

68

24<sup>3</sup>



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

CAMBIOS POSTRADUCCIONALES DE POLIMERIZACION Y FOSFORILACION ASOCIADOS A LA SECRECION DE PROLACTINA (PRL) ADENOHIPOFISIARIA EN LA RATA LACTANTE.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G A

P R E S E N T A :

TATIANA FIORDELISIO COLL

DIRECTOR DE TESIS: DR. FLAVIO MENA JARA



MEXICO, D. F.

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION REGULAR

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

TESIS CON 1996 FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

# TESIS CON FALLA DE ORIGEN



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrin Baule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:  
Cambios postraduccionales de polimerización y fosforilación asociados a la secreción  
de prolactina (PRL) adenohipofisiaria en la rata lactante.

realizado por Tatiana Fiordeliso Coll

con número de cuenta 8922571-6 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis  
Propietario

Dr. Flavio Mena Jara

Propietario

Dra. Ma. Luisa Fanjul

Propietario

Mtro. Ricardo Hernández Pineda

Suplente

M. en C. Silvia Devars Ramos

Suplente

Dra. Ma. Teresa Morales Guzmán

FACULTAD DE CIENCIAS

Comisión Departamental de Biología

COORDINACIÓN GENERAL  
DE BIOLOGIA

*A mi abuelita Trina*

*A mi mamá y a César por educarme con los ideales y valores  
que han hecho posible que yo desarrolle mi vida.*

*A mi hermana Mariana y a mi primo Paco*

*A Carmelita por su cariño y consejos.*

*A mi papá*

Quiero agradecer al Dr. Flavio Mena, a Tere y a Lolita por haberme enseñado lo necesario para que yo pudiera realizar mi tesis, por haber tenido paciencia y por estar siempre apoyándome; a Silvia Demayo por hacerme entender la biología celular (hecho que realmente aprecio) y por sus comentarios a mi trabajo; a la Dr. Ma. Lucina Janjal por dedicar parte de su tiempo a mi trabajo y a Ricardo por su gran apoyo, paciencia y amistad.

No se porque alguien decidió que este era el momento indicado para que uno hiciera un recuento de su vida y agradeciera a las personas que de una u otra forma han sido parte de ella o de alguna manera han contribuido. Pero el punto aquí no es cuestionar esta norma sino aprovechar el momento para hacer algo que casi nunca se hace que es agradecer a la gente que está cercana por el gramo de arena que ponen para que uno sea lo que es, o logre algo (por que generalmente no lo hacemos solos) así que:

Al pairo (Abraham) por recordarme que afuera hay más cosas y que la paciencia es una virtud que debemos practicar cotidianamente.

A Vite por su gran amistad, apoyo y cariño.

A Mariana por su enorme apoyo, por su paciencia y su cariño

A Mónica, Erica y Andrea quienes me ayudaron en más de una ocasión a entender las materias y hacer múltiples tareas y obviamente por su amistad.

A todos aquellos con los que comparto el sueño y la esperanza de cambiar este país y este mundo, con los que aprendí que la vida no solo está en la academia sino también en la lucha; con los que comencé a aprender política, con los que conformaron esa gran experiencia de la Brigada Universitaria Internacionalista "Lázaro Cárdenas", y espero que siempre, aunque sea en caminos diferentes, recuerden y lleven con ellos la misma esperanza:

Abraham, Paco, Gabi J., Sergio, Carlos, Oscar, Nayax, Sonia, Ximena, Gonzalo, Memo, Hugo, Arturo, Luis Angel, Gabriela, Maritza y Sol.

A todos los que fletándose día y noche en el trabajo, han conseguido que seamos un equipo que mantiene y realiza iniciativas que han hecho posible que la voz del EGM salga y viva, mismos con los que he compartido experiencias chingonísimas, además de la infalible neurosis, pero también el cariño y la fuerza para aguantar con nuestra mejor cara y ánimo todas las condiciones que se han presentado. A estos que hicieron posible La Consulta Nacional por la Paz y la Democracia, que participan en el super equipo de APOYO y sin los cuales nuestro trabajo no pudo ser posible.

