria constituida por 197 aminoácidos (31, 99, 104, 157). Si bien se ha documentado que la PRL 23 kDa regula distintas funciones a lo largo de la escala de los vertebrados (ver adelante), el significado biológico de otras variantes de la PRL es aun controversial. No obstante esto, investigaciones recientes han documentado que el fragmento amino-terminal de 16 kDa de la PRL de menor peso molecular denominado como PRL 16 kDa, además de poseer efectos mitogénicos y lactogénicos similares a los de la PRL 23 kDa (25), inhibe la formación de vasos sanguíneos (29, 68).

En años recientes nuestro laboratorio se ha dado a la tarea de identificar y caracterizar a la PRL 16 kDa endógena en roedores. Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra PRL 16 kDa, Torner (197) identificó proteínas con masas moleculares de 14 y 16 kDa en el suero y la adenohipófisis de la rata. En complemento a estos estudios, el presente proyecto fue diseñado con el objeto de identificar posibles sitios de producción de la PRL 16 kDa endógena mediante el uso de ensayos de inmunocitoquímica.

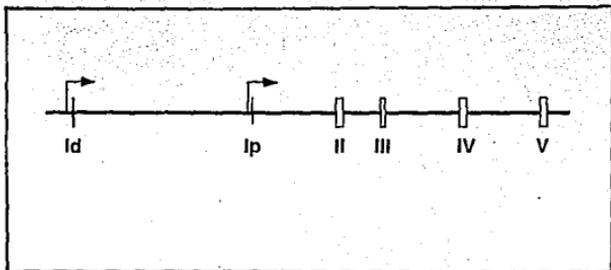
ANTECEDENTES

Generalidades de la PRL

a) Estructura del gen de la PRL

La PRL es codificada por un gen localizado en los cromosomas 6, 17 y 23 en el ser humano, la rata, y en los bovinos, respectivamente (31, 78, 98, 155, 157, 210). En los humanos, el gen de la PRL comprende una secuencia de 15 kilobases que contienen al extremo 5'-terminal, 5 exones, cuatro intrones, y al extremo 3'-terminal (31, 78, 99, 115, 135). En términos generales, el extremo 5'-terminal del gen de la PRL contiene dos promotores uno localizado en la región proximal (posición -422) al sitio de iniciación de la transcripción (31, 182), y otro distal, localizado a 7.3 kb del exon I (31, 182) (Fig. 1). El extremo 5'-terminal de gen de la PRL también contiene dos regiones amplificadoras, localizadas proximal (-292 a -38) y distalmente (-1713 a -1495) al sitio de transcripción inicial (17, 40, 55). Estas regiones contienen secuencias que al ser activadas por factores de transcripción, segundos mensajeros, y/o hormonas, facilitan y amplifican la transcripción del ARN mensajero para la PRL (16, 24, 38, 40, 91, 59, 60, 72, 109, 116, 117, 178, 188, 190). La transcripción del gen de la PRL no solamente puede ser amplificada sino también inhibida por secuencias de bases localizadas en posiciones proximales y distales al sitio de transcripción inicial en el extremo 5'-terminal. Estas secuencias median los efectos inhibitorios de los glucocorticoides y de variantes moleculares del factor de transcripción PIT-1 sobre la transcripción de la PRL (39, 101, 188).

Como se mencionó anteriormente, la secuencia del gen de la PRL que codifica para la proteína está constituido por 5 exones y 4 intrones en el humano (31, 99, 135) (Figura 1). El exon I está formado por 56 pares de bases que contiene la región encargada de la regulación de la expresión del gen (31, 99, 135). El exon II codifica la secuencia de aminoácidos del péptido señal, y contiene los primeros 40 codones de la proteína madura. Dichos codones parecen determinar una de las secuencias de aminoácidos responsables de la actividad lactogénica de la PRL. El exon III codifica para los aminoácidos 41 a 76 en la



a

Met + Asn + Ser + Cln + Val + Ser + Ala + Arg + Lys + Ala + Gly + Thr +
 5' TCC CAG TGG TGA T CAC CA TGA CCA CCCC AAG CTG CAC CCCC GCG AAT CCG GGG CA
 3' AGGGT CACCAGT ACTGGT ACTGTG CCGTTCACAGTTCAGCCCGGCTTCTGCTCCTGT

Leu + Leu + Leu + Leu + Met + Met + Ser + Asn + Leu + Leu + Phe + Cys + Cln + Asn + Val + Cln + Thr + Pro + Val +
 CTCCTCCCTGCTGATGATGCAAACTCTCTGTCGCAAAAATGGCCAGACCTGCCAGTC
 GAGGAGGACGACTACAGTITGGGAAGCAAGACGGTITACACGCTGCGGAGGGTTCAG

Cys + Ser + Cln + Cln + Asp + Cys + Cln + Thr + Pro + Leu + Pro + Cln + Leu + Phe + Arg + Val + Val + Met + Leu +
 CTCCTCCCTGCTGATGATGCAAACTCTCTGTCGCAAAAATGGCCAGACCTGCCAGTC
 ACAAGACCACCGCTGACGGTCTGTGGAGAGGGCCCTCGCAAACTGCCACAGTACGAA

Ser + His + Tyr + Ile + His + Thr + Leu + Tyr + Thr + Asp + Met + Phe + Ile + Cln + Phe + Asp + Lys + Cln + Tyr + Val +
 CTCACATCATCCATACCCTGTATCAGATATGTTTATTCGAATTCATAAACAAGTATGTC
 AGAGTGAATGATGAGGATGGGACATATGCTATACAAATAAATAAATATTTGTCATACAG

Cln + Asp + Arg + Cln + Phe + Ile + Ala + Lys + Ala + Ile + Asn + Asp + Cys + Pro + Thr + Ser + Ser + Leu + Ala + Thr +
 CAAAGATCGTIGAGTITATTCGCAAGGCCATCAAAGACGCCCCACTTCTCCCTAGCTACT
 GTTCTAGGCACITAAAATAACGGTCTCGGGTACTGACGGGGTGAAGAAGGGGATCGATGA

Pro + Cln + Asp + Lys + Cln + Cln + Ala + Cln + Lys + Val + Pro + Pro + Cln + Val + Leu + Leu + Asn + Leu + Ile + Leu +
 CCTGAAACAAAGGAAACAAGCCACAGAAGTCCCTCCGGAAGTCTTTTGAACCTGATCCCT
 GGACTCTGTTCTCTGTTGGTCTCTCAGGGAGGCCCTCAAGAAAACITGGACTAGGAG

Ser + Leu + Val + His + Ser + Asp + Asn + Asp + Pro + Leu + Phe + Cln + Leu + Ile + Thr + Cln + Leu + Cln + Cln + Ile +
 AGTITGGTGCACCTCCGGAATGACCCCTCTGTTTCAACTAAIAACITGGACTAGTGGAAATC
 TCAAACCAGTGGAGGACCTTACTGGGAGACAAAGTTCGATATTCGACTGATCCACCTTAG

His + Cln + Ala + Pro + Asp + Ala + Ile + Ile + Ser + Arg + Ala + Lys + Cln + Ile + Cln + Cln + Cln + Asn + Lys + Arg +
 CACTGAACTCTGATGCTATCATACAAAGCCAAAGAGATGAGGAAACAACAAGGAGG
 GATCTTGAGTGACTACGATAGTATAGTCTCGGTTCTCTTAACCTCTTGTITGTTCCCT

Leu + Leu + Cln + Cln + Ile + Cln + Lys + Ile + Ile + Ser + Cln + Ala + Tyr + Pro + Cln + Ala + Lys + Cln + Asn + Cln +
 CTTCTGAAAGGGATTCGAAAAGATAATAGCCAGCCCTATCTCGAAGCCAAAAGAAAATGAG
 GAAGAAATCTCTAACTTTCTAATAATCGGTCGGATAGGACTCGGTTCTCTTACTCT

Ile + Tyr + Leu + Val + Asp + Ser + Cln + Leu + Pro + Ser + Leu + Cln + Cln + Val + Asp + Cln + Cln + Ser + Lys + Asp +
 ATCTACTTGGTITGGTCAACAATCCCACTCCCTGCAAGGAGTTCATCGAAGATCCCAAGAC
 TAGATGAACCAAAACCACTGTTGGGCTAGGGACCTCTCAACTACTTCTTAGGTTTCTG

Leu + Ala + Phe + Tyr + Asn + Asn + Ile + Arg + Cys + Leu + Arg + Arg + Asp + Ser + His + Lys + Val + Asp + Asn + Tyr +
 ITGGCTTTTATAACAACATTCGGTGCCTCGCGAGGGATCCCAACAGGTTCACAATTA
 AACCGAAAAATITGTTGTAAGCCACGCAACCGCTCCCTAAGGGTGTITCAACCTGTTAATA

Leu + Lys + Phe + Leu + Arg + Cys + Cln + Ile + Val + His + Lys + Asn + Asn + Cys + Phe +
 CTCAGTCTCTGAGATCCCAATCTCTCATAAAACAACCTCTTAAACCTTACATTCATTC
 GAGTTCAGGACTCTACGGTATAACAGGATATTTGTTGACGATTCGGATGAAAGTAAAGG

ATGTACATCTGAGATGTTCTTAAAACTCTATTTCTTCAAAGGTTCTATTTGCAATCAAC
 TACATGTAGACTCTACAAGAATTTACATAAAGAAGTTTCCAAGTAAACCGTAATGTTG

b

TTTACGACATGCTT..... 3'
 AAAGTCGTTACGAA..... 5'

Figura 1

Estructura del gen de Prolactina

- a)** El gen de la PRL humana esta constituido por 5 exones (rectángulos) y 4 intrones que codifican para la proteína integra. Además, este gen posee dos promotores en el extremo 5', que dirigen su transcripción en diferentes tejidos. El promotor proximal (Ip) es utilizado por los lactotrofos en la adenohipófisis, mientras que el promotor distal (Id) es empleado por las células de la decidua y los linfocitos (Tomado de la ref. 31).
- b)** Secuencia de nucleótidos del gen de la PRL de rata que predice la secuencia de aminoácidos correspondiente a la pre-PRL (Tomado de la ref. 78)

secuencia primaria de la hormona. Esta secuencia de aminoácidos ha sido asociada a la formación del sitio de reconocimiento con el receptor. El exon IV codifica para los aminoácidos 77-136 y el V codifica para la secuencia final de aminoácidos que se extiende entre las posiciones 137 a 139. Las secuencias de aminoácidos codificadas por los exones IV y V le confieren estabilidad conformacional a la PRL. Así mismo, el exon V también parece codificar una secuencia de aminoácidos responsable de la interacción de la hormona con los receptores que median sus efectos mitogénicos, y posee el codón de terminación y la señal de poliadenilación. Recientemente, se ha descrito en el gen de la PRL placentaria un sexto exon que se localiza a 5.3Kb del exon I hacia el extremo 5'-terminal. Este exon codifica secuencias que no se traducen, y que solo aparecen en el ARN mensajero de la PRL placentaria (85, 135)

b) Secuencia de aminoácidos y relación estructura y función de la PRL.

En general, en los mamíferos el gen que codifica la secuencia de aminoácidos de la PRL se transcribe hacia una proteína constituida por 197-199 aminoácidos, y con una masa molecular aproximada de 23 kilodaltones (PRL 23 kDa) (Fig. 2) (e.g. 99). La secuencia primaria de esta hormona contiene seis dominios estructurales constituidos por 34 aminoácidos que son altamente conservados en la escala filogenética, sugiriendo que estos dominios son responsables de las acciones fisiológicas comunes para las PRLs en distintas especies de mamíferos (184, 210, 211, 212). Por otro lado, la secuencia primaria de la PRL 23 kDa también contiene 6 residuos de cisteína (posiciones 4, 9, 56, 172, 189, y 177 en la PRL 23 kDa de la rata; posiciones homólogas se han descrito en la PRLs 23 kDa en otros vertebrados) (78, 157, 211, 210, 212, 184) que al unirse forman tres enlaces disulfuro, indispensables para mantener la configuración terciaria y la bioactividad de la hormona madura (78, 174, 184) (Fig. 2). Recientemente, se ha sugerido que la estructura terciaria de la PRL 23 kDa consiste de cuatro alfa hélices antiparalelas (2, 174); esta estructura helicoidal se pliega formando dos asas menores conformadas por 4-7 residuos aminoácidos

en los extremos amino y carboxilo terminales, y un asa de mayor tamaño en la secuencia intermedia formada por 115 residuos aminoácidos (Fig. 2).

Previamente, se han realizado esfuerzos para correlacionar distintas regiones de la secuencia de la PRL con acciones fisiológicas específicas ejercidas por esta hormona. Con base a las secuencias publicadas de distintas PRLs en los vertebrados, Nicoll et. al. (142) sugirieron que al menos cuatro dominios de aminoácidos, designados como p1, p5, p6, y p9, pudieran determinar la actividad lactogénica de la PRL. Sin embargo, mutaciones puntuales dirigidas a los dominios p1, p5 y p6 de manera independiente no logran disminuir la actividad lactogénica de esta hormona (112,113). Por otro lado, se ha propuesto que la región contenida entre los aminoácidos 80 y 137 en la secuencia primaria, es esencial para mantener los efectos lactogénicos y mitogénicos de la PRL (174). Mutaciones dirigidas hacia los aminoácidos tirosina y fenilalanina ubicados en las posiciones 28 y 50, respectivamente, son indispensables para mantener los efectos mitogénicos de la PRL sobre los linfocitos NB2 en cultivo (112, 113). También ha sido sugerido que los residuos histidina localizados en las posiciones 27 y 30 forman parte del sitio de unión de la PRL con sus receptores (112, 113).

c) Heterogeneidad estructural de la PRL.

Polímeros de la PRL.

Variantes de la PRL con una masa molecular mayor a la de la PRL 23 kDa han sido identificadas en el plasma de distintas especies de mamíferos (31, 32, 169, 184). Estas variantes parecen ser agregados de la PRL 23 kDa estabilizados por uniones covalentes y enlaces disulfuro (31, 184). Aunque se han descrito una variedad de agregados de la PRL con masas moleculares diversas, quizás las que mayor atención han recibido son las variantes poliméricas conocidas como la PRL grande (45 kDa) y la PRL grande-grande (85 kDa) (169). Si bien en condiciones normales estas variantes constituyen un porcentaje reducido de la prolactina total circulante, se ha documentado que su proporción se modifica durante distintos estados fisiológicos, o bien durante el desarrollo de patologías endocrinas o

psiquiátricas (92, 104, 160, 169). Por ejemplo, se ha reportado que si bien la PRL grande y la PRL 23 kDa son las variantes que predominan en el suero de mujeres durante el primer trimestre del embarazo, cuando la gestación alcanza el tercer trimestre los niveles plasmáticos de la PRL grande disminuyen significativamente (104). Una disminución de las concentraciones plasmáticas de las PRLs grande-grande y grande también se ha reportado durante la primera semana postparto (92). En algunos padecimientos tumorales adenohipofisarios como los macroprolactinomas, las PRL grande-grande y grande incrementan su concentración en el plasma a tal grado que incluso llegan a ser responsables del 90% de la inmunoreactividad total a la PRL observada en el suero (106, 171). El tratamiento con antagonistas dopaminérgicos de tipo del lisuride, disminuye la concentración plástica de la PRL grande, e incrementa la concentración de la PRL 23 kDa (131). Variaciones estacionales de los polímeros de la PRL también han sido reportadas en los carneros (192).

No obstante la demostración de que los polímeros de la PRL varían sus concentraciones plasmáticas bajo ciertos estados fisiológicos o patológicos, y después del tratamiento con agonistas dopaminérgicos, el significado biológico de estos polímeros no es del todo claro. Se ha demostrado, sin embargo, que algunas variantes poliméricas de la PRL poseen actividad biológica en los bioensayos para la PRL 23 kDa. La PRL grande, por ejemplo, posee efectos mitogénicos, aunque con potencia reducida en comparación con la PRL 23 kDa, sobre linfocitos NB2 en cultivo (169, 184).

Formas monoméricas de la PRL.

Las variantes monoméricas de la PRL comprenden tanto a la PRL 23 kDa, como a formas de esta última que han sido glicosiladas, fosforiladas, deamidadas, o sulfadas posttraduccionalmente (31, 32, 184, 169). La PRL 23 kDa constituye alrededor del 80% de la PRL total circulante (184), y se produce principalmente en la adenohipófisis. Esta variante ha sido extensamente estudiada y, además de su papel como factor regulador de la producción y secreción de leche, participa en otras funciones que van desde la regulación de

procesos de diferenciación y multiplicación celular hasta la modulación de conductas reproductivas (140, 141). Por otro lado, la PRL 23 kDa puede ser modificada postraduccionalmente dando origen tanto a las variantes poliméricas descritas anteriormente, como a las otras variantes monoméricas y procesadas que se describirán a continuación (31, 169, 184).

La PRL glicosilada posee un peso molecular de 25 kDa y constituye alrededor de 13-25% de la PRL en la hipófisis, y se le ha detectado en el suero y en el líquido amniótico (31, 32, 169, 184). La molécula de la PRL parece ser glicosilada en una secuencia concenosa constituidas por los aminoácidos asparagina, alanina y serina (32, 36, 169, 184). Ha sido sugerido que la glicosilación ocurre específicamente en el residuo asparagina localizado en la posición 31. Estudios previos han demostrado que la PRL glicosilada posee efectos mitogénicos sobre las células epiteliales del buche de pichón in vitro (169, 184). Así mismo, la PRL glicosilada promueve la síntesis de caseína en el epitelio mamario en cultivo (184). Todas estas acciones, sin embargo, ocurren con una potencia menor que la de la PRL 23 kDa.

La variante fosforilada de PRL, por otro lado, representa alrededor del 20% del total de la PRL circulante en la rata (19, 96, 169, 184). La fosforilación de la hormona parece ocurrir en los residuos serina localizados en las posiciones 26, 34 y 90 en la secuencia primaria de PRL 23 kDa (19, 96, 169, 184). Ha sido demostrado que la posición de estos sitios de fosforilación está conservada filogenéticamente (19, 96). Aunque aún no se tiene certeza acerca de la(s) función(es) de la PRL fosforilada, reportes recientes sugieren que la condición de fosforilación de la hormona pudiera modular sus efectos sobre la proliferación de los linfocitos NB2 en cultivo y sobre células adenohipofisarias de la línea GH3 (96).

Variantes cortadas de la PRL.