Victoria, Shazam; Nadia, Mariana J, Mariana E, Tere, Ruth, Ana, Victoria, Marcela. (las niñas: quince día con día me recuerdan que la tolerancia y la paciencia son habilidades que debemos desarrollar); Beatriz, Rodian, Cac, Anaceli, Angeles, Amanda, Cristina J, Vladimir, Alina, Yayo, Cristina A, Manuel, Aleria, El Che, Anayami, Alfredo, Lu, Claudia, Pablo, Santi, Carlos C, Cinthya, Carolina R, Gasche, Vala, Dodo, Reni, Sergio, Oscar, Inti, Abril, Ximena, Memo, Pavel, Abraham y por supuesto Gloria. (pido una disculpa a aquellos que hayan salido, créanme que no fue intencional).

A Juan, Bruno y Mariano por su amistad.

Y ya para terminar de marcarlos, quiero agradecer enormemente a todos los hombres, mujeres, niños y viejos que hace dos años decidieron dar su vida para abrir nuestro camino y para gritar ¡¡¡A BASTA!! Desde lo más profundo del corazón mexicano. A todos los que luchan por ser humanos y a todos los que con su lucha nos mueven humanos y vivos. Aquellos que no nos dejan olvidar que la dignidad existe y a aquellos pueblos, como el cubano donde viví mi infancia, que han aguantado tanto tiempo de acoso y hostigamiento para demostrar que es posible vivir de otra manera y morir en la lucha por un ideal.

## CONTENIDO

<b>I.- INTRODUCCIÓN</b>	<b>1-38</b>
I. 1.- Reproducción	1
I. 2.- Control neuroendócrino de la reproducción	9
I. 3.- Evolución de la prolactina	17
I. 4.- Características moleculares de la prolactina	19
I. 5.- Acciones fisiológicas y efectos descritos de la hormona	20
I. 6.- Síntesis, condensamiento y secreción de la prolactina	21
I. 7.- Heterogeneidad molecular de la prolactina	33
<b>II.- ANTECEDENTES ESPECÍFICOS</b>	<b>40-41</b>
<b>III.- OBJETIVO</b>	<b>41</b>
<b>IV.- MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>42-46</b>
<b>V.- RESULTADOS</b>	<b>47-48</b>
<b>VI.- DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES</b>	<b>49-53</b>
<b>VII.- BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>54-59</b>

## TABLA DE ABREVIATURAS

Ácido Gamma Amino Butírico	GABA
Adenohipófisis o Hipófisis Anterior	AH
Condiciones No Reductoras	CNR
Condiciones Reductoras	CR
Dithiothreitol	DTT
Dodecil Sulfato de Sodio (detergente)	SDS
Dopamina	DA
Factor de Liberación de la Hormona del Crecimiento	GHRII
Factor de Liberación de la Hormona Estimulante de Tiroides	TRH
Factor de Liberación de la Hormona Luteinizante	LHRH
Hormona Adrenocorticotrópica	ACTH
Hormona Antidiurética o Vasopresina	ADH o VP
Hormona del Crecimiento	GH
Hormona Estimulante de Melanocitos	MSH
Hormona Estimulante de Tiroides	TSH
Hormona Estimulante del Folículo	FSH
Hormona Luteinizante	LH
Inmunolinción	IET
Líptropinas	LPH
Neurohipófisis o Hipófisis Posterior	NH
Oxilocina	OX
Péptido Vaso Activo Intestinal	VIP
Prolactina	PRL
Proteína cinasa A	PKA
Punto Isoeléctrico	pI
Tinción de planta	PI

# INTRODUCCIÓN

## I. 1.- REPRODUCCIÓN

Entre las actividades necesarias que realizan los organismos para la vida (mantenimiento y desarrollo como individuos), quizá la más relevante para su sobrevivencia como especie sea la reproducción; la cual, lejos de ser un proceso aislado, es el resultado de un conjunto de complejas funciones que interaccionan entre sí con el fin de generar nuevos individuos a partir de organismos preexistentes. Por consiguiente, el lugar preponderante que ocupa la reproducción en la naturaleza, se debe a que en esta función convergen los mecanismos mediante los cuales los cambios genéticos tales como las mutaciones, la recombinación, la duplicación y muchos otros, pasan de una generación a otra (expuestas a la Selección Natural y al éxito adaptativo) permitiendo la permanencia de las características de individuos y de especies y, generando en conjunto la diversificación de los seres vivos y la evolución de los organismos.