En fechas recientes, también se ha documentado que la PRL 23 kDa puede ser procesada en la adenohipofisis, la glándula mamaria, el hígado, el riñón, el pulmón, el bazo, el ovario, la próstata, y el cerebro (Fig. 3) (11, 28, 31, 45, 145, 147, 209), hacia una variante

Cuadro 1

Variantes de PRL 23 kDa y algunos de sus efectos biológicos (Tomado de ref. 84)

Variante	Propiedades fisiológicas
PRL 21 kDa	Actividad mitogénica en el ensayo de buche de pichón
PRL 25 kDa	"
PRL 22 kDa (Kalicreína)	Desconocidas
PRL cortada	Actividad mitogénica sobre tirotropos, gonadotropos, linfocitos NB2 y epitelio mamario
PRL 16 kDa	Actividad mitogénica y lactogénica sobre el epitelio mamario Inhibición de la angiogénesis Natriuresis
Desamidada	Actividad mitogénica en el ensayo de buche de pichón
Glicosilada	Actividad mitogénica en el ensayo de buche de pichón Síntesis de caseína Actividad mitogénica en linfocitos NB2
Fosforilada	Modulación de los efectos mitogénicos de la PRL
Sulfatada	Desconocidas
Dímeros y oligómeros	Desconocidas
Polímeros	Actividad mitogénica en linfocitos NB2

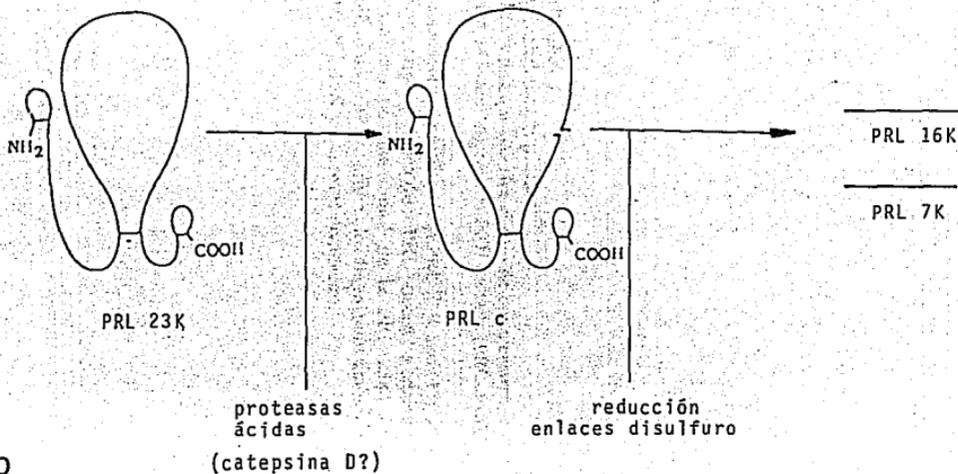
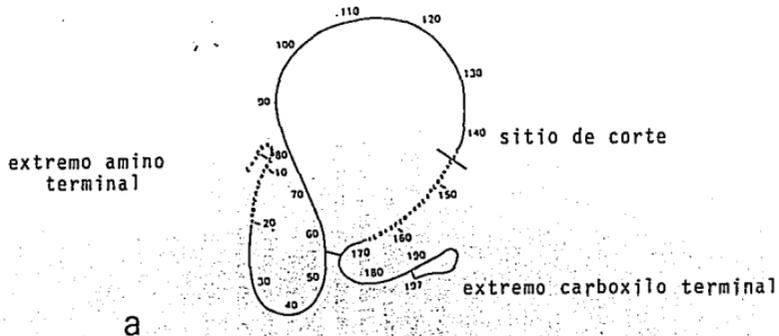


FIGURA 3

Procesamiento proteolítico de la prolactina

- a) Representación esquemática de la PRL de la rata que muestra el sitio de corte enzimático entre los aminoácidos tirosina 145 y leucina 146 que origina a la PRL cortada (PRLc) (b), precursor inmediato de la PRL 16K.
- b) Esquema que ilustra las etapas del procesamiento enzimático de la PRL 23K hacia PRLc, y de esta hacia PRL 16K y PRL 7K. Distintos órganos blanco de la PRL poseen las enzimas necesarias para llevar a cabo el procesamiento postraduccionnal de la PRL 23K. La subsecuente reduccion de los enlaces disulfuro de la PRLc, origina los fragmentos amino- y carboxilo-terminales que corresponden a las PRL 16K y 7K, respectivamente.

de 25 kDa conocida como PRL cortada, cuya asa mayor esta escindida entre los aminoácidos tirosina 145 y leucina 146 (5). Aunque las enzimas que cortan a la PRL 23 kDa no han sido plenamente identificadas, se ha sugerido que la catepsina D (12), las proteasas de serina y aspartato, así como algunas metaloenzimas (11), pudieran ser responsables de su procesamiento. La PRL cortada ha sido identificada en el plasma de humanos y roedores mediante técnicas de inmuno-análisis Western (184, 197). Estudios recientes han demostrado que la PRL cortada, además de poseer acciones mitogénicas tipo PRL 23 kDa sobre las células epiteliales mamarias y los linfocitos NB2 en cultivo, y sobre las células epiteliales del buche de pichón in vivo (135, 184), estimula la proliferación de gonadotropos y tirotropos adenohipofisarios (5). Este último efecto no es observado con la PRL 23 kDa, lo que apoya que la PRL cortada posee funciones independientes de las de la PRL 23 kDa (5).

Por otro lado, ha sido demostrado que la reducción subsecuente de los enlaces disulfuro que mantienen unida a la PRL cortada libera dos péptidos, uno amino-terminal con una masa molecular de 16 kDa o PRL 16 kDa, y otro carboxilo-terminal con una masa molecular de 7 kDa (Fig. 3)(25, 28, 124, 125). Estudios recientes han documentado que la PRL 16 kDa posee efectos mitogénicos, aunque con potencia menor o semejante que la PRL 23 kDa, sobre las células epiteliales del buche de pichón *in vivo* y sobre linfocitos NB2 *in vitro*, y lactogéncias y mitogénicas sobre el epitelio mamario en cultivo (25). Adicionalmente, la PRL 16 kDa posee potentes efectos antiangiogénicos (29, 68), no observados con la PRL 23 kDa, y que parecen ser mediados por receptores específicos localizados en las membranas de las células endoteliales (27).

d) Sitios de producción de la PRL.

La PRL es producida principalmente por células especializadas en la adenohipófisis denominadas lactotropos (Fig. 4). Estas células se encuentran uniformemente distribuidas en la adenohipófisis, y constituyen aproximadamente del 30 al 50% del total de células en la glándula, dependiendo del estado fisiológico y del sexo (102). Si bien la población de

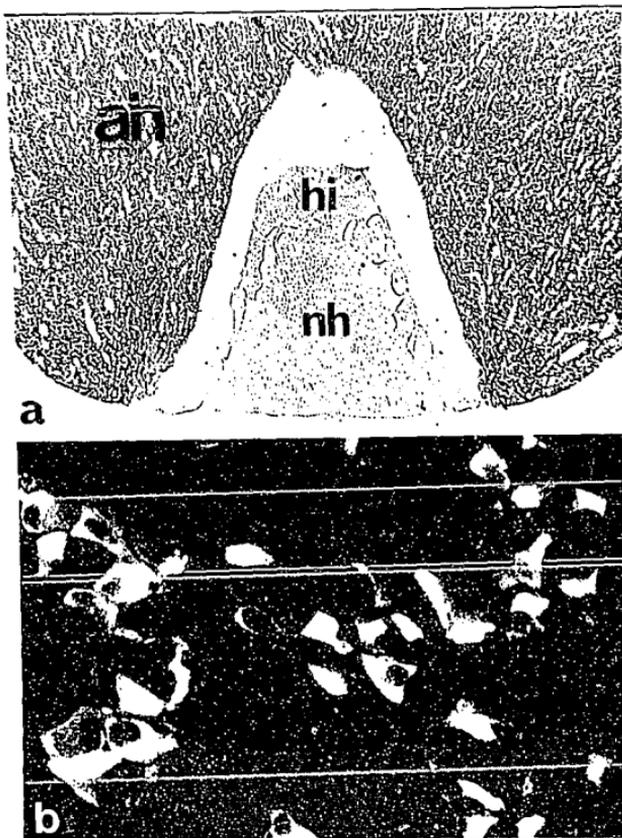


FIGURA 4

Anatomía de la glándula hipófisis

a) Corte transversal de la hipófisis de la rata teñida con el suero anti-PRL 23 kDa en la que se observan las divisiones anatómicas de esta glándula. El lóbulo anterior o adenohipofisis (AH), que contiene a los lactotrofos responsables de la secreción de la PRL. El lóbulo intermedio (HI) que presenta células asociadas a la producción de hormonas derivadas de la pro-opiomelanocortina. El lóbulo posterior o neurohipófisis (NH) que concentra la terminales nerviosas de las neuronas magnocelulares hipotalámica. Foto cortesía de Salvador Mejía, Centro de Neurobiología (UNAM).

b) Fotomicrografía que ilustra lactotrofos adenohipofisarios immuno-reactivos a la PRL 23 kDa, y teñidos con técnicas de inmunofluorescencia.

lactotropos parecería ser un grupo celular homogéneo, se ha documentado que existen al menos tres subtipos de lactotropos con características morfológicas distintivas (Cuadro 2). Así mismo, los lactotropos no solamente muestran heterogeneidad morfológica sino funcional; esta heterogeneidad funcional se manifiesta por diferencias en la velocidad de recambio de la PRL sintetizada, en la cantidad de hormona almacenada, y en su capacidad para secretarla (135, 202, 204).

Fuentes extrahipofisarias de la PRL han sido identificadas en los sistemas reproductor, inmunológico, nervioso. Se ha reportado la producción de PRL con características inmunoquímicas y de bioactividad semejantes a las de la PRL hipofisaria en el estroma del endometrio decidual y en el miometrio (74-76, 80, 186, 194) en la rata. El ARN mensajero que codifica para la PRL también ha sido detectado en ambos tejidos uterinos (194). Así mismo, en el sistema inmunológico los linfocitos y monocitos parecen ser la principal fuente de producción de la PRL (53, 71, 127-130). Se ha demostrado que estas células expresan el ARN mensajero de PRL, y que la PRL producida ellas posee efectos mitogénicos y lactogénicos semejantes los de la PRL hipofisaria (127-130). En el cerebro, material inmuno-reactivo a la PRL ha sido consistentemente detectado en neuronas y tractos nerviosos hipotalámicos, mediante técnicas de inmunocitoquímica (70, 81, 82, 84, 144, 159, 181, 183, 195, 196, 199). Inmuno-análisis Western y cromatográficos han identificado también material con inmuno-reactividad a PRL en homogenados de la médula espinal, el tallo cerebral, y del hipotálamo, así como en el líquido cefaloraquídeo de la rata (46-48, 61-63). Se ha demostrado que el material inmuno-reactivo a la PRL obtenido después del fraccionamiento cromatográfico de distintas áreas cerebrales poseen efectos mitogénicos, aunque con una potencia menor que la de la PRL hipofisaria, sobre linfocitos NB2 en cultivo (61-63), y que su liberación es dependiente de calcio (50). Recientemente se ha sugerido que la PRL de origen hipotalámico pudiera estimular la liberación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (LHRH) por neuronas LHRHérgicas hipotalámicas (9), y la proliferación de astrocitos (43, 44) *in vitro*. Los mapas de digestión trípica de las formas predominantes

Cuadro 2.
Clasificación ultraestructural y morfología de los lactotrofos

TIPO	Forma	Radio núcleo/citoplasma	Organelos	Tamaño del gránulo secretorio
Lactotrofo tipo I	Célula pequeña de forma oval o triangular con prolongaciones citoplásmicas en espiga.	Alto	Pobrementemente desarrollados	100nm
Lactotrofo tipo II	Célula grande y redondeada con prolongaciones citoplásmicas finas que rodean a los gonadotrofos	Moderado	Numerosas mitocondrias y abundante retículo endoplásmico rugoso	100-300nm
Lactotrofo tipo III	Célula grande de forma irregular	Reducido	Abundantes	pleomórficos 600-900nm

de la PRL en la hipófisis y el cerebro son esencialmente idénticos (49). Finalmente, el transcrito que codifica para PRL ha sido detectado en homogenados de distintas regiones del cerebro de la rata (30, 41, 64, 179, 201, 208).

Otro órgano en el que se ha detectado el transcrito para PRL es la glándula mamaria (107, 191). Estudios recientes han demostrado, mediante hibridación *in situ*, en Northern, y con la técnica de transcripción reversa/reacción en cadena de la polimerasa, la presencia de ARN mensajero que codifica para la PRL en las células del epitelio acinar mamario durante el embarazo y la lactancia (107, 191). La secuencia del ARN mensajero expresado en epitelio mamario es idéntica a la del transcrito que codifica para PRL en la glándula hipófisis y, a diferencia de lo que ocurre en las células del estroma uterino y en células del sistema inmune, su transcripción parece involucrar el mismo promotor utilizado por los lactotropos (107, 191).

e) Regulación de la síntesis y secreción de la prolactina.

La regulación de la síntesis y secreción de la PRL involucra distintos mecanismos que actúan tanto a nivel de la transcripción y traducción de su mensaje, como sobre su proceso de secreción. La mayor parte de nuestro conocimiento acerca de los mecanismos de regulación de la producción y secreción de la PRL deriva de estudios fisiológicos y farmacológicos que han evaluado los efectos de distintos agentes sobre la función adenohipofisaria *in vivo*, o bien sobre los lactotropos cultivados. Si bien estos estudios han permitido identificar distintos factores ambientales, factores hormonales hipotalámicos, ováricos y derivados de la glándula suprarrenal, y factores paracrin y autocrinos (Cuadro 3) que, actuando de manera orquestada, controlan la producción y secreción adenohipofisaria de PRL, poco se sabe acerca de los mecanismos de regulación de la producción de PRL en las fuentes extrahipofisarias. También existe escasa información acerca de los mecanismos que regulan la producción de las distintas formas de PRL, aunque en estudios recientes se ha sugerido que dopamina y TRH pudieran influenciar el cociente de producción de las distintas variantes de la PRL en la hipófisis (106, 118, 131, 171).

Los factores externos que afectan la producción y liberación de la PRL hipofisaria pueden ser generales como el estado nutricional, y los ritmos circádicos y estacionales, o bien, estar asociados a estados fisiológicos específicos como la respuesta general de alarma, la estimulación cervico-uterina durante el coito o el parto, y la estimulación multisensorial durante la lactancia (6, 15, 89, 118, 121). Estos estímulos influyen sobre la producción y secreción de la PRL, a través de su acción sobre distintos mecanismos neurales que modifican la función hipotalámica y la liberación de sus factores de regulación endocrina (6, 98).

Las hormonas diversas liberadas por el hipotálamo ejercen acciones inhibitorias o estimulantes sobre la producción y secreción de la PRL (98). De estos factores, quizás el mejor estudiado es la dopamina; una catecolamina que ejerce acciones inhibitorias o estimulantes sobre la transcripción y liberación de prolactina dependiendo del estado funcional del lactotrofo, y de la presencia o ausencia de co-factores endógenos (31, 98, 135). La dopamina parece inhibir la liberación de la PRL actuando tanto a nivel de la transcripción, como a nivel de la secreción, a través de reducir los niveles intracelulares de AMPc, calcio, y fosfatos de inositol (31, 98, 135). Otros factores hipotalámicos tales como el ácido gama-amino butírico, la somatostatina, la hormona estimulante de los melanocitos, y más recientemente, el péptido asociado a la hormona liberadora de gonadotropinas han sido también implicados en la inhibición de la secreción de la PRL (31, 98, 135) (Cuadro 3). Por otro lado, distintos factores hipotalámicos estimulan la transcripción y la secreción de la PRL en la adenohipófisis. La hormona tirotropina, por ejemplo, parece estimular la producción y secreción de la PRL en el lactotrofo incrementando la transcripción, estabilizando su ARN mensajero, y fomentando su liberación por un mecanismo que parece depender de AMPc (31, 98, 135). Otros factores hipotalámicos que se ha demostrado estimulan a liberación de la PRL son el péptido intestinal vasoactivo, la serotonina, y algunos péptidos opioides (31, 98, 135) (Cuadro 3).

Factores endocrinos periféricos también participan en la regulación de la producción y secreción de la PRL hipofisaria. Se ha documentado, por ejemplo, que los glucocorticoides suprarrenales inhiben la producción de PRL en la adenohipofisis, mientras que los estrógenos ováricos, la norepinefrina suprarrenal y la insulina promueven su síntesis y secreción (31, 135). En el caso de los glucocorticoides y de los estrógenos, sus efectos sobre la transcripción del gen de la PRL parecen ser mediados por secuencias responsivas localizadas en el extremo 5' terminal de gen (101, 108) (Cuadro 3).

Por otro lado, se ha demostrado que factores autócrinos y parácrinos adenohipofisarios regulan la síntesis y secreción de la PRL. Así, el péptido intestinal vasoactivo producido por los lactotrofos y la misma PRL estimulan su producción y secreción a través de un mecanismo autócrino (31, 135). Factores parácrinos como la angiotensina II y la acetilcolina secretados por los gonadotrofos y corticotrofos, respectivamente, inhiben la síntesis de PRL (31, 135).

Finalmente, factores intrínsecos al lactotrofo regulan el proceso de liberación de la PRL almacenada en gránulos secretorios. De esta manera, se ha demostrado que la transformación tiol-disulfuro en la estructura de la PRL almacenada, además de modificar la masa molecular, la carga, y la inmunodetectabilidad de la PRL, influye en su proceso de liberación y sobre el tipo de variante de PRL liberada (88, 118). Además, dicho proceso de transformación es regulado por dopamina, y se asocia a la generación de agregados moleculares de la PRL (118). La edad de la hormona, definida a partir de su síntesis y el tiempo que transcurre almacenada en los gránulos secretorios, es otro factor que influye sobre su secreción (revisado en 31). Ha sido documentado que la dopamina inhibe fundamentalmente la liberación de la PRL sintetizada recientemente (<4 horas de haber sido sintetizada), o de la almacenada por más de 8 horas. Por otra parte, la hormona liberadora de la tirotrina estimula la liberación de la PRL que ha sido almacenada por un periodo de 4 a 8 horas.

Cuadro 3

Estímulos y factores reguladores de la producción y secreción de PRL 23 kDa

Estímulos externos

- Estimulación sensorial de los pesones durante la succión en la lactancia.
- Estimulación sensorial cervico-uterina durante el coito y el parto.
- Nutrición
- Estrés
- Ritmos diurnos y estacionales

Factores hormonales: hipotalámicos

a) *inhibidores*

- Dopamina (efecto modulado por ácido ascórbico)
- Ácido gama-amino butírico
- Endotelinas 1 y 3.
- Substancia P
- Somatostatina
- Bradiquinina
- Neurotensina

b) *estimulantes*

- Hormona liberadora de tirotropina (efecto modulado por alfa melatonina)
- Dopamina (efecto modulado por alfa melatonina)
- Péptido intestinal vasoactivo y péptidos homólogos
- Oxitocina y vasopresina
- 5-hidroxi-triptamina
- Histamina
- Glutamato
- Somatostatina
- Substancia P
- Neurotensina

Factores hormonales: periféricos

a) *inhibidores*

- Glucocorticoides
- melatonina

b) *estimulantes*

- Estrógenos
- Norepinefrina

Factores locales adenohipofisarios

- Autocrinos: Péptido intestinal vasoactivo, PRL 23 kDa (efectos estimulantes)
- Paracrinos: Acetilcolina (efecto inhibitorio; producida en corticotropos).
Angiotensina II (efecto estimulante; producida en gonadotropos).
- Fenómenos de transformación hormonal intragranular, pH intracitoplásmico e intragranular, edad de la hormona.

f) Funciones de la PRL

En los vertebrados, la PRL posee un espectro funcional excepcionalmente amplio (140, 141, 169) Entre las más de 80 acciones fisiológicas descritas para esta hormona destacan sus efectos sobre los procesos de morfogénesis (175), diferenciación, y regulación del ciclo celular, la regulación de la concentración de electrolitos séricos, y la modulación de las funciones reproductivas, inmunológicas y neurológicas (Cuadro 4). Así, además de sus funciones relacionadas con la producción de leche durante la lactancia en los mamíferos (153), la PRL ha sido involucrada en el proceso de capacitación espermiogénica, en la fecundación, e implantación del cigoto después de fecundado (86, 120, 132). La PRL es un factor mitogénico para las células epiteliales de la glándula mamaria, el epitelio del buche de pichón, los linfocitos, y los astrocitos (37, 43, 44, 79, 120). Esta característica ha sido explotada para diseñar bioensayos que evalúan tanto los efectos mitogénicos de la PRL como de sus variantes sobre linfocitos transformados NB2 y celulas epiteliales mamarias en cultivo, y sobre celulas epiteliales mamarias y del buche de pichón *in vivo*. La PRL también promueve la diferenciación de las células en la glándula suprarrenal, el páncreas y el pulmón durante la vida embrionaria, y la maduración y función de los órganos reproductores en los mamíferos (10, 33, 120, 143, 162).

Otras funciones en las que la PRL parece tener un papel regulatorio importante son en la producción de hormonas esteroides en la glándula suprarrenal, los ovarios y el testículo, y en la producción de factor surfactante en el pulmón (10, 120, 176). Por otro lado, si bien la PRL es un factor estimulante de la proliferación y diferenciación de los linfocitos, cuando esta presente en cantidades anormalmente altas inhibe la actividad fagocítica de las células mononucleares (79, 139). La PRL también estimula el crecimiento del pelo, y en algunas especies de mamíferos la pigmentación del mismo (52, 57, 120). Efectos de esta hormona sobre los niveles de calcio y sodio séricos han sido descritos en peces y mamíferos. En general, la PRL es un factor hipercalcémico e hipernatrémico (31, 120, 189). La PRL no solamente regula la concentración de electrolitos séricos sino también

Cuadro 4

Acciones Fisiológicas de la PRL 23 kDa en la escala de los vertebrados

- 1) Diferenciación celular
- 2) Morfogénesis
- 3) Metamorfosis
- 4) Lipogénesis
- 5) Balance Hidroelectrolítico
- 6) Regulación de los niveles de glucosa
- 7) Inmunomodulación
- 8) Regulación del metabolismo hepático
- 9) Regulación del crecimiento de estructuras tegumentarias
- 10) Reproducción:
 - Maduración de órganos sexuales
 - Desarrollo y crecimiento de la glándula mamaria
 - Lactancia
 - Capacitación espermiogénica
 - Fecundación e implantación del huevo
 - Efectos luteotrópicos y anti-luteolíticos
 - Acciones anti-gonadotrópicas
- 11) Conducta:
 - Construcción de nidos
 - Migración
 - Reconocimiento de crías
 - Inducción de la conducta materna
 - Facilitación de la conducta de copulación

en la leche, el líquido amniótico, el sudor y las lágrimas (31, 168, 207). La PRL regula la producción de efectores hormonales tales como la dopamina, los opioides, las gonadotropinas, la insulina, y los factores insulina tipo I y II (107, 120, 176). Así mismo, también posee funciones anabólicas sobre el metabolismo de distintos órganos (120).

La conducta reproductiva, el estrés, la conducta materna y la conducta de reconocimiento madre-cría en mamíferos, así como las conductas de migración y construcción de nidos en peces y aves parecen ser en parte reguladas por la PRL (20, 83, 105, 120, 187). Finalmente, se ha sugerido que esta hormona pudiera participar en la regulación del sueño, y en la modulación de los niveles de ansiedad en algunas especies de mamíferos (146, 170, 187).

g) Receptores y mecanismos de transducción.

Los receptores membranales para la PRL pertenecen a una familia constituida por receptores para los factores hematopoyéticos, las citoquinas, y la hormona de crecimiento (31, 93-95). El receptor para la PRL es codificado por un gen que contiene al menos 11 exones, y está localizado en el cromosoma 5 en el hombre (31). A la fecha, tres subtipos de receptores para la PRL han sido caracterizados en distintas especies de mamíferos. Estos receptores están constituidos por tres dominios estructurales referidos como intracelular, transmembranal y extracelular (Fig. 5). La secuencia de aminoácidos de los dominios extracelular y transmembranal es homóloga en los distintos receptores (31, 93-95), mientras que la secuencia de aminoácidos y la extensión del dominio intracelular difieren entre los distintos receptores (31, 93-95).

En base a su estructura, los receptores para la PRL han sido clasificados en tres subtipos dependiendo de la extensión de su dominio intracelular: Los receptores cortos están constituidos por 284-291 aminoácidos, 26 de los cuales conforman el dominio intracelular; los receptores de tamaño medio están formados por 392 aminoácidos, 57 de ellos localizados en el dominio intracelular; y los receptores largos constituidos por 591-598 aminoácidos con 262 residuos en el dominio intracelular (93-95) (Fig. 5). Recientemente, se

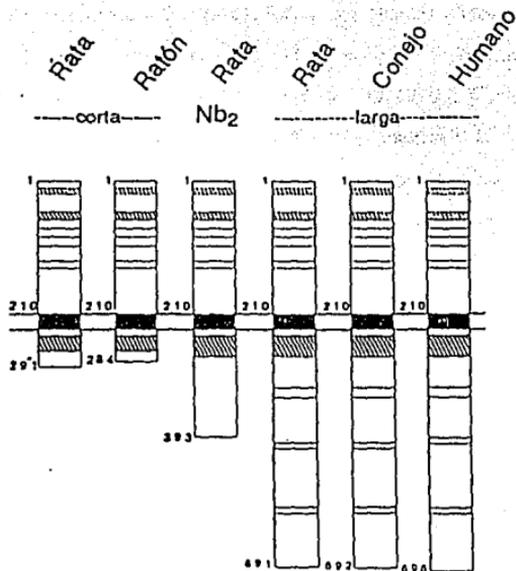


FIGURA 5

Los receptores para la prolactina

Diagrama que muestra los subtipos de receptores de membrana identificados para la PRL en distintas especies de mamíferos. Estos receptores han sido clasificados de acuerdo a la extensión de su dominio intracitoplásmico como cortos, de tamaño medio, y largos. Mientras que su secuencia de aminoácidos es semejante en el dominio extracelular, la secuencia de aminoácidos que corresponde al dominio intracelular varía tanto en extensión, como en los aminoácidos que lo forman. (Tomada de la ref. 94)

ha identificado en el ovario de la rata una forma soluble del receptor para la PRL que esta formado únicamente por el dominio extracelular y una extensión de 20 aminoácidos hacia la región carboxilo terminal (31). Se ha sugerido que esta forma del receptor es en realidad una proteína fijadora de la PRL (31), pero esta idea aun tiene que ser evaluada.

La distribución de los receptores para la PRL en los distintos tejidos ha sido evaluada mediante técnicas de inmunocitoquímica, de hibridización *in situ* y por ensayos de radio-receptor en rebanadas de tejido o en membranas aisladas (13, 14, 23, 36, 54, 56, 71, 103, 119, 126, 149, 151, 154, 205, 213). Estos estudios han demostrado la presencia de los receptores para la PRL y de su ARN mensajero en el sistema nervioso central de los mamíferos y las aves, a saber: en diversos núcleos del hipotálamicos, en la células dopaminérgicas del hipotálamo anterior y del sistema nigro-estriatal, y en los plexos coroides. La glándula mamaria y otras glándulas tanto exócrinas como endócrinas del sistema reproductor femenino poseen receptores para la PRL. Así mismo, se han descrito receptores para esta hormona en el hígado, el páncreas y el intestino, los neumocitos tipo II de epitelio pulmonar, linfocitos y monocitos del sistema inmunológico, y en las células del epitelio tubular renal. La amplia distribución de los receptores para la PRL, por tanto, es compatible con la versatilidad funcional que esta hormona posee (Cuadro 5).

En base a estudios realizados con el receptor de la hormona del crecimiento, se ha propuesto que para que la PRL pueda ejercer sus acciones, se requiere de la dimerización de sus receptores (Fig. 6) (31). Esta dimerización activa distintas vías metabólicas asociadas a diferentes sistemas de segundos mensajeros que median las acciones de la PRL sobre sus órganos blanco. Se ha documentado que los efectos de la PRL son mediados por efectores secundarios asociados a las enzimas adenilato ciclasa, ornitín descarboxilasa, proteína cinasa C, fosfolipasa A₂, Fosfolipasa C, proteínas G, y tirosina cinasa-Jak 2 (65-67, 77, 97, 110, 148, 164-166,). El estudio de la participación de estos sistemas en las diversas funciones reguladas por la PRL, sin embargo, ha sido oscurecida por el hecho de que frecuentemente mas de un mensajero secundario participan en la mediación de sus acciones en un órgano

Cuadro 5
Distribución de los receptores para la PRL en los mamíferos
(Modificado de ref. 197).

Aparato reproductor femenino

Glándula mamaria: epitelio mamario y tejido adiposo

Ovario: células de la granulosa y del cuerpo lúteo.

Útero: Epitelio decidual y miometrio.

Placenta: Células de la decidua

Aparato reproductor masculino

Testículos: Células de Leydig y espermátides

Epidídimo

Vesículas seminales

Próstata

Aparato Digestivo

Hígado

Páncreas: Células beta de los islotes de Langerhans.

Intestino: Epitelio intestinal

Sistema Nervioso

Cerebro: Núcleos hipotalámicos, substancia negra, plexos coroides

Ojo: Cubierta coroides y fotorreceptores.

Bulbo olfatorio y mucosa olfatoria durante el desarrollo prenatal.

Otros órganos y sistemas

Riñón: Epitelio tubular

Glándulas suprarrenales: Corteza adrenal.

Sistema inmunológico: Linfocitos B y T, neutrófilos, células asesinas.

blanco dado. Así por ejemplo, se ha demostrado que la actividad mitogénica de la PRL sobre los linfocitos NB2 en cultivo, pudiera ser modulada por fosfatos de inositol derivados de la actividad de la enzima ornitina descarboxilasa, y por las proteínas G (165). La actividad lactogénica de la PRL sobre las células del epitelio mamario en cultivo, por otro lado, parece ser modulada por los niveles intracelulares de AMPc y por las proteínas G (165).

Antecedentes inmediatos

Generalidades sobre la PRL 16 kDa

a) Actividad biológica tipo PRL 23 kDa.

Como ha sido referido previamente, la variante de la PRL conocida como PRL 23 kDa puede ser procesada hacia una variante cortada que al ser reducida, origina dos fragmentos uno amino terminal con una masa molecular de 16 kDa, denominada PRL 16 kDa, y otro fragmento carboxilo terminal con una masa molecular de 7 kDa. El primer reporte que sugiere que la PRL 16 kDa posee bioactividad fue publicado por Mittra (125). Este autor observó que la PRL 16 kDa derivada de la PRL cortada, a su vez aislada de homogenados de la adenohipofisis de la rata, estimulaba la proliferación del epitelio mamario de ratas anestesiadas con una potencia mayor que la de la PRL 23 kDa (125). Este resultado condujo a Mittra a proponer que la PRL 16 kDa podría mediar los efectos mitogénicos de PRL sobre el epitelio mamario (125). Estudios recientes han corroborado que la PRL 16 kDa generada mediante el procesamiento de PRL 23 kDa con enzimas de la glándula mamaria y reducción subsecuente de los enlaces disulfuro (25), posee efectos mitogénicos, aunque con una potencia menor o similar a la de la PRL 23 kDa, sobre los linfocitos NB2 y el epitelio mamario en cultivo, y sobre las células epiteliales del buche de pichón *in vivo*. Así mismo, se ha mostrado que la PRL 16 kDa también posee efectos lactogénicos sobre el epitelio mamario, aunque con una menor potencia que de la PRL 23 kDa (25).

b) Actividad biológica propia.

No obstante que la PRL 16 kDa comparte algunas acciones fisiológicas con la PRL 23 kDa, se ha demostrado que la PRL 16 kDa posee efectos específicos, no ejercidos por la

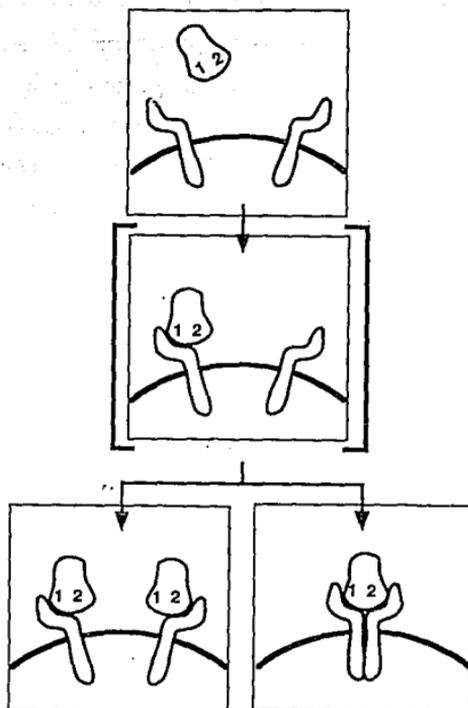


FIGURA 6

Modelo de dimerización del receptor para la PRL y la regulación de sus funciones
 Esquemas que ilustran la interacción de la PRL con sus receptores. En una primera etapa, la PRL se une a un solo receptor en la membrana celular a través de uno de sus sitios activos. Esta unión promueve, en la segunda etapa, que un segundo receptor se una al segundo sitio activo de la PRL, hecho que conduce a la dimerización del receptor. La dimerización del receptor se requiere para activarlo. En presencia de bajas concentraciones de la PRL, una mayor proporción de receptores es activada. Por el contrario, en presencia de un exceso de la PRL, la dimerización del receptor se bloquea por lo que las acciones de la hormona se inhiben. (Tomado de la ref. 31)

PRL 23 kDa, sobre la formación de nuevos vasos capilares sanguíneos, v.gr., angiogénesis. La PRL 16 kDa, más no la PRL 23 kDa, inhibe *in vitro* la proliferación y asociación de las células endoteliales derivadas de capilares cerebrales, cuando esta presente en cantidades nanomolares en el medio de cultivo (29). También se ha demostrado que la aplicación de la PRL 16 kDa a la membrana corioalantoidea del pollo interrumpe el proceso de angiogénesis *in vivo* (29). El potente efecto inhibitor de la PRL 16 kDa sobre la angiogénesis antagoniza los efectos angiogénicos de los factores de crecimiento fibroblástico y vascular (68), y parece ser mediado por receptores específicos, saturables, y de alta afinidad para PRL 16 kDa localizados en la membrana de las células endoteliales (27).

La PRL 16 kDa no solamente es un potente inhibidor de la angiogénesis sino que además parece que participa en la regulación de otras funciones. En estudios recientes se observó que la PRL 16 kDa administrada en la circulación (Clapp y Samson, resultados inéditos) de roedores incrementa la excreción renal de sodio. Debido a que sitios de unión específicos para PRL 16 kDa han sido identificados en membranas aisladas del riñón, estas observaciones sugieren que la PRL 16 kDa pudiera participar en la regulación de las concentraciones sericas de sodio *in vivo*.

Presencia Endógena.

El hecho de que la PRL 16 kDa posea efectos propios a través de la activación de receptores específicos sugiere que esta molécula pudiera ser un nuevo factor de regulación de la angiogénesis, natriuresis y quizás de otras funciones aun no caracterizadas. No obstante esta posibilidad, poco es lo que se sabe acerca de la existencia endógena de la PRL 16 kDa, en donde se produce y como se regula su síntesis y secreción. Evidencia reciente apoya, sin embargo, que la PRL 16 kDa pudiera ser producida *in vivo* en la glándula hipófisis, o bien en distintos órganos blanco de la PRL a través del procesamiento enzimático de la PRL 23 kDa. Por ejemplo, Mitra identificó material inmunorreactivo a la PRL cortada, precursor inmediato de la 16 kDa en homogenados de la glándula hipófisis (124). Así mismo, la presencia de las enzimas capaces de procesar a la PRL 23 kDa hacia la

PRL cortada ha sido documentada en distintos órganos blanco de la PRL (11, 12, 28, 45, 145, 147, 209)

Evidencia adicional que apoya la existencia de la PRL 16 kDa endógena fue obtenida recientemente en el laboratorio. Torner (198) identificó dos proteínas inmunorreactivas a la PRL 16 kDa, con masas moleculares de 16 kDa y 14 kDa, en homogenados de adenohipófisis y en la circulación de roedores. Ambas proteínas fueron detectadas mediante el uso de sueros hiperinmunes dirigidos contra la PRL 16 kDa obtenida después de la digestión de PRL 23 kDa con enzimas de la glándula mamaria y subsecuente reducción de los enlaces disulfuro (198). Las proteínas de 16 kDa y 14 kDa se observaron en el inmunoanálisis Western bajo condiciones reductoras y no reductoras, así como en presencia de inhibidores de proteasas, sugiriendo que su detección no fue producto de la proteólisis artificial de la PRL durante la obtención y manipulación de las muestras (198).

En base a las observaciones anteriores, el presente trabajo fue diseñado para tratar de identificar probables fuentes de producción de la PRL 16 kDa mediante el empleo de técnicas de inmunocitoquímica. En este sentido, la inmunocitoquímica ha sido una herramienta valiosa en la identificación de fuentes de producción y mapeo de péptidos bioactivos (18, 100, 123, 156). Los resultados obtenidos por esta técnica permiten 1) identificar los grupos celulares que pudieran ser responsables de la producción del péptido en estudio, 2) hacer inferencias sobre su posible función y sobre los mecanismos responsables de su regulación en base a la localización anatómica, y 3) identificar sitios enriquecidos en el péptido de interés que pudieran facilitar su subsecuente aislamiento y su caracterización tanto bioquímica como molecular (18, 100, 123, 156).

Objetivo

El objetivo del presente trabajo fue el demostrar, mediante ensayos de inmunocitoquímica, la presencia de antígenos tipo PRL 16 kDa endógenos, y el identificar probables sitios de su producción en la hipófisis y en el cerebro de la rata.

Porque la hipófisis?

Como se mencionó anteriormente, si bien existen fuentes alternativas de producción de la PRL 23 kDa, el lóbulo anterior de la glándula hipófisis es el principal sitio de producción de esta hormona y de sus variantes moleculares, incluidos los fragmentos de 16 kDa (198). El uso de la hipófisis también permitió establecer las condiciones y especificidad del ensayo de inmunocitoquímica.

Porque el cerebro?

Como también fue descrito previamente, existe evidencia que sugiere que el cerebro produce PRL. Estudios morfológicos previos han demostrado la existencia de material inmuno-reactivo a la PRL en el sistema nervioso central de la rata (3, 4, 70, 81, 82, 84, 144, 159, 181, 183, 195, 196, 199). Neuronas positivas a la PRL han sido identificadas consistentemente en distintos núcleos hipotalámicos, mientras fibras inmunopositivas para esta hormona se han descrito en regiones hipotalámicas y extrahipotalámicas. En apoyo a las observaciones morfológicas que sugieren la presencia de PRL en el cerebro, estudios bioquímicos e inmunoquímicos han identificado antígenos inmuno-reactivos a PRL en extractos de la médula espinal, del tallo cerebral, y del diencéfalo de la rata (46-48, 61-63). De Vito y colaboradores han mostrado que el material inmuno-reactivo a PRL es secretado por explantes hipotalámicos *in vitro*, de manera dependiente de calcio, y en respuesta a la despolarización con alto potasio (50, 51).

Por otro lado, evidencia reciente sugiere que el cerebro, en especial el hipotálamo, pudiera ser capaz de producir algunas variantes de la PRL. Emmanuele y cols. (62-64), reportaron la presencia de tres fracciones inmunorreactivas a PRL en extractos de la médula espinal, tallo cerebral y diencéfalo de la rata. Dos de estas fracciones mostraron una masa molecular aproximada de 44 kDa y 23 kDa, mientras que la fracción restante fue constituida por fragmentos de menor tamaño que no fueron identificados. En apoyo a la posibilidad de la generación de variantes de la PRL en el cerebro, De Vito (47) ha documentado la presencia de PRL cortada en el hipotálamo de rata, y la capacidad del hipotálamo para modificar proteolíticamente a la PRL 23 kDa (45).

Finalmente, es importante enfatizar que la producción de los antígenos inmunorreactivos a la PRL en el cerebro parece ser independiente de la producción hipofisaria de la PRL. Esta conclusión es apoyada 1) por la presencia del ARN mensajero que codifica para la PRL en distintas regiones del sistema nervioso central (30, 41, 64, 179), y 2) por la prevalencia de material inmunoreactivo a PRL en el cerebro en animales hipofisectomizados en los que no se detecta PRL en el suero por métodos inmunoquímicos convencionales (41, 46, 62).

Métodos

Animales y procesamiento histológico de la muestra.

Se emplearon ratas virgen Wistar (250grs.) alimentadas *ad libitum* y mantenidas en cuartos con temperatura e iluminación (ciclo 12/12) controlada. Algunos animales fueron tratados con colchicina (100µg/50µl de 0.9% solución salina) administrada en el ventrículo lateral del cerebro, 48 horas antes de su sacrificio. Previa anestesia con hidrato de cloral (35mg/100grs de peso), seis animales tratados y diez no tratados se perfundieron por vía cardíaca con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M, pH 7.2. Los cerebros y las hipófisis se disecaron y posfijaron en el mismo fijador por 3 horas a 4⁰C. Transcurrido este tiempo, las muestras se transfirieron a sacarosa al 20% en PBS a 4⁰C hasta su uso. Las muestras fueron entonces incluidas en tissue-tek II y congeladas en un baño de acetona y hielo seco. Cortes coronales de cerebro (30µm) y transversales de hipófisis (10µm) fueron obtenidos en un criostato (-19⁰C) y procesadas para inmunoperoxidasa. Las secciones de hipófisis se montaron en porta objetos cubiertos en gelatina (0.5%) y se desecaron al vacío a 4⁰C toda la noche; los cortes de cerebro se colectaron en PBS-0.3% trítón X-100 (PBS-trítón).