Existe una polémica en cuanto a la clasificación de los tipos de reproducción presentes en los diversos organismos. No obstante, es posible marcar una primera diferencia basada en la presencia o ausencia de meiosis. Mediante esta característica, los seres vivos se dividen en organismos con reproducción sexual y organismos con reproducción asexual. Para realizar una clasificación más precisa, es necesario emplear una segunda característica: la formación o no de gametos. Así, considerando ambas, existen básicamente 4 tipos de reproducción (3):

1. Asexual, en la cual, no se forma ningún gameto y no hay meiosis.
2. Ameiótico partenogénico, se forma 1 gameto y no hay meiosis.
3. Meiótico partenogénico, se forma 1 gameto y se presenta meiosis.
4. Sexual, se forman 2 gametos y se presenta meiosis.

Desde el punto de vista evolutivo, es posible observar que la reproducción sexual se origina muy tempranamente en la escala filogenética, a partir de formas complejas de reproducción asexual, y que ha sufrido una serie de cambios evolutivos para dar lugar finalmente a las formas que se encuentran actualmente en los vertebrados. La especialización de la fecundación, los factores y condiciones que aumentaron la supervivencia del embrión y el desarrollo de los mecanismos de cuidado y alimentación de las crías, han constituido los ejes principales de la evolución reproductiva en este grupo zoológico, en el cual, el desarrollo de los mamíferos ha sido muy diferente como consecuencia de las adaptaciones que han presentado. De manera similar a sus antecesores (los reptiles), los mamíferos ancestrales debieron poseer huevos principalmente telolécitos que en algún momento de su evolución fueron retenidos en la cavidad corporal, iniciándose así el establecimiento de una relación embrión-madre más estrecha. En dicha relación, el embrión empezó a recibir de la madre sustancias nutritivas necesarias para su desarrollo, y ello hizo inútil el vitelo del huevo, y dió lugar a una reducción progresiva del mismo hasta provocar su desaparición. Este proceso, llevó finalmente a la formación de organismos vivíparos.

Durante su desarrollo, los mamíferos presentan una serie de cambios fisiológicos, morfológicos y conductuales que les permiten vivir en equilibrio con el medio ambiente. Estos cambios se manifiestan durante los ciclos reproductores, que comprenden los ciclos gonadales y el embarazo y la lactancia. Todos los animales de esta especie pueden clasificarse como reproductores continuos o estacionales según el ciclo sexual que presenten, y en ambos casos, se presenta un periodo (pubertad) a partir del cual, se

manifiestan una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y del desarrollo, asociados a la maduración de los órganos genitales y al desarrollo de las características sexuales secundarias, que dan como resultado la capacidad de reproducirse sexualmente. En los mamíferos, se distinguen dos patrones de actividad sexual cíclica, el ciclo menstrual y el ciclo estral que presentan características morfofuncionales diferentes.

1.1.1) La existencia de un **ciclo menstrual** caracteriza el patrón de actividad reproductiva que se observa en los primates y los diferencia del resto de los mamíferos; este ciclo, se denomina de esta forma debido a que las arterias que se encuentran dispuestas en forma espiral en el endometrio uterino de las hembras primates, quedan expuestas hacia la cavidad uterina, cuando se produce un adelgazamiento de la mucosa y el desprendimiento del endometrio (por falta de progesterona), provocando un sangrado llamado menstruación. En estos organismos, los ciclos sexuales se repiten sin interrupción durante todo el año y la receptividad sexual se presenta a lo largo de todo el ciclo; la fertilidad de las hembras sin embargo, no es permanente, ya que ésta se pierde a partir del último ciclo menstrual; desde éste momento, la hembra permanece en un periodo de infertilidad al que se le denomina menopausia. El ciclo menstrual, se divide en 3 fases: folicular, ovulatoria y lutea. Durante la fase folicular, se presentan algunos eventos secuenciales en el huevo (división, crecimiento, etc.) que aseguran el número suficiente de células foliculares (formación de la capa granulosa, cumulus oophorus y células tecales) necesarias para la ovulación, la estimulación de la división de los folículos y la producción de estrógenos por las células de la capa granulosa del huevo, es ocasionada por la acción de la Hormona Foliculo Estimulante (FSH); la Hormona Luteinizante (LH) estimula en esta fase, la producción de pequeñas cantidades de progesterona por esta misma capa celular. Además de estos cambios que ocurren en el desarrollo folicular, se presentan cambios en el epitelio glandular del tejido endometrial, el cual se observa sencillo, con pocas ramificaciones y con poca actividad glandular. En la fase ovulatoria, la LH (que presenta el mayor pico de secreción de todo el ciclo),