Inmunocitoquímica.

- Etapas de bloqueo.

Las incubaciones con los anticuerpos primarios y secundarios fueron precedidas por preincubaciones con 1% de suero normal de cabra y 10% de albumina bovina en PBS- trítón,

durante 1.30 horas a temperatura ambiente. Las incubaciones con los anticuerpos primarios se extendieron por 48 horas a 4°C.

Anticuerpos primarios.

- Anticuerpo anti-PRL 16 kDa.

El anticuerpo dirigido contra la PRL 16 kDa fueron producidos en conejos contra la PRL 16 kDa de la rata obtenida después de la incubación de la PRL 23 kDa con extractos de la glándula mamaria (105). Este suero muestra una afinidad 200 veces mayor para la PRL 16 kDa que para la PRL 23 kDa en el radioinmunoensayo (RIA) para la PRL 16 kDa (105). El suero anti-PRL 16 kDa no mostró entrecruzamiento con la hormona del crecimiento, la cual posee una alta homología con la PRL, ni con las gonadotropinas y péptidos del sistema hipotálamo-neurohipofisario, incluso a concentraciones de 10^{-6} molar en el RIA para la PRL 16 kDa (105). Para realizar los ensayos de inmunocitoquímica, el suero anti-PRL 16 kDa fue diluido 1:100 o 1:500 en PBS-triton. Los cortes fueron incubados a 4°C toda la noche.

- Anticuerpo anti-PRL 23 kDa.

El anticuerpo dirigido contra PRL 23 kDa de rata fue el S-9 donado por los Institutos Nacionales de Salud de los Estados Unidos. Este suero, también obtenido en conejos, fue utilizado a una dilución de 1:100 en PBS-triton, e incubado con los tejidos bajo las mismas condiciones descritas para el anti-PRL 16 kDa.

- Anticuerpos Secundarios

Los anticuerpos secundarios cabra anti-IgG de conejo acoplados a biotina (Vector), fluoresceína o rodamina (Miles) se emplearon a una dilución de 1:200 en PBS-tritón por 2 horas a 40°C. El anticuerpo biotinilado se demostró con avidina y biotina-peroxidasa de acuerdo a las direcciones del proveedor (Vector). La actividad de peroxidasa fue revelada con 0.05% de 3,3-diaminobenzidina y 0.01% de peróxido de hidrógeno en PBS. Transcurrido 3-5 minutos, la reacción fue detenida lavando en tres ocasiones con PBS. Los cortes de cerebro fueron entonces montados en porta objetos cubiertos con gelatina.

Posteriormente, los porta objetos con los cortes de hipófisis y cerebro se secaron a temperatura ambiente y montaron en permount (Fisher).

- Doble inmunocitoquímica.

Con el propósito inicial de evaluar las relaciones entre la PRL 23 kDa y la PRL 16 kDa en la adenohipofisis mediante el uso de técnicas de doble inmunofluorescencia, cinco animales no tratados con colchicina se anestesiaron y perfundieron, y sus cerebros se procesaron como se describió anteriormente. En los ensayos de doble inmunofluorescencia (Fig.), el primer procedimiento se destino a la detección de PRL 23 kDa, y se visualizó con un anticuerpo secundario acoplado a rodamina. El segundo procedimiento de detección se empleo para identificar PRL 16 kDa, y se visualizo con los anticuerpos acoplados a fluoresceína. Esta técnica requiere de una etapa intermedia de elución con amortiguador de glicina-HCl 0.1M, pH 2.5 entre ambos ensayos de detección (34). Las condiciones de incubación para los anticuerpos primarios y secundarios fueron las mismas que las descritas arriba.

- Controles de preabsorción.

Para realizar los controles de preabsorción, el anticuerpo dirigido contra PRL 16 kDa fue preincubado con PRL 16 kDa de rata (1uM) (17), prolactina de rata (10uM, NIAMD), oxitocina bovina (200uM, SIGMA), arg-vasopresina (200uM, SIGMA), y neurofisinas I y II bovinas (20uM, SIGMA), antes de la incubación con el tejido.

Animales y metodología utilizados en el análisis de la posible influencia del ciclo estral sobre la expresión de la PRL 16K en el sistema hipotálamo-neurohipofisario.

Estudios previos han sugerido que la expresión de las proteínas inmunoreactivas a PRL en el cerebro pudiera estar regulada por los niveles de estrógenos séricos (41, 46, 48, 51). Con el objeto de evaluar esta posibilidad mediante nuestros ensayos de inmunocitoquímica, ratas virgen fueron cicladas, y sus ciclos estrales monitoreados a través de frotis vaginales diarios por dos semanas. Después de este período, los animales (4 animales por cada fase del ciclo estral) fueron anestesiados con hidrato de cloral, y

sacrificados por decapitación durante las fases de proestro, estro y diestro del ciclo estral. Los cerebros fueron rápidamente disecados, fijados por inmersión en paraformaldehído al 4% en PBS por 24 horas a 4⁰C, y transferidos a una solución de sacarosa en PBS a 4⁰C hasta su uso. El procesamiento subsecuente de estas muestras siguió los lineamientos descritos con anterioridad. Para el ensayo de inmunocitoquímica en estos cerebros, sin embargo, se empleó únicamente el suero anti-PRL16 kDa, debido a que este anticuerpo detecta material inmunoreactivo a PRL en el cerebro de ratas no tratadas con colchicina (ver resultados), evitando la posibilidad de la alteración de los niveles séricos de estrógenos como resultado de la cirugía esterotáxica. Así mismo, se prefirió el uso de anticuerpos secundarios acoplados a fluoresceína debido a que la inmunofluorescencia no involucra etapas de amplificación de la señal que pudieran obscurecer las posibles diferencias en la expresión de la PRL 16 kDa en el cerebro, durante las distintas etapas del ciclo estral. El uso de la inmunofluorescencia no va en detrimento del ensayo de inmunocitoquímica per se, pues los anticuerpos secundarios acoplados a fluoróforos incrementa la sensibilidad de la técnica (34),

Observaciones y fotomicrografías.

Las observaciones y fotomicrografías fueron realizadas en un microscopio Carl Zeiss Standard 7, equipado con el sistema automático de fotografía MC-63 y epifluorescencia. La película empleada fue Kodak Plus X-Pan, ASA 125.

Resultados.

Inmuno-reactividad a la PRL 23 kDa en la hipófisis de la rata.

El patrón de tinción obtenido con el suero anti-PRL 23 kDa en la hipófisis se muestra en la figura 7d. Material inmuno-reactivo a la PRL 23 kDa fue observado únicamente en el lóbulo anterior de la glándula hipófisis (Fig 7d), sitio en el cual se localizan los lactotrofos. Por el contrario, los lóbulos intermedio y posterior de la glándula fueron negativos para la PRL 23 kDa (Fig 7d).

Inmuno-reactividad a la PRL 16 kDa en la hipófisis de la rata.

La figura 7a muestra la tinción obtenida en la glándula hipófisis con el suero anti-PRL 16 kDa. Al igual que con el anti-PRL 23 kDa, el anti-PRL 16 kDa tiñó el lóbulo anterior de la glándula hipófisis. Por otro lado, y en contraste con la falta de tinción para la PRL 23 kDa en el lóbulo posterior de la hipófisis, el suero anti-PRL16 kDa tiñó intensamente a la hipófisis posterior. El lóbulo intermedio no mostró inmuno-reactividad para la PRL 16 kDa. La incubación de los cortes histológicos con el suero anti-PRL 16 kDa preabsorbido con 1 μ M de PRL 16 kDa (Fig 7b), y 10 μ M de PRL 23 kDa (Fig.7c) bloqueó la tinción para la PRL 16 kDa observada en los lóbulos anterior y posterior de la glándula hipófisis. Por el contrario, la preabsorción del suero anti-PRL 16 kDa con 200 μ M de arginina-vasopresina (7e) y 20 μ M neurofisisina I (7f) no afecta la marca inmunológica para la PRL 16 kDa observada en la hipófisis. Resultados semejantes fueron obtenidos al incubar los cortes de la hipófisis con el suero anti-PRL 16 kDa preabsorbido con 200 μ M de oxitocina y 20 μ M neurofisisina II (no se muestra). Estas dos últimas observaciones son especialmente importantes debido a que la arg-vasopresina, la oxitocina, y las neurofisisina I y II son abundantes en el lóbulo posterior de la glándula hipófisis (200). En apoyo a que la inmunotinción para la PRL 16 kDa observada en el lóbulo posterior de la glándula hipófisis no resulta del entrecruzamiento del suero anti PRL 16 kDa con péptidos neurohipofisarios, en el laboratorio se ha demostrado que, en el RIA para la PRL 16 kDa, una concentración de 1000 nanomolar de arginina-vasopresina, oxitocina, neurofisisinas I y II, B-endorfina, metionina-encefalina, y adrenocorticotropina 1-37 (ACTH), no desplazan la unión de la 125I-PRL 16 kDa con el suero anti-PRL 16 kDa (Fig 8) (30).

Doble inmunocitoquímica en la adenohipófisis.

Ensayos de doble inmunofluorescencia se realizaron para tratar de dilucidar las relaciones citológicas entre la PRL 23 kDa y la PRL 16 kDa en la adenohipofisis. Los resultados, aun preliminares, mostraron la colocalización de la marca inmunológica para ambas variantes en los lactotropos adenohipofisarios. (Fig.9a y b).

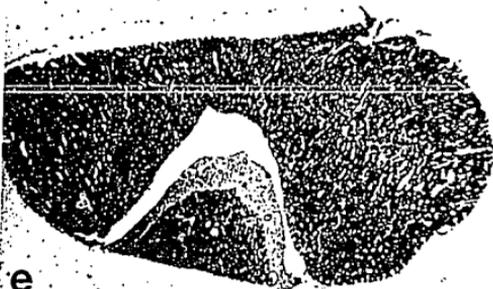
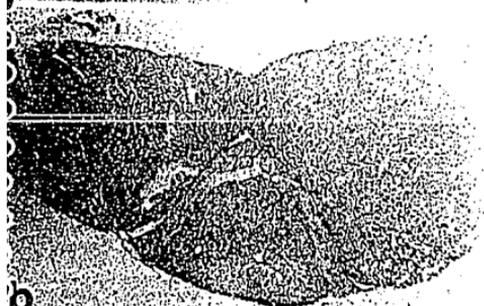


FIGURA 7

Immuno-reactividad para las PRLs 23 kDa y 16 kDa en la hipófisis de la rata

Fotomicrografías que muestran cortes tangenciales de la glándula hipófisis inmunoteñidas para a) PRL 16 kDa y d) PRL 23 kDa. Nótese la intensa inmunoreactividad para ambas prolactinas en el lóbulo anterior, y la ausencia de marca para ambas variantes en el lóbulo intermedio de la glándula. El lóbulo posterior únicamente muestra inmunoreactividad para PRL 16 kDa.

Los controles de preabsorción del anticuerpo anti-PRL 16 kDa con PRL 16 kDa, (b) prolactina 23 kDa (c) (Tomado de la ref. 30), arginina-vasopresina, y f) neurofina I también se muestran. La marca inmunológica para PRL 16 kDa en la hipófisis se bloquea totalmente mediante la preabsorción con PRL 16 kDa, y PRL 23 kDa, mas no con arginina-vasopresina y neurofina I.

16K PRL RIA

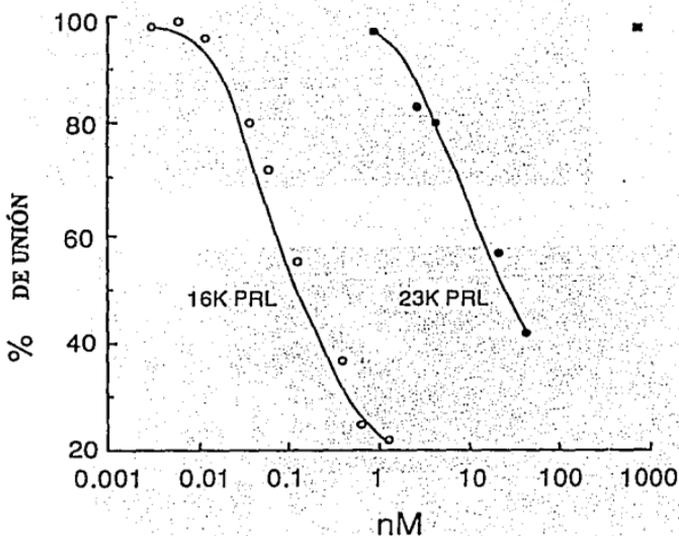


FIGURA 8

Radioinmunoensayo para la PRL 16 kDa

Especificidad del anticuerpo anti-PRL 16 kDa en el radioinmunoensayo. El desplazamiento de ^{125}I -PRL 16 kDa se realizó con concentraciones crecientes de PRL 16 kDa (○) y de PRL 23 kDa (●). El anticuerpo anti-PRL 16 kDa posee 100-200 veces mayor afinidad por la PRL 16 kDa que por PRL 23 kDa. El uso de una concentración de 1000 nanomolar (■) de hormona de crecimiento, arginina-vasopresina, oxitocina, neurofisinas I y II, B lipotropina, B endorfina, metionina-encefalina y ACTH 1-39 no desplazan la unión de la ^{125}I -PRL 16 kDa al anticuerpo. (Tomada de la ref. 30)

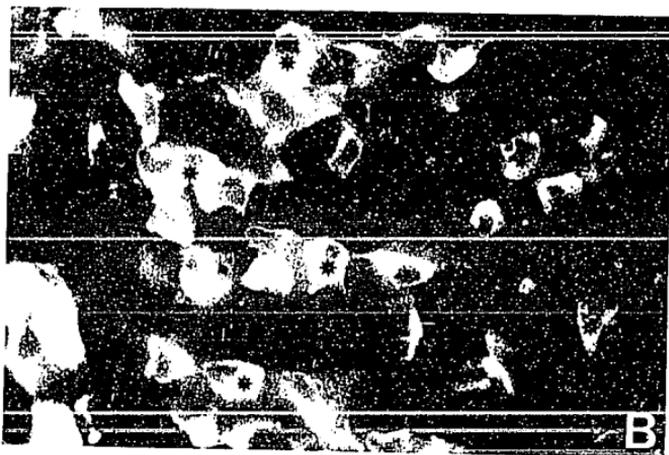
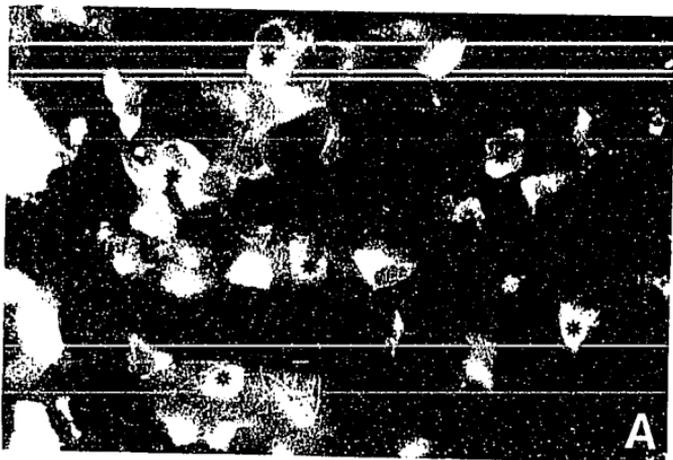


FIGURA 9

Doble inmunocitoquímica en la adenohipófisis

Fotomicrografías que ilustran la tinción celular observada para a) PRL 23 kDa y b) PRL 16 kDa en la adenohipófisis. Las secciones de tejido fueron teñidas con técnicas de doble inmunofluorescencia. Los lactotrofos adenohipofisarios muestran co-localización de la marca inmunológica para ambas variantes. (*)

Cerebro.

Inmuno-reactividad tipo PRL 23 kDa en el cerebro de la rata.

Material inmuno-reactivo tipo PRL 23 kDa fue observado exclusivamente en el hipotálamo, y únicamente en los animales tratados con colchicina intraventricular. No se detectó material inmuno-reactivo para la PRL 23 kDa en otros núcleos hipotalámicos, en áreas extrahipotalámicas, ni en los órganos circumventriculares. Una tinción discreta para la PRL 23 kDa fue observada en algunas neuronas del núcleo arqueado (Fig 10f), y en las neuronas magnocelulares de la subdivisión anterior del núcleo supraóptico (Fig. 10d). Así mismo, en el presente estudio no fue posible detectar fibras nerviosas con inmuno-reactividad tipo PRL 23 kDa en áreas hipotalámicas o extrahipotalámicas en los animales no tratados con colchicina.

Inmuno-reactividad tipo Prolactina 16 kDa en el cerebro de la rata.

Material inmuno-reactivo tipo PRL 16 kDa fue detectado exclusivamente en el hipotálamo, en animales tratados o no con colchicina intraventricular. Las neuronas magnocelulares localizadas en las subdivisiones lateral y posterior del núcleo paraventricular (Fig. 10a), y en el núcleo supraóptico (Fig. 10c), mostraron intensa inmuno-reactividad para PRL 16 kDa. Ningún otro núcleo hipotalámico, incluido el núcleo arqueado (10b), que fue positivo para la PRL 23 kDa, mostró inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa, no obstante el tratamiento con colchicina.

Fibras nerviosas con inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa fueron identificadas corriendo entre los núcleos paraventricular y supraóptico (Fig. 11), en la región retroquiasmática lateral (Fig. 11), en la lamina interna de la eminencia media (Figs. 10e y 11), y en el infundíbulo hipofisario de animales no tratados con colchicina (Fig. 11). La distribución de las fibras positivas para la PRL 16 kDa, corresponde a la distribución de las fibras que constituyen el sistema hipotálamo-neurohipofisis (3, 200). En apoyo a esta observación, es importante recordar que la neurohipofisis, el sitio de proyección de las

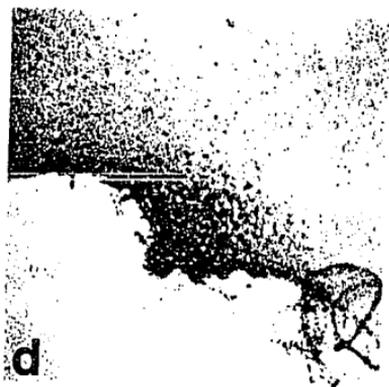
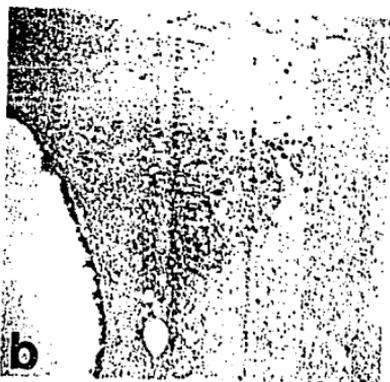
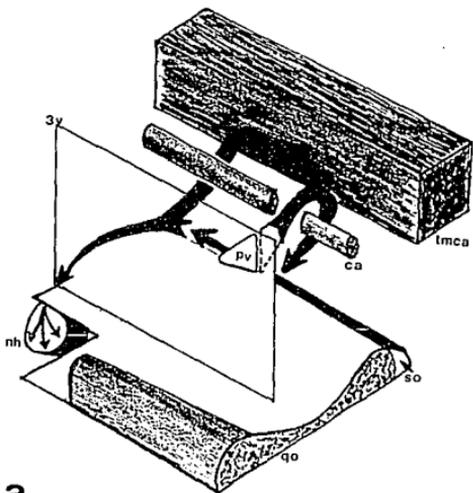


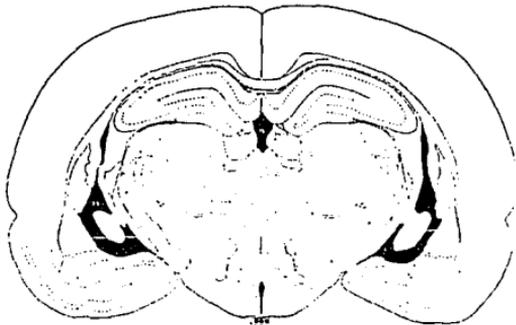
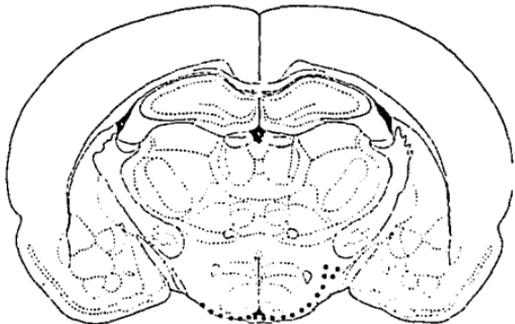
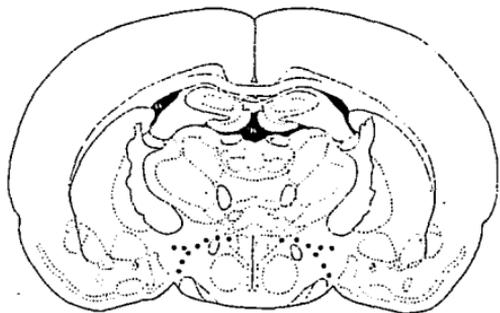
FIGURA 10

Inmuno-reactividad tipo PRLs 23 kDa y 16 kDa en el cerebro de la rata.

Fotomicrografías que muestran la inmunotinción para PRL 16 kDa (a,c,e) y PRL 23 kDa (b,d,f) en los núcleos paraventricular, supraóptico y arqueado hipotalámicos, y en la eminencia media. Las neuronas magnocelulares en los núcleos paraventricular (a) y supraóptico (c) mostraron intensa inmuno-reactividad para la PRL 16 kDa. Por otro lado, el núcleo paraventricular fue negativo para la PRL 23 kDa (b), mientras que el núcleo supraóptico mostró una tinción débil, pero consistente para la PRL 23 kDa (d). El núcleo arqueado fue negativo para la PRL 16 kDa, mientras la lámina interna de la eminencia media fue positiva para PRL 16 kDa (e). En contraste, el núcleo arqueado mostró inmunorreactividad tipo PRL 23 kDa, mientras que la eminencia media fue negativa para esta variante.



a



c

FIGURA 11

a y c) Representación esquemática de la distribución de las fibras inmunorreactivas a PRL 16 kDa en el cerebro de rata. pv. núcleo paraventricular, ca. comisura anterior, so. núcleo supraóptico, qo. quiasma óptico, tmca. tracto medial del cerebro anterior, nh. neurohipófisis, 3v. tercer ventrículo, em. eminencia media, if. infundíbulo hipofisario.

b) Fotomicrografía que muestra fibras inmunorreactivas tipo PRL 16 kDa localizadas en el borde externo de la comisura anterior (flechas).

neuronas magnocelulares, fue intensa y específicamente teñida por el suero anti-PRL 16 kDa.

Efectos del ciclo estral sobre la inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa en el cerebro.

Los posibles efectos del ciclo estral sobre la inmuno-reactividad de la PRL 16 kDa fueron monitoreados en los núcleos paraventricular y supraóptico, así como en la eminencia media de animales no tratados con colchicina. El número aparente de células positivas para la PRL 16 kDa varió, de manera consistente, en el núcleo paraventricular a lo largo del ciclo estral (Fig 12). La inmunotinción para PRL 16 kDa en este núcleo fue alta durante las fases de proestro y estro (Fig. 12 a,b) y decayó de manera evidente hacia el diestro (Fig. 12c). Estas diferencias no fueron aparentes en la eminencia media ni en el núcleo supraóptico (no se muestra).

Discusión

La PRL es una hormona proteica cuya estructura presenta distintas formas entre las que destacan variantes poliméricas, monoméricas, y variantes proteolíticamente procesadas (31, 135, 184). Aunque el significado biológico de estas variantes aún no se conoce con precisión, se ha propuesto que las modificaciones postraduccionales que sufre la variante predominante de la PRL, conocida como PRL 23 kDa, podrían contribuir a explicar la gran diversidad de funciones que tiene la PRL en base a su diversidad estructural (184). En apoyo a esto, se ha documentado que algunas variantes enzimáticamente procesadas poseen no solamente acciones tipo PRL 23 kDa, sino que ejercen acciones completamente independientes. La PRL cortada, por ejemplo, promueve la proliferación de los gonadotropos y tirotropos adenohipofisarios en cultivo, efecto que no es observado con la PRL 23 kDa (5).

Estudios recientes también han demostrado que el fragmento amino terminal derivado del procesamiento proteolítico de la PRL 23 kDa y denominado PRL 16 kDa, posee efectos mitogénicos y lactogénicos semejantes a los de la PRL 23 kDa (25). La PRL 16 kDa, sin embargo, también posee acciones independientes a los de la PRL 23 kDa. La

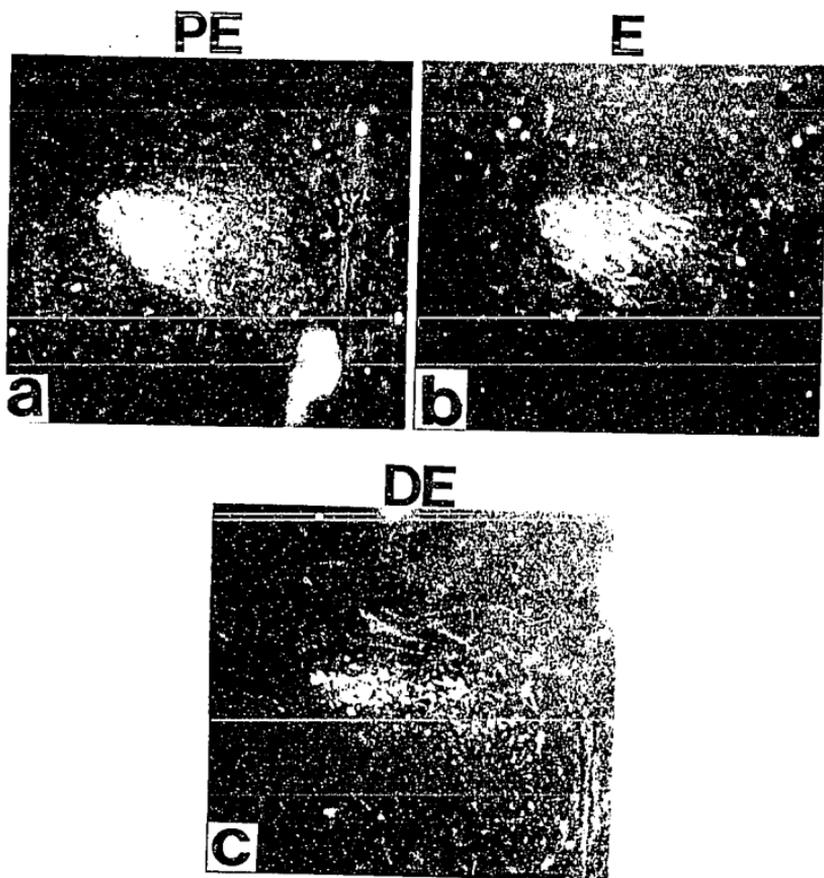


FIGURA 12

Efectos del ciclo estral sobre la expresión del antígeno tipo PRL 16 kDa en el hipotálamo. Fotomicrografías que ilustran los efectos del ciclo estral sobre la inmunotinción fluorescente para la PRL 16 kDa en el núcleo paraventricular (a-c). La tinción para la PRL 16 kDa es intensa durante las fases de proestro (PE) (a) y estro (E) (b), y disminuye hacia el diestro (DE) (c).

PRL 16 kDa, más no la PRL 23 kDa, inhibe el proceso de angiogénesis. La adición de la PRL 16 kDa al medio de cultivo inhibe la proliferación y asociación de las células endoteliales *in vitro* (29, 68). Así mismo, la PRL 16 kDa aplicada directamente a la membrana corioalantoidea de pollo interrumpe el proceso *in vivo* de formación vascular (68). Más aún, el efecto de la PRL 16 kDa sobre la angiogénesis parece ser mediado por receptores específicos y de alta afinidad, localizados en la membrana de las células endoteliales (27).

Además de la angiogénesis, otros procesos parecen ser afectados por la PRL 16K. Estudios preliminares han demostrado que la PRL 16 kDa promueve la natriuresis después de ser administrada sistémicamente. Este efecto es opuesto al reportado para la PRL 23 kDa sobre la excreción renal de sodio (e.g. 31), y podría también ser mediado por receptores específicos para la PRL 16 kDa que se han reportado presentes en la membrana de las células del epitelio renal (26). Las observaciones descritas han conducido a la idea de que la PRL 16 kDa pudiese ser un nuevo factor involucrado en la regulación de la angiogénesis, la natriuresis, y quizás de otras funciones.

No obstante la evidencia farmacológica que apoya que la PRL 16 kDa pudiera ser un nuevo factor regulatorio, poco se sabe aún acerca de su presencia, producción y regulación endógena. Uno de los problemas asociados al estudio de la producción endógena de la PRL 16 kDa es la baja inmuno-reactividad que este péptido posee frente a los anticuerpos dirigidos contra la PRL 23 kDa (197). Esto se ha traducido en la subestimación de los niveles de la PRL 16 kDa endógena (197). Así, en los últimos años el laboratorio se ha dado a la tarea de caracterizar la posible presencia de la PRL 16 kDa en el suero de roedores. Para ello, se generaron sueros hiperinmunes dirigidos contra la PRL 16 kDa, inmunizando conejos con la PRL 16 kDa derivada del procesamiento enzimático de la PRL 23 kDa con extractos de la glándula mamaria (28). Los anticuerpos así obtenidos mostraron una afinidad 200 veces mayor por la PRL 16 kDa que por la PRL 23 kDa en el RIA para la PRL 16 kDa, y no presentaron entrecruzamiento con otras hormonas adenohipofisarias (197).

Recientemente, estos sueros fueron utilizados para la identificación consistente de dos antígenos inmuno-reactivos a PRL 16 kDa en el suero de ratones y ratas, así como en homogenados de la hipófisis de la rata (197). Dichos antígenos poseen una masa molecular aproximada de 14 kDa y 16 kDa.

En el presente trabajo hicimos uso de los anticuerpos dirigidos contra la PRL 16 kDa para elaborar ensayos de inmunocitoquímica que nos permitieran localizar posibles fuentes de producción de la PRL 16 kDa en la hipófisis y en el cerebro. Nuestros resultados demostraron la presencia de material inmuno-reactivo tipo PRL 16 kDa en los lactotropos adenohipofisarios. Asimismo, se identificó material inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa en las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico hipotalámicos, y en la neurohipofisis, el sitio de proyección de estas neuronas.

La inmunodetección de material positivo a la PRL 16 kDa en la hipófisis y en el cerebro mediante ensayos de inmunocitoquímica, sin embargo, no permite definir con certeza la identidad de dicho material debido a la posibilidad de que el anticuerpo anti-PRL 16 kDa, no obstante su alta afinidad por la PRL 16 kDa, pudiera entrecruzar con la PRL 23 kDa (ver adelante), con alguna otra variante de PRL, ó cualquier otro antígeno (ver por ejemplo referencias 82 y 196) que pudiesen estar presentes en cantidades altas en los tejidos evaluados. Es por esto que el presente estudio fue subsecuentemente validado por trabajo que ha permitido definir con mayor precisión la identidad del material inmuno-reactivo tipo PRL 16 kDa en la hipófisis y cerebro de rata, y caracterizar algunas de sus propiedades estructurales y funcionales. Por tanto, los resultados de inmunocitoquímica del presente trabajo y aquellos obtenidos como el producto del trabajo subsecuente del laboratorio serán discutidos en conjunto, en las secciones correspondientes.

Inmuno-reactividad tipo PRLs 23 kDa y 16 kDa en la hipófisis de la rata.

Diferentes patrones de inmunotinción fueron observados al emplear los anticuerpos dirigidos contra la PRL 23 kDa y contra la PRL 16 kDa en la glándula hipófisis. El anticuerpo dirigido contra la PRL 23 kDa marcó exclusivamente la adenohipofisis. La

tinción positiva para PRL en la adenohipófisis concuerda con estudios múltiples en la literatura que demuestran la presencia de células productoras de PRL 23 kDa ó lactotropos adenohipofisarios (102). Asimismo, el hecho de que no se haya observado inmunoreactividad para la PRL 23 kDa en los lóbulos intermedio y posterior de la hipofisis, está de acuerdo con el consenso general que indica que la PRL 23 kDa no es producida, ni almacenada por las células del lóbulo intermedio, o por las células o terminales nerviosas localizadas en el lóbulo posterior de la hipófisis (e.g. 102).

El suero dirigido contra la PRL 16 kDa, por otro lado, marcó tanto el lóbulo anterior como el lóbulo posterior de la glándula hipófisis. Si bien la inmunotinción para la PRL 16 kDa observada en el lóbulo anterior de la hipófisis esta en consonancia con la posibilidad de que la adenohipófisis produce a esta variante, estos resultados deben ser tomados con precaución. Mediante inmuno-análisis Western, en el laboratorio se observó que la concentración aparente de la PRL 23 kDa en la adenohipofisis es aproximadamente 100 veces mayor que la detectada de PRL 16 kDa. En el RIA para la PRL 16 kDa, se ha observado que la PRL 23 kDa en altas concentraciones (100-200 veces mayores a los de la PRL 16 kDa) es capaz de desplazar la de la PRL 16 kDa con su anticuerpo (198). Así, es posible que la tinción para PRL 16 kDa observada en la adenohipófisis pudiera deberse en parte al entrecruzamiento del anticuerpo anti-PRL 16 kDa con la PRL 23 kDa presente en altas concentraciones en este tejido.

Los ensayos de doble inmunocitoquímica mostraron la colocalización de las marcas inmunológicas para la PRL 23 kDa y la PRL 16 kDa en los mismos lactotropos en la adenohipófisis. En función de las consideraciones anteriores, es posible que la tinción positiva al suero anti-PRL 16 kDa se deba al entrecruzamiento de dicho suero con la PRL 23 kDa presente en exceso en la adenohipófisis. Cabe recordar, no obstante, que la PRL 16 kDa deriva del procesamiento enzimático de la PRL 23 kDa, por lo que la colocalización de ambas variantes es de esperarse. En base a lo discutido anteriormente, los resultados que muestran colocalización inmunocitoquímica de las PRLs 23 kDa y 16 kDa en los lactotropos

no son concluyentes. Estudios ultraestructurales podrían definir en un futuro la relación citológica que guardan la PRL 23 kDa y la PRL 16 kDa en la adenohipófisis.

El suero anti-PRL 16 kDa también detectó material inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa en el lóbulo posterior de la hipófisis. El hecho de que tanto el suero anti-PRL 23 kDa como el suero anti-PRL 16 kDa marquen la adenohipófisis, e incluso los mismos lactotropos, pero que sólo el suero anti-PRL 16 kDa tiña la neurohipófisis, sugiere que los antígenos detectados por este último suero en la adeno- y en la neurohipófisis son diferentes. Sin embargo, el hecho de que la preabsorción del suero anti-PRL 16 kDa con la PRL 23 kDa y la PRL 16 kDa eliminen la inmunotinción para esta última en la neurohipófisis, sugiere la naturaleza tipo PRL del antígeno detectado en el lóbulo posterior de la glándula hipófisis por el suero anti-PRL 16 kDa.

Más aún, debido a que la preabsorción del suero anti-PRL 16 kDa con péptidos que se encuentran en altas concentraciones en la neurohipófisis como la arg-vasopresina, la oxitocina o las neurofisinas I y II, no elimina la inmunotinción, es posible concluir que la marca para la PRL 16 kDa en la neurohipófisis no se debe al entrecruzamiento del anticuerpo anti-PRL 16 kDa con péptidos conocidos que se producen localmente. En apoyo a esta conclusión, en el laboratorio se demostró que péptidos neurohipofisarios, a saber arginina-vasopresina, oxitocina, neurofisinas I y II, B-endorfina, metionina-enkefalina, B-lipotropina y adrenocorticotropina 1-37 no compiten por la unión entre la PRL 16 kDa y su suero en el RIA de la PRL 16 kDa (Fig. 8) (30).

En estudios previos, Pfaff y colaboradores sugirieron que fragmentos derivados de la pro-opiomelanocortina (POMC) pudieran ser responsables de la inmuno-reactividad para la PRL 23 kDa observada en el cerebro de la rata (82, ver también 196). Esta idea se basó en la observación hecha por estos autores de que el suero anti-PRL 23 kDa empleado en sus estudios teñía la hipófisis intermedia, y que la tinción para la PRL 23 kDa en la hipófisis intermedia y en el cerebro desaparecía al preabsorber el anticuerpo con el fragmento amino-terminal de 16 kDa derivado de la ACTH. Los sueros anti-PRL 23 kDa y anti-PRL 16 kDa

empleados en este estudio, sin embargo, no tuvieron la hipófisis intermedia, región enriquecida en péptidos derivados de POMC. Esta observación sugiere que la tinción observada tanto en la glándula hipófisis como en el cerebro (ver adelante) con ambos anticuerpos, no es el resultado del entrecruzamiento con péptidos derivados de POMC (ver también 51,89). En apoyo a esta conclusión, debe recordarse que al menos el suero anti-PRL 16 kDa no mostró reactividad cruzada con la B-endorfina, met-encefalina, ACTH, o B-lipotropina en el radioinmunoensayo para PRL 16 kDa (Fig. 8) (30).

Ahora bien, en apoyo a la presencia de antígenos tipo PRL 16 kDa en la neurohipófisis de rata, estudios recientes del laboratorio han identificado, mediante inmun análisis Western, tres proteínas reactivas al suero anti-PRL 16 kDa en extractos de la neurohipófisis (Fig. 13) (30). Estas proteínas poseen una masa molecular aproximada de 14, 23 y 25 kDa (Fig. 13), siendo la proteína de 14 kDa la más abundante de ellas. Es importante destacar el hecho de que las proteínas de 23 kDa y 25 kDa poseen una masa molecular que corresponde a las masas moleculares descritas para las variantes PRL 23 kDa y PRL cortada de origen hipofisario. A este respecto, un dato que apoya que la proteína de 25 kDa pudiera ser PRL cortada es la demostración de que la banda correspondiente a esta proteína desaparece de los geles, una vez que las muestras ha sido corridas en presencia de mercaptoetanol, un agente reductor de enlaces disulfuro. (Fig 13) (30).

Finalmente, también en experimentos recientes llevados a cabo en el laboratorio, se ha demostrado que medios de cultivo condicionados con explantes de neurohipófisis contienen la proteína de 14 kDa con inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa en concentraciones aparentemente altas (30). Este medio de cultivo enriquecido en la proteína 14 kDa, posee efectos antiangiogénicos semejantes a los de la PRL 16 kDa sobre células endoteliales derivadas de capilares cerebrales. Así, se mostró que al igual que la PRL 16 kDa, los medios enriquecidos con la proteína de 14 kDa inhiben el efecto mitogénico del factor de crecimiento fibroblástico sobre las células endoteliales en cultivo, y que sus efectos antiangiogénicos son bloqueados por el suero anti-PRL 16 kDa (Fig. 14) (30).

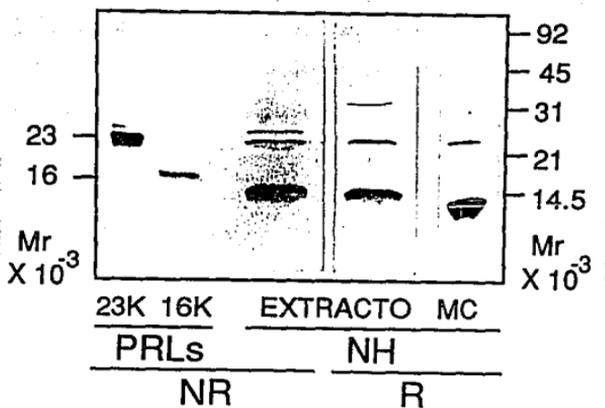


FIGURA 13

Immuno-análisis Western de los medios condicionados con neurohipófisis cultivadas. Inmunotransferencias de extractos de neurohipófisis (NH) y medio condicionado (MC) por neurohipófisis cultivadas (1hr. en Krebs -Ringer a 37°C) teñidas con el anticuerpo anti PRL 16K (1:500). Las proteínas se separaron en geles de SDS/poliacrilamida bajo condiciones no reductoras (NR) y reductoras (R). Los estándares de PRL 16K y PRL 23K así como los marcadores de peso molecular se indican en las columnas izquierda y derecha, respectivamente. (Tomado de la ref. 30)

En conclusión, los resultados de inmunocitoquímica descritos sugieren la presencia de un antígeno tipo PRL 16 kDa en la neurohipofisis de la rata. La subsecuente caracterización de este antígeno apoya que se trata de una proteína con una masa molecular de aproximadamente 14 kDa, con propiedades inmunoquímicas y biológicas semejantes a las de la PRL 16 kDa.

Inmuno-reactividad tipo PRLs 23 kDa y 16 kDa en el cerebro de la rata.

En el presente estudio, material inmunorreactivo para la PRL 23 kDa fue observado en el núcleo arqueado y en las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico en el hipotálamo, únicamente después del tratamiento de los animales con colchicina intra cerebro-ventricular. No se observaron neuronas positivas para la PRL 23 kDa en otros núcleos hipotalámicos, ni en áreas extrahipotalámicas. Así mismo, no fue posible detectar fibras nerviosas con inmuno-reactividad para la PRL 23 kDa en ninguno de los cerebros de los distintos grupos de animales estudiados. Si bien estas observaciones coinciden con estudios previos en los que se identificaron neuronas positivas para la PRL 23 kDa en el núcleo arqueado de los animales tratados o no con colchicina, y en el núcleo supraóptico de animales tratados con colchicina (183, 195), nuestros resultados contrastan con trabajos previos que mostraron que otros grupos neuronales del hipotálamo anterior, además de los descritos arriba, poseen inmuno-reactividad para la PRL 23 kDa (81, 82, 84, 144, 159, 181, 183, 195, 196). De igual forma, la falta de detección de fibras inmunopositivas para la PRL 23 kDa en nuestro estudio, contrasta con la amplia distribución de las fibras positivas para la PRL 23 kDa reportada previamente en el sistema nervioso central de la rata (81, 82, 84, 144, 159, 181, 183, 195, 196).

Las discrepancias entre el presente estudio y los trabajos previos en relación a la identidad y distribución de neuronas y fibras positivas para la PRL 23 kDa en el cerebro de la rata, sin embargo, no son excepcionales. De hecho, las discrepancias entre los trabajos publicados han sido señaladas anteriormente por otros autores, y atribuidas tanto a diferencias en la especificidad que por la PRL 23 kDa poseen los distintos sueros anti-PRL

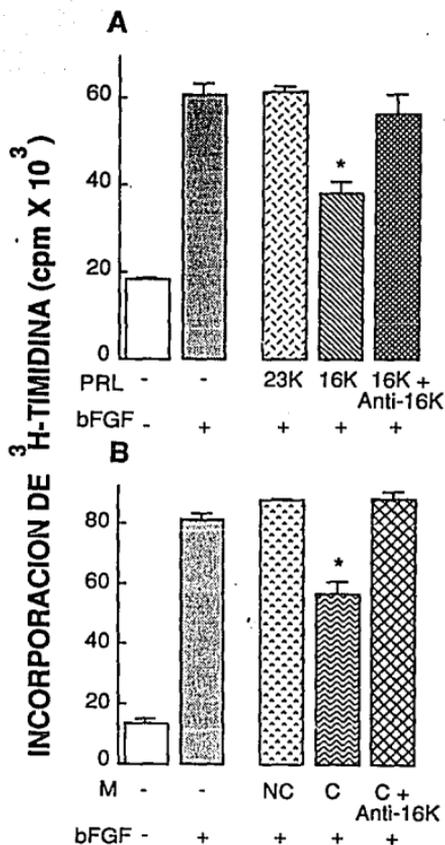


FIGURA 14

Efectos del medio condicionado con neurohipófisis sobre la proliferación endotelial
 Incorporación de ³H timidina en células endoteliales en cultivo bajo las siguientes condiciones: a) En presencia de FGF (50pM) solo o en combinación con PRL 23 kDa (12.5nM), con PRL 16 kDa (12.5nM), o con PRL 16 kDa y el anticuerpo anti-PRL 16 kDa (1:1000). b) En presencia de FGF solo o en combinación con medio no condicionado (NC), condicionado (C) (1:75), o con medio condicionado y el anticuerpo anti PRL 16 kDa. El medio condicionado contiene la proteína de 14 kDa inmunoreactiva a PRL 16 kDa a una concentración final de 12.5nM. *p<0.05. (Tomada de la ref. 30)

23 kDa empleados para su identificación inmunocitoquímica, como al uso de distintas técnicas para el procesamiento de las muestras de tejido destinadas a la inmunotinción. En este sentido, nuestras observaciones sugieren que las discrepancias entre los estudios pudieran resultar no solamente de diferencias en la especificidad de los sueros anti-PRL 23 kDa por distintos epitopes de la PRL 23 kDa (81, 84, 199), sino también por las diferencias en la habilidad de estos sueros para detectar otras variantes de la PRL. En apoyo a esta idea está el hecho de que los sueros anti-PRL 23 kDa y anti-PRL 16 kDa empleados en condiciones experimentales semejantes fueron capaces de identificar grupos celulares diferentes en el cerebro.

La neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular hipotalámicos fueron intensamente inmuno-reactivas al suero anti-PRL 16 kDa, en ratas tratadas o no con colchicina. No se identificaron neuronas positivas para la PRL 16 kDa en otros núcleos hipotalámicos, incluyendo al núcleo arqueado el cual fue positivo para la PRL 23 kDa, ni en áreas extrahipotalámicas. La presencia de antígenos tipo PRL en los núcleos magnocelulares hipotalámicos es controversial. Mientras algunos autores han reportado escasas neuronas inmuno-reactivas para la PRL 23 kDa en los núcleos paraventricular y supraóptico de animales tratados con colchicina (183, 195), la mayor parte de los trabajos previos no han documentado la presencia de material inmuno-reactivo para la PRL en ambos núcleos magnocelulares. En el presente estudio, solamente las neuronas magnocelulares del núcleo supraóptico de animales tratados con colchicina fueron teñidas discretamente por el suero anti-PRL 23 kDa, mientras que las neuronas magnocelulares de los núcleos supraóptico y paraventricular fueron intensamente inmuno-reactivas para la PRL 16 kDa, de manera irrestricta al tratamiento con colchicina. Nuestros resultados sugieren, por tanto, que las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico hipotalámicos poseen un antígeno con inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa.

El significado de la doble tinción del núcleo supraóptico para ambas variantes no es claro. Si bien pudiera considerarse que esta observación sugiere que ambas variantes co-

existen en las neuronas magnocelulares de este núcleo, también es posible que el material inmuno-reactivo a la PRL 23 kDa y la PRL 16 kDa estuviera presente en diferentes subpoblaciones de células magnocelulares localizadas en el núcleo supraóptico. Ensayos de doble inmunocitoquímica son necesarios para resolver este punto. Por otro lado, es poco probable que en el núcleo supraóptico ambos anticuerpos estén reconociendo el mismo antígeno (aunque esto no descarta la posibilidad de su co-localización). Esta conclusión se basa en 1) los resultados obtenidos en la glándula hipófisis en donde ambos anticuerpos tiñeron la adenohipófisis (potencialmente el mismo antígeno), pero solamente el anti-PRL 16 kDa marca la neurohipófisis, y 2) en el hecho de que en ausencia del tratamiento con colchicina intraventricular, el anti-PRL 23 kDa, pero no el anti-PRL 16 kDa, pierde su habilidad para reconocer material inmuno-reactivo a la PRL en el núcleo supraóptico. Finalmente, nuestras observaciones también apoyan que la falta de detección consistente de material inmuno-reactivo a la PRL en las neuronas magnocelulares hipotalámicas pudiera deberse a la inhabilidad de los sueros anti-PRL 23 kDa para reconocer otras variantes de la PRL.

En resumen, la presencia de material inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa en las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico, la presencia de material inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa en la neurohipófisis, la caracterización de este material como predominantemente asociado a una proteína de 14 kDa con propiedades inmunoquímicas y fisiológicas tipo PRL 16 kDa, y el hecho de que las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico proyecten a la neurohipófisis (3, 7, 161, 193, 200), sugieren que el sistema hipotálamo-neurohipofisario produce fragmentos de PRL con propiedades antiangiogénicas. En apoyo a esta conclusión, fibras nerviosas positivas para la PRL 16 kDa se localizaron corriendo entre los núcleos hipotalámicos, el supraóptico y el paraventricular, en el tracto medial del cerebro anterior, en la región retroquiasmática lateral, en la lámina interna de la eminencia media, y en el tallo hipofisario. La distribución de las fibras positivas a la PRL 16 kDa corresponde a la

distribución reportada para las fibras vasopresinérgicas y oxitocinérgicas que constituyen el sistema hipotálamo-neurohipofisario (3, 7, 161, 193, 200).

En apoyo a la posibilidad de que material inmuno-reactivo a la PRL 16 kDa sea producido localmente en el sistema hipotálamo-neurohipofisario, estudios recientes conducidos en el laboratorio identificaron el ARN mensajero que codifica para la PRL en preparaciones de ARN total del núcleo paraventricular, después de la amplificación de la fracción del ARN mensajero por la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (Fig 15) (30). El hecho de que no se hayan podido detectar transcritos alternativos después de la hibridización del ARN total con sondas dirigidas contra distintas secuencias del gen de la PRL, sugiere que el ARN mensajero para la PRL es producido en su totalidad, y por tanto, es posible que la proteína de 14 kDa con inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa sea el resultado del procesamiento enzimático de la PRL 23 kDa en las neuronas magnocelulares. En apoyo a esta idea esta la presencia de una proteína de 25 kDa en los homogenados de la neurohipófisis y del núcleo paraventricular que desaparece de los geles cuando las muestras son corridas en presencia de agentes reductores de enlaces disulfuro, lo que sugiere que esta proteína es PRL cortada, el precursor inmediato de los fragmentos de la PRL (31, 169, 184). También se ha detectado la actividad de las enzimas de corte de la PRL 23 kDa en homogenados del núcleo paraventricular y de la neurohipófisis, siendo en esta última donde la actividad de estas enzimas es mayor (Fig. 16) (30).

En conjunto, los resultados de inmunocitoquímica y bioquímicos discutidos sugieren que: 1) el sistema hipotálamo-neurohipofisario posee la capacidad de producir proteínas tipo PRL, y 2) que la PRL cerebral es estructuralmente heterogénea e incluye una proteína de 14 kDa con propiedades inmunoquímicas y antiangiogénicas semejantes a las de la PRL 16 kDa, las cual asimismo parece derivar del procesamiento postraduccional de la PRL 23 kDa. Ahora bien, el significado funcional de localizar un factor antiangiogénico en el sistema hipotálamo-neurohipofisario es poco claro. Cabe señalar, sin embargo, que las neuronas magnocelulares producen los factores de crecimiento fibroblástico y vascular (67,87) y que

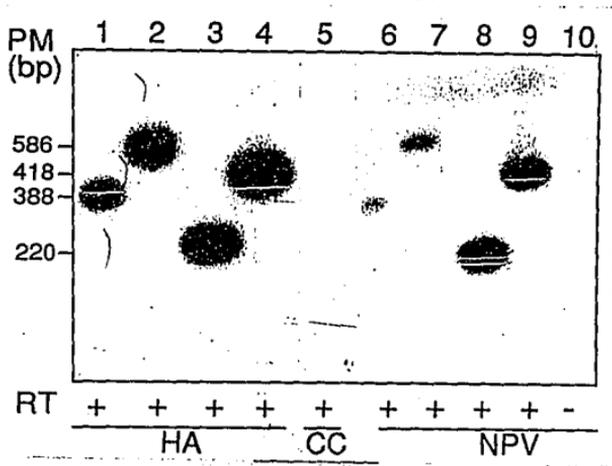


FIGURA 15
Identificación del ARN mensajero para la PRL en homogenados del núcleo paraventricular

Análisis Southern de las preparaciones de ARN total obtenidas de homogenados de hipófisis anterior (HA), corteza cerebral (CC), y núcleo paraventricular (NPV) amplificadas por la técnica de PCR, e hibridizadas con diferentes oligonucleótidos para el gen de la PRL. La muestras en los carriles 1 y 6 fueron hibridizadas con oligonucleótidos de 388 pares de bases, los carriles 2 y 7 con oligonucleótidos de 586 pares de bases, los carriles 3 y 8 con oligonucleótidos de 220 pares de bases, y los carriles 4 y 9 con oligonucleótidos de 418 pares de bases (Tomado de la ref. 30).

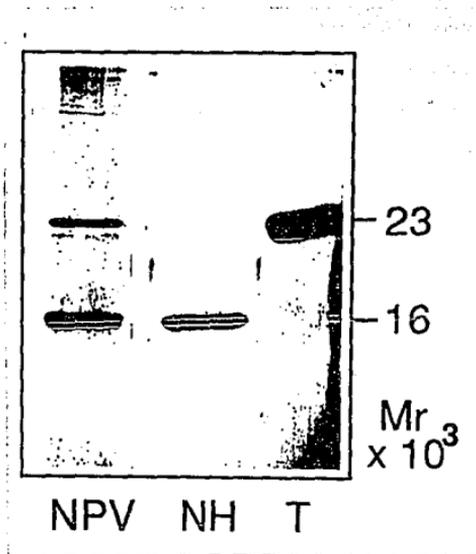


FIGURA 16

Actividad de corte para la PRL 23 kDa en el núcleo paraventricular y en la neurohipófisis

Inmunotransferencias teñidas con el anticuerpo anti-PRL16 kDa que muestran la proteólisis de PRL 23 kDa (2 μ g) después de la incubación con membranas (3 μ g de proteína) de núcleo paraventricular (NPV) y neurohipófisis (NH). El control, ilustrado en la columna de la derecha, corresponde al estandard de PRL 23 kDa incubado sin tejido (T). (Tomado de la ref. 30).

el lecho vascular que las rodea sufre modificaciones importantes durante periodos de intensa actividad (Gutiérrez-Ospina et al, en preparación).

Efectos de los estrógenos sobre la inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa en el hipotálamo de la rata.

Estudios previos han demostrado que la concentración de proteínas inmuno-reactivas tipo PRL en el hipotálamo de ratas hembra es mayor que en el de las ratas macho (41, 46, 48, 51). También ha sido documentado que la ovariectomía en ratas, conduce a una reducción de la concentración de las proteínas con inmuno-reactividad tipo PRL en el hipotálamo (46, 48, 51). Este efecto es revertido cuando los animales son tratados con estrógenos. Los resultados descritos han conducido a la idea de que la producción de la PRL en el hipotálamo, al menos en ratas hembra, pudiera ser regulada por los niveles de estrógenos séricos.

Con el objetivo de evaluar esta hipótesis, ratas hembra fueron sacrificadas en distintas fases del ciclo estral, y sus cerebros procesados por la técnica de inmunofluorescencia para la detección de la PRL 16 kDa. En concordancia con los resultados previamente descritos, y obtenidos a través de la técnica de inmunoperoxidasa, solamente las neuronas magnocelulares y las fibras asociadas al sistema hipotálamo-neurohipofisario mostraron inmuno-reactividad para la PRL 16 kDa en los cerebros procesados en distintas fases del ciclo estral. Por otro lado, se observó una variación aparente en el número de neuronas positivas para la PRL 16 kDa en el núcleo paraventricular a lo largo del ciclo estral. Un mayor número de células inmuno-reactivas para la PRL 16 kDa fueron observadas en este núcleo durante las fases de proestro y estro, mientras que lo opuesto fue observado en el diestro. Estas diferencias fueron también evidentes en la eminencia media, región que concentra la fibras el sistema hipotálamo-neurohipofisario en su paso hacia la neurohipófisis, y ausentes en el núcleo supraóptico. Nuestras observaciones, aunque aún preliminares, apoyan la idea de que los niveles séricos

de estrógenos pudieran regular la producción de la proteína tipo PRL 16 kDa en el hipotálamo de las ratas hembra.

El mecanismo por el que los estrógenos pudieran ejercer sus efectos sobre la producción de la proteína tipo PRL 16 kDa en el núcleo paraventricular, sin embargo, aún es incierto. No obstante ello, estudios autoradiográficos previos han demostrado la presencia de receptores para estrógenos en las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico (163, 167, 177, 181). Es interesante el hecho de que el núcleo paraventricular, y no el núcleo supraóptico, parece ser especialmente rico en receptores para estrógenos (167, 177). Esta diferencia en la densidad de los receptores para estrógenos pudiera explicar el porqué los efectos del ciclo estral sobre la producción de la proteína tipo PRL 16 kDa son más notorios en el núcleo paraventricular que en el núcleo supraóptico a lo largo del ciclo estral. Así mismo, en apoyo a que los estrógenos pudieran tener un efecto sobre las neuronas magnocelulares hipotalámicas, recientemente se han demostrado variaciones en la actividad y morfología de estas células durante las distintas fases del ciclo estral (137, 138), y cambios en su morfología como consecuencia de la ovariectomía en la rata (35). También ha sido documentado que los niveles séricos de estrógenos modifican la liberación de oxitocina y vasopresina, hormonas ambas producidas por las neuronas magnocelulares hipotalámicas (167).

La respuesta diferencial de las neuronas magnocelulares en los núcleos paraventricular y supraóptico a los estrógenos, por otro lado, no parece ser un fenómeno aislado. Respuestas heterogéneas de las neuronas magnocelulares localizadas en estos núcleos han sido descritas después de la estimulación osmótica (136). Estudios previos han demostrado que la expresión del ARN mensajero para la vasopresina (22, 122, 180), así como la acumulación de citidina (73) y tirosina (134) triplicadas después de la ingestión de soluciones hipertónicas de cloruro de sodio, es mayor en el núcleo supraóptico que en el núcleo paraventricular de la rata. Así mismo, la estimulación osmótica eleva los niveles de expresión del factor de crecimiento insulina tipo I en el núcleo supraóptico, pero no en el núcleo

paraventricular (1). Las respuestas diferenciales de ambos núcleos hipotalámicos a distintos estímulos pudieran resultar de las diferencias en la organización intrínseca de los núcleos paraventricular y supraóptico (1).

En base a las observaciones anteriores, parece factible que la producción de la proteína tipo PRL 16 kDa en las neuronas magnocelulares hipotalámicas, al menos en el núcleo paraventricular de las ratas hembra, pudiera ser regulada por los niveles de estrógenos séricos a través de receptores específicos localizados en estas células. Adicionalmente, es interesante especular acerca de que los estrógenos pudieran incrementar la producción de la proteína tipo PRL 16 kDa en el hipotálamo facilitando la expresión del gen de la PRL, cuyo ARN mensajero ha sido detectado en homogenados del núcleo paraventricular (30), a través de los elementos responsivos a los estrógenos localizados en el extremo 5' de este gen (116, 117).

El significado biológico de las variaciones observadas durante el ciclo estral en la inmuno-reactividad tipo PRL 16 kDa en el núcleo paraventricular de la rata es aún desconocido. Es posible, sin embargo, que las variaciones de esta proteína pudieran estar asociadas a cambios en el balance hidroelectrolítico durante el ciclo estral (167). En apoyo a esta posibilidad, evidencia reciente ha demostrado que la PRL 16 kDa incrementa la excreción renal de sodio después de su administración sistémica (Clapp y Samson, resultados inéditos). Se ha sugerido que este efecto pudiera ser mediado por receptores específicos localizados en la membrana celular del epitelio renal (26). Además, desde hace tiempo se sabe que las neuronas magnocelulares participan en la regulación de las concentraciones de electrolitos y agua séricos, a través de la liberación de la vasopresina cuya secreción también parece estar regulada por los niveles séricos de estrógenos (167).

En conclusión, estos resultados preliminares sugieren que fluctuaciones de los niveles séricos de estrógenos a lo largo del ciclo estral pudieran ser responsables de las fluctuaciones en la producción de la proteína tipo PRL 16 kDa observada en el núcleo

paraventricular de la rata hembra. Mayores estudios se requieren para documentar y confirmar esta posibilidad.

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

Bibliografia

1. Aguado F, Rodrigo J, Cacicedo L, Mellstrom B (1993) Distribution of insulin growth factor I receptor mRNA in the rat brain. Regulation in the hypothalamo-neurohypophysial system. *J. Mol. Endo.* 11: 231.
2. Abdel-Meguid SS, Shieh HS, Smith WW, Dayringer HE, Violand BN, Bentle LA (1987) Three-dimensional structure of a genetically engineered variant of porcine growth hormone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 6434.
3. Alonso G, Assenmacher I (1981) Radioautographic studies on the neurohypophysial projections of the supraoptic and paraventricular nuclei in the rat. *Cell. Tissue Res.* 219: 525.
4. Alonso G, Siaud P, Faivre-Sarrailh C, Grouselle D, Barbanel G, Assenmacher I (1988) Axons containing a prolactin-like peptide project into the perivascular layer of the median eminence: An immunocytochemical light and electron microscope study in adult and infant rats. *Neuroendocrinol.* 48: 39.
5. Andries M, Tilemans D, Denef C (1992) Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in the rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochem. J.* 281: 393.
6. Arey BJ, Freeman ME (1989) Hypothalamic factors involved in the endogenous stimulatory rhythm regulating prolactin secretion. *Endocrinology* 124: 878.
7. Aspeslagh MR, Vandesande F, Dierickx K (1976) Electron microscopic immunocytochemical demonstration of separate neurophysin-vasopressinergic and neurophysin-oxytocinergic nerve fibers in the neural lobe of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 171: 31.
8. Aston R, Ivanyi J (1983) Antigenic receptors binding and mitogenic activity of proteolytic fragments of human growth hormone. *EMBO J.* 2: 493.
9. Azad N, Duffner L, Paloyan EB, Reda D, Kirsteins L, Emanuele NV, Lawrence AM (1990) Hypothalamic prolactin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from male rat hypothalamus. *Endocrinology* 127: 1928
10. Ballard PL (1986) Hormones and lung maturation. *Monogr. Endocrinol.* 28:1.
11. Baldocchi RA, Tan L, Nicoll CS (1992) Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum in vitro. *Endocrinology* 130: 165.
12. Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS (1993) Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: Evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*

13. Barash I, Madar Z, Gertler A (1992) Short-term in vivo regulation of prolactin receptors in the liver, testes, kidneys, and mammary gland of rats. *Receptor* 2: 39.

14. Barkey RJ, Weiss-Messer E, Hacham H, Herscovitch S, Ber R, Amit T (1994) Prolactin and testicular Leydig cell function: Characterization of prolactin receptors in the murine MA-10 testicular Leydig cell line. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 206: 243.

15. Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Hyde JF (1989) Neuroendocrine regulation of prolactin release. *Prog. Neurobiol.* 33: 399.

16. Berwaer M, Monget P, Peers B, Mathy-Hartert M, Bellefroid E, Davis JR, Belayew A, Martial JA (1991) Multihormonal regulation of the human prolactin gene expression from 5000 bp of its upstream sequence. *Mol. Cell Endocrinol.* 80: 53.

17. Berwaer M, Martial JA, Davis JR (1994) Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 8: 635.

18. Boersma CJC, Van Leeuwen FW (1994) Neuron-glia interactions in the release of oxytocin and vasopressin from the rat neural lobe: the role of opioids, other neuropeptides and their receptors. *Neurosci.* 62: 1003

19. Brooks CL, Isaacs LA, Wicks JR (1994) Preparative purification of phosphorylated and non-phosphorylated bovine prolactins. *Mol. Cell Endocrinol.* 99: 301.

20. Bridges RS, Mann PE (1994) Prolactin brain interactions in the induction of maternal behavior in rats. *Psychoneuroendocrinology* 19: 611.

21. Buntin JD, Ruzycski E, Witebsky J (1993) Prolactin receptors in dove brain: autoradiographic analysis of binding characteristics in discrete brain regions and accessibility to blood-borne prolactin. *Neuroendocrinology* 57: 738.

22. Burbach JPH, De Hoop MJ, Schmale H, Richter D, De Kloet ER, Ten Haaf JA, De Wied D (1984) Differential responses to osmotic stress of vasopressin-neurophysin mRNA in hypothalamic nuclei. *Neuroendocrinology* 39:582.

23. Chiu S, Wise PM (1994) Prolactin receptor mRNA localization in the hypothalamus by in situ hybridization. *J. Neuroendocrinol.* 6: 191.

24. Chuang TT, Caccavelli L, Kordon K, Enjalbert A (1993) Protein kinase C regulation of prolactin gene expression in lactotroph cell: involvement in dopamine inhibition. *Endocrinology* 132: 832.

25. Clapp C, Sears PS, Russel DH, Richards J, Levay-Young BK, Nicoll C.S. (1988) Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122: 2892.

26. Clapp C, Sears PS, Nicoll CS (1989) Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* 125: 1054.

27. Clapp C, Weiner RI (1992) A specific, high affinity, storable binding site for 16 kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 130: 1380.
28. Clapp C (1987) Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121: 2055.
29. Clapp C, Martial J, Rentier-Delrue F, Guzman RC, Weiner RI (1993) Human 16K prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133: 1292.
30. Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, Alcántara E, López F, Nagano M, Kelly P, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamoneurohypophyseal system and the protein is processed into a 14kDa fragment with activity like 16KkDa prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 10384.
31. Cooke EN (1995) Prolactin: Basic Physiology. p 368. En: *Endocrinology Vol I*. Ed. DeGroot L. Saunders: Philadelphia.
32. Cole ES, Nichols EH, Lauziere K, Edmunds T, McPherson JM (1991) Characterization of microheterogeneity of recombinant primate prolactin: Implications for posttranslational modifications of the hormone in vivo. *Endocrinology* 129: 2639.
33. Costello LC, Franklin RB (1994) Effects of prolactin on the prostate. *Prostate* 24: 162.
34. Cuello R (1988) *Immunocytochemistry*. Ed. Cuello R. IBRO series NY: John Wiley and sons.
35. Crespo D, Cos S, Fernandez-Viadero C, Gonzalez C (1991) Ultrastructural changes in hypothalamic supraoptic nucleus neurons of ovariectomized estrogen-deprived young rats. *Neurosci. Lett.* 133: 253.
36. Crumeyrolle-Arias M, Latouche J, Jammes H, Djiane J, Kelly PA, Reymond MJ, Haour F (1993) Prolactin receptor in the rat hypothalamus: autoradiographic localization and characterization. *Neuroendocrinology* 57: 457.
37. Dardenne M, Savino W (1994) Prolactin mediated cellular interactions in the thymus. *Ann. NY Acad. Sci.* 741: 100.
38. Davis JR, Hoggard N, Wilson EM, Vidal ME, Sheppard MC (1991) Calcium/calmodulin regulation of the rat prolactin gene is conferred by the proximal enhancer region. *Mol. Endocrinol.* 5: 8.
39. Day RN, Day KH (1994) An alternatively spliced form of Pit-1 represses prolactin gene expression. *Mol. Endocrinol.* 8: 374.
40. Day RN, Maurer RA (1989) The distal enhancer region of the rat prolactin gene contains elements conferring response to multiple hormones. *Mol. Endocrinol.* 3: 3.

41. DeVito WJ, Avakian C, Stone S, Ace CI. (1992) Estradiol increases prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid in selected brain regions in the hypophysectomized female rat. *Endocrinology* 131: 2154.
42. DeVito WJ, Stone S, Avakian C (1991) Prolactin stimulation of protein kinase c activity in the rat hypothalamus. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 176: 660.
43. De Vito WJ, Avakian C, Stone S, Okulics WC (1993) Prolactin stimulated mitogenesis of cultured astrocytes is mediated by a protein kinase c dependent mechanism. *J. Neurochem.* 60: 832.
44. De Vito WJ, Okulics WC, Stone S, Avakian C (1993) Prolactin stimulated mitogenesis of cultures astrocytes. *Endocrinology* 130: 2549.
45. DeVito WJ, Avakian C, Stone S (1992) Proteolytic modification of prolactin by the female rat brain. *Neuroendocrinology* 56: 597.
46. DeVito WJ (1988) Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: Effects of hypophysectomy and intraventricular administration of cochlincine. *Neuroendocrinol.* 47: 284.
47. DeVito EJ (1988) Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 150: 599.
48. DeVito WJ (1989) Immunoreactive prolactin in the hypothalamus and cerebrospinal fluid of male and female rats. *Neuroendocrinol.* 50: 182.
49. DeVito WJ (1989) Comparison of brain and pituitary immunoreactive prolactin by peptide mapping and lectin affinity chromatography. *Neuroendocrinol.* 125: 5.
50. DeVito WJ, Connors JM, Hedge GA (1987) Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: In vitro release and subcellular localization. *Neuroendocrinol.* 46: 155.
51. DeVito WJ, Stone S, Avakian C (1991) Stimulation of hypothalamic prolactin release by veratridine and angiotensin II in the female rat: Effect of ovariectomy and estradiol administration. *Neuroendocrinol.* 54: 391.
52. Dicks P, Russel AJ, Lincoln GA (1994) The role of prolactin in the reactivation of hair follicles in relation to moulting in cashmere goats. *J. Endocrinol.* 143: 441.
53. Di Mattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG (1988) A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin.
54. Di Carlo R, Muccioli G, Papotti M, Bussolati G (1992) Characterization of prolactin receptor in human and choroid plexus. *Brain Res.* 570: 1992.
55. DiMattia GE, Gellersen B, Duckworth ML, Friesen HG (1990) Human prolactin gene expression. The use of an alternative noncoding exon in decidua and the IM-9-P3 lymphoblast cell line. *J. Biol. Chem.* 265: 16412.

56. Dube D, Kelly PA, Pelletier G (1980) Comparative localization of prolactin-binding sites in different rat tissues by immunohistochemistry, radioautography and radioreceptor assay. *Mol. Cell. Endocrinol.* 18: 109.
57. Duncan MJ, Goldman BD (1985) Physiological doses of prolactin stimulate melanocyte pigmentation in Djungarian hamster. *Am. J. Physiol.* 248: R664.
58. Ellis L, Picciano MF (1993) Prolactin variants in term and preterm human milk: altered structural characteristics, biological activity and immunoreactivity. *Endocr. Regul.* 27: 181.
59. Elsholtz HP, Majumdar SS, Xiong F, Gong Z, Hew CL (1992) Phylogenetic specificity of prolactin gene expression with conservation of Pit-1 function. *Mol. Endocrinol.* 6: 515.
60. Elsholtz HP, Lew AM, Albert PR, Sundmark VC (1991) Inhibitory control of prolactin and Pit-1 gene promoters by dopamine. *J. Biol. Chem.* 266: 22919.
61. Emanuele NV, Metcalf L, Wallock L, Tentler J, Hagen TC, Beer CT, Martinson D, Gout PW, Kirsteins L, Lawrence AM (1986) Hypothalamic prolactin: Characterization by radioimmunoassay and bioassay and response to hypophysectomy and restraint stress. *Neuroendocrinol.* 44: 217.
62. Emanuele NV, Metcalf L, Wallock L, Tentler J, Hagen TC, Beer CT, Martinson D, Gout PW, Kirsteins L, Lawrence AM (1987) Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from prolactin. *Brain Res.* 421: 255.
63. Emanuele NV, Azad N, Luckey JP, Engel J, Melon G, Metcalf L, Gout PW, Beer CT, Kirsteins L, Lawrence AM (1989) Presence of prolactin-like immunoreactivity and bioactivity in rat spinal cord. *Neuroendocrinol.* 49:331.
64. Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR (1992) The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol. Endocrinol.* 6: 35.
65. Etindi RN, Rillema JA (1987) Effects of kinase C inhibitor, gossypol, on the actions of prolactin in cultured mouse mammary tissues. *Biochem. Biophys. Acta* 927: 345.
66. Fan G, Rillema JA (1993) Effects of the protein phosphatase inhibitor okadaic acid on the actions of prolactin in cultured mouse mammary gland explants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203: 501.
67. Fan G, Rillema JA (1992) Effect of a tyrosine kinase inhibitor, genistein, on the actions of prolactin in cultured mouse mammary tissues. *Mol. Cell Endocrinol.* 83: 51.
68. Ferrara N, Clapp C, Weiner RI (1993) The 16Kd fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129: 896.
69. Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrine Rev.* 13: 18.
70. Fuxe K, Hokfelt T, Eneroth P, Gustafsson JA, Skett P (1976) Prolactin-like immunoreactivity: Localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* 196: 899.

71. Gagnerault MC, Touraine P, Savino W, Kelly PA, Dardenne M (1993) Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J. Immunol.* 150: 5673.
72. Gellersen B, Kempf R, Hartung S, Bonhoff A, DiMattia GE (1992) Posttranscriptional regulation of human prolactin gene in IM-9-P3 cells by retinoic acid. *Endocrinology* 131: 1017.
73. George JM (1973) Localization in hypothalamus of increased incorporation of ³H cytidin into RNA in response to oral hypertonic saline. *Endocrinology* 92: 1550.
74. Gellersen N, Bonhoff A, Hunt N, Bohnet HG (1991) Decidual type prolactin expression by the human myometrium. *Endocrinology* 129: 158.
75. Golander A, Hurley T, Barret J, Hize A, Handwerger S (1978) Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Science* 202: 311.
76. Golander A, Hurley T, Barret J, Handwerger S (1979) Synthesis of prolactin by human decidual in vitro. *J. Endocrinol.* 82: 263.
77. Gonzalez SI, Suescun MO, Rulli SB, Estivariz F, Calandra RS (1994) Modulation of ornithine decarboxylase activity by prolactin in seminal vesicles of the rat. *Int. J. Androl.* 17: 143.
78. Gubbins EJ, Maurer RA, Lagrimini M, Erwin CR, Donelson JE (1980) Structure of the rat prolactin gene. *J. Biol. Chem.* 255: 8655.
79. Gutierrez MA, Anaya JM, Cabrera GE, Vindrola O, Espinoza LR (1994) Prolactin, a link between the neuroendocrine and immune systems. *Rev. Rhum. Ed. Fr.* 61: 278.
80. Handwerger S, Harman I, Golander A, Handwerger DA (1992) Prolactin release from perfused human decidual explants; effects of decidual prolactin-releasing factor and prolactin release-inhibitory factor. *Placenta* 13: 55.
81. Hansen BL, Hanse GN, Hagen C. Immunoreactive material resembling ovine prolactin in perikarya and nerve terminals of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 226: 121.
82. Harlan RE, Shivers BD, Fox SR, Kaplove AK, Schachter BS, Pfaff D (1989) Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinol.* 49: 7.
83. Harlan RE, Shivers BD, Pfaff DW (1983) Midbrain microinfusions of prolactin increase the estrogen-dependent behavior, lordosis. *Science* 219: 1451.
84. Harlan RE, Scamell JG (1991) Absence of pituitary prolactin epitopes in immunoreactive prolactin of the rat brain. *J. Histochem. Cytochem.* 39: 221.
85. Hiraoka Y, Tatsumi K, Shiozawa M, Aiso S, Fukasawa T, Yasuda K, Miyai K (1991) A placenta-specific 5' non-coding exon of human prolactin. *Mol. Cell. Endocrinol.* 75: 71.

86. Hoshino K (1988) Biological effects of prolactin on spermatozoa, oocytes and fertilization. p1. En: Prolactin gene family and its receptors. Ed. Hoshino K. Holanda: Elsevier.
87. Iwata H, Matsuyama A, Okumura N, Yoshida S, Lee Y, Imaizumi K, Shiosaka S (1991) Localization of basic FGF-like immunoreactivity in the hypothalamo-hypophyseal neuroendocrine axis. *Brain Res.* 550: 329.
88. Jacobs LS, Lorenson MY (1986) Cysteamine, zinc, and thiols modify detectability of rat pituitary prolactin: a comparison with effects on bovine prolactin suggests differences in hormone storage. *Metabolism* 35: 209.
89. Jacobowitz DM (1988) Multifactorial control of pituitary hormone secretion: The Wheels of the brain. *Synapse* 2: 186.
90. Jackson AE, Bandyopadhyay SK, Bancroft C (1990) Epidermal growth factor and phorbol ester regulate prolactin gene expression via distinct pathways. *Mol. Cell Endocrinol.* 69: R7.
91. Jackson AE, Bancroft C (1988) Proximal upstream flanking sequences direct calcium regulation of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 2: 1139.
92. Kamel MA, Neulen J, Sayed GH, Salem HT, Breckwoldt M (1993) Heterogeneity of human prolactin levels in serum during early postpartum period. *Gynecol. Endocrinol.* 7: 173.
93. Kelly PA (1993) Domains of the growth hormone receptor involved in ligand binding and signal transduction. Workshop on neuroendocrinology of growth. p 19 : Resumen
94. Kelly PA, Djian J, Postel-Vinay MC, Ederly M (1991) The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Rev.* 12: 235.
95. Kelly PA, Djian J, Boutin JM, Jolicoeur C, Ederly M (1988) Molecular cloning and expression of prolactin receptors. p 71. En: Prolactin gene family and its receptors. Ed. Hoshino K. Holanda: Elsevier
96. Kim BG, Brooks CL (1993) Isolation and characterization of phosphorylated bovine prolactin. *Biochem. J.* 296: 41.
97. Koduri PB, Rillema JA (1993) Effects of cholera and pertussis toxins on prolactin stimulation of actose synthesis and ornithin decarboxylase activity in mouse mammary gland explants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 203: 424.
98. Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI (1994) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. p 1621. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E y Neill JD. New York: Raven Press.
99. Krieger DT, Brownstein MV, Martin JB (1993) *Brain Peptides*. John Wiley and sons., USA: New York.
100. Krieger D (1981) Pituitary hormones in the brain: What is their function. *FASEB J.* 39: 2937.

101. Kumar V, Wong DT, Pasion SG, Biswas DK (1987) Defective distal regulatory element at 5'upstream of rat prolactin gene of steroid-nonresponsive GH-subclone. *Biochem. Biophys. Acta* 910:213.
102. Kurosumi K (1988) Ultrastructural modification in prolactin producing cells in the adenohypophysis during postnatal development in functional variations. p 289. En: *Prolactin gene family and its receptors*. Ed. Hoshino K. Holanda: Elsevier
103. Lai Z, Roose P, Olsson Y, Larsson C, Nyberg F (1992) Characterization of prolactin receptors in human choroid plexus. *Neuroendocrinology* 56: 225.
104. Larrea F, Mendez I, Parra A, Espinoza de los Monteros A (1993) Serum pattern of different molecular forms of prolactin during normal human pregnancy. *Hum. Reprod.* 8: 1617.
105. Leboucher G, Richard-Yris MA, Guemene D, Chadwick A (1993) Respective effects of chicks and nest on behavior and hormonal concentrations of incubating domestic hens. *Physiol. Behav.* 54: 135
106. Leite V, Cosby H, Sobrinho LG, Fresnoza MA, Santos MA, Friensen HG (1992) Characterization of big, big prolactin in patients with hyperprolactinemia. *Clin. Endocrinol.* 37: 365.
107. LeProvost F, Leroux C, Martin P, Gaye P, Djiane J (1994) Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland. *Neuroendocrinology* 60: 305.
108. Lewis UJ, Singh NF, Vanderlaan WF, Tutwiler GF (1977) Enhancement of hyperglycemic activity of human growth hormone by enzymatic modification. *Endocrinology* 101: 1587.
109. Liang J, Kim KE, Schoderbek WE, Maurer RA (1992) Characterization of a non-tissue-specific, 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-responsive element in the proximal region of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 6: 885.
110. Linebaugh BE, Rillema JA (1991) Polyamine influences on the prolactin stimulation of phosphoprotein synthesis in hydroxyurea synchronized MCF-7 human mammary epithelial cells. *Horm. Metab. Res.* 23: 414.
111. López-Gómez F, Torner L, Mejía S, Martínez de la Escalera G, Clapp C (1994) El sistema hipotálamo-neurohipofisario contiene un fragmento de prolactina con efectos antiangiogénicos. *Soc. Mex. Ciencias Fisiol.* 082.

112. Luck DN, Gout PW, Beer CT, Smith M (1988) Bioactive recombinant bovine prolactin: Use of site-specific mutagenesis in structure-function analysis. p99. En: Prolactin gene family and its receptors. Ed. Hoshino K. Holanda; Elsevier.
113. Luck DN, Gout PW, Beer CT, Smith M (1989) Bioactive recombinant methyonin bovine prolactin: Structure-function studies using site specific mutagenesis. Mol. Endocrinol. 3: 822.
114. Martínez-Barranco T, Gutiérrez-Ospina G, Martínez de la Escalera G, Clapp C (1990) Estudios preliminares de los sitios de unión de la prolactina 16K en el sistema nervioso central. Soc. Mex. Ciencias Fisiol. C120.
115. Maurer R, Erwin CR, Donelson JE (1981) Analysis of 5' flanking sequences and intron-exon boundaries of the rat prolactin gene. J. Biol. Chem. 256: 10524.
116. Maurer RA (1985) Selective binding of estradiol receptor to a region at least one kb upstream from the rat prolactin gene. DNA 4:1.
117. Maurer RA, Notides AC (1987) Identification of an estrogen-responsive element from the 5' flanking region of the rat prolactin gene. Mol. Cell Biol. 7: 4247.
118. Mena F, Hummett G, Aguayo D, Clapp C, Martínez de la Escalera G, Morales MT (1992) Changes in molecular variants during *in vitro* transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. Endocrinology 130: 3365.
119. Meister B, Jacobson G, Elde R (1992) Observations on the localization of prolactin receptor mRNA in rat tissues as revealed by *in situ* hybridization. Acta Physiol. Scand. 146: 533.
120. Meites J (1988) Biological functions of prolactin in mammals. In: Prolactin gene family and its receptors. pp123-130. Ed. Hoshino K. New York; Elsevier.
121. Meites J (1977) Neuroendocrine control of prolactin in experimental animals. Clin. Endocrinol. 6 suppl: 95
122. Mekker RB, Greenwood RS, Hayward JN (1991) Vasopressin mRNA expression in individual magnocellular neuroendocrine cells of the supraoptic and paraventricular nucleus in response to water deprivation. Neuroendocrinology 54: 236.
123. Mikkelsen JD, Schmidt P, Sheikh SP, Larsen PJ (1992) Non-vasopressinergic, non-oxytocinergic neuropeptides in the rat hypothalamo-neurohypophyseal tract: experimental immunohistochemical studies. Prog. Brain Res. 91: 367.
124. Mittra I (1980) A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. I. Biochem. Biophys. Res. Comm. 95: 1750.

125. Mitra I (1980) A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 95: 1760.
126. Muccioli G, Ghe C, Di Carlo R (1991) Distribution and characterization of prolactin binding sites in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and ovariectomy. *Neuroendocrinology* 53: 47.
127. Montgomery DW, Zukoski CF, Shah GN, Buckley AR, Pacholczyk T, Russell DH (1987) Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 145: 692.
128. Montgomery DW, Leftevre JA, Ulrich ED, Adamson CR, Zukoski CF (1990) Identification of prolactin like proteins synthesized by normal murine lymphocytes. *Endocrinology* 127: 2601.
129. Montgomery DW, Shah GN, Zukoski CF, Buckley AR, Laird HE, Pacholczyk T, Russell DH (1994) A novel prolactin is synthesized by murine splenocytes during immune responses (en prensa).
130. Montgomery DW, Shen GK, Ulrich ED, Steiner LL, Parrish PR, Zukoski CF (1992) Human thymocytes express a prolactin like mRNA and synthesized bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* 131: 3019.
131. Moran C, Tena G, Fonseca ME, Ochoa R, Bermudez JA, Zarate A (1994) Changes in the prolactin serum isoforms secreted by a pituitary adenoma associated to therapy. *Arch. Med. Res.* 25: 1.
132. Mori C, Harigaya T, Hoshino K, Fukuda A (1988) Effects of mouse prolactin on acrosomal reaction of spermatozoa in mice in vitro. p183. En: *Prolactin gene family and its receptors*. Ed. Hoshino K. Holanda: Elsevier.
133. Murakami H, Ike F, Kohomoto K, Sakai S (1988) Monoclonal antibody detection of prolactin-binding subunits in the rabbit mammary gland. *Biochem. J.* 256: 917.
134. Murray M (1967) Effects of dehydration on incorporation of 3H-tyrosine by some hypothalamic neurons in the rat. *Exp. Neurol.* 19: 212.
135. Neill JD, Nagy GM (1994) Prolactin secretion and its control. p1833. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds. Knobil E y Neill JD. New York: Raven Press.
136. Negro-Vilar A, Samson WK (1979) Dehydration-induced changes in immunoreactive vasopressin levels in specific hypothalamic structures. *Brain Res.* 169: 585.
137. Negro H, Visessuwan S, Holland RC (1973) Unit activity in the paraventricular nucleus of female rats at different stages of the reproductive cycle and after ovariectomy, with or without oestrogen or progesterone treatment. *J. Endocrinol.* 59: 545.
138. Negro H, Visessuwan S, Holland RC (1973) Reflex activation of paraventricular nucleus units during the reproductive cycle and in ovariectomized rats treated with oestrogen or progesterone. *J. Endocrinol.* 59: 559.

139. Nicoletti I, Gerli R, Orlandi S, Migliorati G, Rambotti P, Riccardi C. (1989) Defective natural killer cell activity in pureperal hyperprolactinemia. *J. Reprod. Immunol.* 15: 113.
140. Nicoll CS (1974) Physiological actions of prolactin. In: *Handbook of Physiology, Vol 1, II.* pp 253-393. Ed. Knobil E, Sawyer WH. Washington DC : Am. Physiol. Soc.
- 141 Nicoll CS (1980) Ontogeny and evolution of prolactin functions. *Fed. Proc.* 39: 2563.
142. Nicoll CS, Mayer GL, Russell SM (1986) Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* 7: 169
143. Nielsen JH, Moldrup A, Billestrup N, Petersen ED, Allevato G, Stahl M (1992) The role of growth hormone and prolactin in beta cell growth and regeneration. *Adv. Exp. Med. Biol.* 321: 9.
144. Nishizuka M, Shivers BD, Leranath C, Pfaff D (1990) Ultrastructural characterization of prolactin-like immunoreactivity in rat medial basal hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 51: 249
145. Nolin JM (1982) Molecular homology between prolactin and ovarian peptides: Evidence for physiologic modification of the parent molecule by the target. *Peptides* 3: 823.
146. Obal F, Payne L, Kacsob B, Opp M, Kapas L, Grosvenor CE, Krueger JM (1994) Involvement of prolactin in REM sleep-promoting activity of systemic vasoactive intestinal peptide (VIP). *Brain Res.* 645: 143.
147. Oetting WS, Walker AM (1985) Intracellular processing of prolactin. *Endocrinology* 117: 1565.
148. Ofenstein JP, Rillema JA (1987) Possible involvement of the phospholipases in the mitogenic actions of prolactin on NB2 node lymphoma cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 185: 147.
149. Okamura H, Raguet S, Bell A, Gagnon J, Kelly PA (1989) Purification and protein sequence analysis of rat liver prolactin receptor. *J. Biol. Chem.* 264: 5904.
150. Oneal KD, Montgomery DW, Truong TM, Yu Lee LY (1992) Prolactin gene expression in human thymocytes. *Mol. Cell Endocrinol.* 87: r19.
151. Ormandy CJ, Sutherland RL (1993) Mechanism of prolactin receptor regulation in mammary gland. *Mol. Cell. Endocrinol.* 91: 1993.
152. Oseko F, Morikawa K; Nakano A, Taniguchi A (1993) Biosynthesis and secretory regulation of pituitary prolactin. *Nippon-Rinsho* 51: 2592.
153. Ostrom KM (1990) A review of hormone prolactin during lactation. *Prog. Food Nutr. Sci.* 14:1.

154. Ouhitit A, Morel G, Kelly PA (1993) Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat reproductive tissues. *Biol. Reprod.* 49: 528.
155. Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Sjows TB (1981) The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* 212: 815.
156. Palkovits (1980) Topography of chemically identified neurons in the central nervous system: progress in 1977. *Med. Biol.* 58: 188.
157. Parlow AF, Shome B (1976) Rat prolactin: the entire linear aminoacid sequence. *Fed. Proc.* 35: 219.
158. Paulsen EJ, Alestrom P, Johansen BT, Kriz M, Philipson L, Gautvik KM (1986) Novel prolactin related mRNAs in rat pituitary cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 138: 1015.
159. Paut-Pagano L, Roky R, Valatx J-L, Kitahama K, Jouvett M (1993) Anatomical distribution of prolactin-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroendocrinology* 58: 682.
160. Peabody CA, Warner MD, Griffin M, Boutros NN, Worsley IG, Friensen HG (1992) Prolactin bioassay in schizophrenia before and after neuroleptics. *Psychiatry Res.* 41: 249.
161. Pelletier G (1991) Anatomy of the hypothalamic-pituitary axis. *Meth. Achiev. Exp. Pathol.* 14: 1.
162. Perez-Villamil B, Bordiu E, Puente-Cueva (1992) Involvement of physiological prolactin levels in growth and prolactin receptor content of prostate glands and testes in developing male rats. *J. Endocrinol.* 132: 449.
163. Pfaff D, Keiner M (1973) Atlas of estradiol-concentrating cells in the central nervous system of the female rat. *J. Comp. Neurol.* 151: 121
164. Rayhel EJ, Hughes JP, Svihla DA, Prentice DA (1990) Growth and protein phosphorylation in NB2 lymphoma: effects of prolactin, cAMP, and agents that activate adenylate cyclase. *J. Cell Biochem.* 43: 327.
165. Rillema JA, Etindi RN, Ofenstein JP, Waters SB (1988) Mechanisms of prolactin action. In: *The physiology of reproduction*. p. 2217. Eds. Knobil E, Neill J. New York : Raven press.
166. Rillema JA, Etindi RN, Cameron CM (1986) Prolactin actions on casein and lipid biosynthesis in mouse and rabbit mammary gland explants are abolished by p-bromophenacyl bromide and quinacrine, phospholipase A2 inhibitors. *Horm. Met. Res.* 18: 672.

167. Rhodes CH, Morrell JJ, Pfaff DW (1982) Estrogen-concentrating neurophysin-containing hypothalamic magnocellular neurons in the vasopressin-deficient (Brattleboro) rat: a study combining steroid autoradiography and immunocytochemistry. *J. Neurosci.* 2: 1718.
168. Robertson MT, Boyajian MJ, Patterson K, Robertson WV (1986) Modulation of chloride concentration of human sweat by prolactin. *Endocrinology* 119: 2439.
169. Robyn C, Meuris S (1988) The state of the art in human prolactin. p 29. En: *Prolactin gene family and its receptors*. Ed. Hoshino K. Holanda: Elsevier.
170. Roky R, Valatx JL, Paut-Pagano L, Jouvett M (1994) Hypothalamic injection of prolactin or its antibody alters the rat sleep-wake cycle. *Physiol. Behav.* 55: 1015.
171. Romero C, Leon J, Jara R, Gonzalez O (1993) Importancia de las isoformas de prolactina sobre la función ovárica en mujeres hiperprolactinémicas. *Rev. Chil. Ginecol.* 58: 465.
172. Rose J, Wert C (1993) Prolactin binding sites in the adrenal glands of mink (*Mustela vison*). *Comp. Biochem. Physiol.* 104: 759.
173. Rose J, Huang JL, Mcad RA (1993) Role of the ovarian steroids in the development of uterine binding sites for prolactin in the ferret. *Biol. Reproduc.* 48: 1266.
174. Rubinshtein AI, Pankov IA (1990) Features of structure-activity organization of prolactin. *Mol. Biol. Mosk.* 24: 1562.
175. Sakae K, Kazutoshi Y (1988) Prolactin and amphibian metamorphosis. p 359. En: *Prolactin gene family and its receptors*. Ed. Hoshino K. Holanda: Elsevier.
176. Sanchez-Criado JE, van der Schoot P, Uilenbroek JT (1988) Evidence for luteotropic and antiluteolytic actions of prolactin in rats with 5-day oestrous cycles. *J. Endocrinol.* 117:455.
177. Sar M, Stumpf WE (1980) Simultaneous localization of 3H-estradiol and neurophysin I or arginine vasopressin in the hypothalamic neurons demonstrated by combined technique of dry-mount autoradiography and immunohistochemistry. *Neurosci. Lett.* 17: 179.
178. Seyfred MA, Gorski J (1990) An interaction between the 5' flanking distal and proximal regulatory domains of rat prolactin gene is required for transcriptional activation by estrogens. *Mol. Endocrinol.* 4: 1226.
179. Schachter BS, Durgerian S, Harlan RE, Pfaff DW, Shivers BD (1984) Prolactin mRNA exists in the rat hypothalamus. *Endocrinology* 114: 1947.

180. Sherman TG, McKelvy JF, Watson SJ (1986) Vasopressin mRNA regulation in individual hypothalamic nuclei: northern and in situ hybridization analysis. *J. Neurosci.* 6:1685.
181. Shivers BD, Harlan RE, Pfaff D (1989) A subset of neurons containing immunoreactive prolactin is a target for estrogen regulation of gene expression in rat hypothalamus. *Neuroendocrinol.* 49: 23.
182. Shull JD (1991) Transcription of sequences upstream of the rat prolactin gene suggests the existence of a second promoter. *Mol. Cell Endocrinol.* 82: R17.
183. Siaud P, Manzoni O, Balmefrezol M, Barbanel I, Assenmacher I, Alonso G (1989) The organization of prolactin-like immunoreactive neurons in the rat central nervous system (1989) *Cell Tissue Res.* 255: 107
184. Sinha YN (1992) Prolactin variants. *Trends Endocrinol. Metab.* 3: 100
185. Silverman AJ (1983) Magnocellular neurosecretory system. *Ann Rev. Neurosci.* 6: 357.
186. Soares MJ, Faria TN, Roby KF, Deb S (1991) Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary uterine and placental expression. *Endocrine Rev.* 12: 402.
187. Sobrinho LG (1991) Neuropsychiatry of prolactin: causes and effects. *Baillieres Clin. Endocrinol. Metab.* 5: 119.
188. Somasekhar MB, Gorski J (1988) Two elements of the rat prolactin 5' flanking region are required for its regulation by estrogens and glucocorticoids. *Gene* 69: 13.
189. Soupart A, Buisson L, Prosperit F, Decaux G (1994) Indirect evidence to suggest that prolactin induces salt retention in cirrhosis. *J. Hepatol.* 21: 347.
190. Stanley FM (1992) An element in the prolactin promoter mediates the stimulatory effect of insulin on transcription of the prolactin gene. *J. Biol. Chem.* 267: 16719.
191. Steinmetz RW, Grant AL, Malven PV (1993) Transcription of prolactin gene in milk secretory cells of the rat mammary gland. *J. Endocrinol.* 136: 271.
192. Stroud CM, Deaver DR, Peters JL, Loeper DC, Toth BE, Derr JA, Hymer WC (1992) Prolactin variants in ram adenohypophyses vary with season. *Endocrinology* 130: 311.
193. Swanson LW, Sawchenko PE (1983) Hypothalamic integration: Organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Ann. Rev. Neurosci.* 6: 26
194. Takahashi H, Nabesima Y, Nabesima YI, Ogata K, Takeuchi S (1984) Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA complementary to human decidua prolactin mRNA. *J. Biochem.* 95: 1491.
195. Tobeau G, Desclin J, Pamentier M, Pateels JL (1979) Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J. Endocrinol.* 83: 261.

196. Tobeau G, Desclín J, Parmentier M, Pateels JL (1979) Compared localizations of prolactin-like and adrenocorticotropin immunoreactivities within the brain of the rat. *Neuroendocrinol.* 29: 374.
197. Torner LM (1992) Detección de la prolactina 16K en la circulación e hipófisis de la rata. Tesis para obtener el grado de Maestría. México.
198. Torner L, López-Gómez F, Salvador M, Quintanar A, Martínez de la Escalera G, Clapp C (1994) El sistema hipotálamo-neurohipofisario produce y secreta un antígeno tipo prolactina 16K. *Soc. Mex. Ciencia Fisiol.* O83.
199. Thompson SA (1982) Localization of immunoreactive prolactin in ependyma and circumventricular organs of the rat brain. *Cell Tissue Res.* 225: 79.
200. Vandesande F, Dierickx (1975) Identification of the vasopressin producing and of oxytocin producing neurons in the hypothalamic magnocellular neurosecretory system of the rat. *Cell Tissue Res.* 164: 153.
201. Valatx JL, Paut-Pagano L, Févre-Montange M, Dumas-Milne-Edwards JB, Jovet M (1992) Mice en évidence d'ARN messagers de la prolactine après amplification dans le cerveau du rat. *CR Acad. Sci.* III 315: 295
202. Velkeniers B, Kazemzadeh M, Vanhaelst L, Hooghe-Peters EL (1994) Functional heterogeneity with respect to oestrogen treatment in prolactin cell subpopulation separated by percoll gradient centrifugation. *J. Endocrinol.* 141: 251.
203. Vergara-Aragón P, López-Gómez F, Salazar-Juárez A, Clapp C, Martínez de la Escalera G, Aguilar-Roblero R (1994) Efecto en la ingestión de agua inducida por la microinyección del segmento 16K de la prolactina en el tercer ventrículo cerebral. *Soc. Mex. Ciencias Fisiol.* C55.
204. Vila-Porcile E, Picart R, Tougard C (1994) Adaptation of the reverse hemolytic plaque assay to electron microscopy: a study of the individual secretory activity in prolactin cell subpopulations. *J. Histochem. Cytochem.* 42: 11.
205. Walsh RJ, Mangurian LP, Posner BI (1990) The distribution of lactogen receptors in the mammalian hypothalamus: an in vitro autoradiographic analysis of the rabbit and rat. *Brain Res.* 530: 1.
206. Wang YF, Welker AM (1993) Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of NB2 cell proliferation. *Endocrinology* 133: 2156.
207. Warren DW (1994) Hormonal influences on the lacrimal gland. *Int. Ophthalmol. Clin.* 34: 19.
208. Wilson DM 3d, Emanuele NV, Jurgens JK, Kelley MR (1992) Prolactin message in brain and pituitary of adult male rats is identical: PCR cloning and sequencing of hypothalamic prolactin cDNA from intact and hypophysectomized adult rats. *Endocrinology* 131: 2488.

209. Wong VLY, Compton MM, Witorsch RJ (1986) Proteolytic modification of rats prolactin by subcellular fractions of the lactating rat mammary gland. *Biochem. Biophys. Acta* 881:167.
210. Xiong F, Chin RA, Hew CL (1992) A gene encoding chinook salmon prolactin: gene structure and potential cis-acting elements. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 1: 155.
211. Yasuda A, Itoh H, Kawauchi H (1986) Primary structure of chum salmon prolactins: occurrence of highly conserved regions. *Arch. Biochem. Biophys.* 244: 528.
212. Yasuda A, Yamaguchi K, Kobayashi T, Yamamoto K, Kikuyama S, Kawauchi H (1991) The complete aminoacid sequence of prolactin from bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 83: 218.
213. Zhang R, Buczko E, Tsai-Morris CH, Hu ZZ, Dufau ML (1990) Isolation and characterization of two novel rat ovarian lactogen receptor cDNA species. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 168: 415.