estimula la continuación de la meiosis del oocito, la luteinización de las células granulosa (hipertrofia celular) y la síntesis de progesterona; esta última, estimula la actividad de las enzimas encargadas de la digestión y ruptura de la pared folicular y por consiguiente la liberación del óvulo. Después de la ruptura folicular y la liberación del óvulo, se presenta la última fase del ciclo (fase lútea) que se caracteriza por un incremento en el tamaño de las células de la capa granulosa y su posterior vascularización, cambios que dan origen al cuerpo lúteo. Esta fase, está dominada por la secreción de progesterona (producida por el rápido desarrollo del cuerpo lúteo) que actúa sobre el útero, aumentando visiblemente el grosor del endometrio en el cual, las células del epitelio glandular crecen rápidamente tanto en longitud como en diámetro, se ramifican y alcanzan una gran complejidad. Al llegar a esta fase, las condiciones para la fecundación y la implantación del oocito son idóneas, sin embargo, si la hembra no ha sido fecundada, se produce la menstruación o sangrado, con lo que se reinicia el ciclo menstrual (Fig. 1) (24 y 44).

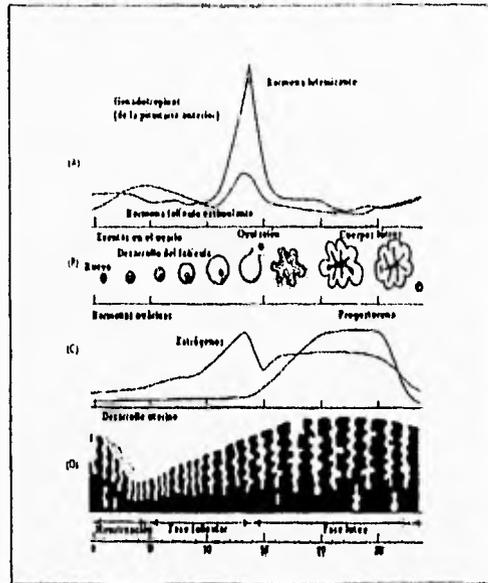


Fig. 1.- Ciclo menstrual de primate. La coordinación de los ciclos ovárico (B) y uterino (D), es controlada por las hormonas de la hipófisis (A) y los ovarios (C). Durante la fase folicular, el huevo madura con el folículo y el útero está preparado para recibir al embrión. El huevo maduro es liberado cerca del día 14. Si no existe la implantación del embrión, la pared del útero se desprende. (Tomada de Gilbert S.F. (1991) Developmental Biology. Sinauer Associates, Inc. Publishers. 891 pp)

1.1.2) El resto de los mamíferos pueden clasificarse como reproductores estacionales. Este gran grupo se divide en dos subgrupos, aquellos organismos en los que como el perro, el gato y otros, la ovulación sucede de una manera refleja (como resultado de la estimulación vaginal); y aquellos en los que como los roedores, la ovulación sucede de una manera espontánea (asociados a las condiciones ambientales de luz). Este último subgrupo, presenta un ciclo estral, que se define como el tiempo transcurrido entre el comienzo de un periodo de reproducción y el siguiente (44). En estos individuos, la receptividad sexual no se presenta a lo largo de todo el ciclo, sino que existe un periodo

de baja receptividad o anestro durante el cual dicha actividad disminuye. Además, a diferencia de los organismos que presentan menstruación, en los reproductores estacionales no ocurre el desprendimiento del endometrio uterino o menstruación. El ciclo estral está dividido en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro, las cuales, en conjunto son el resultado de una serie de eventos neuroendocrinos que se manifiestan tanto en los ovarios, como en la vagina y el útero; estos cambios permiten realizar el reconocimiento (por medio de un frotis vaginal) de cada una de las etapas del ciclo (Tabla 1) de una manera sencilla.

El diestro es la fase del ciclo durante la cual la progesterona ejerce una influencia dominante en los órganos accesorios y la secreción de estrógenos, es el resultado de la interacción entre las hormonas gonadotrópicas y el desarrollo del folículo. En el proestro, la actividad secretora del cuerpo luteo declina y los órganos reproductores se encuentran bajo la influencia de los folículos y de las hormonas gonadales; debido al incremento de la secreción de estrógenos (que comienza en el diestro), se presenta una acumulación de fluidos en el útero y un aumento en la LH, que ocasiona la ovulación y el inicio de la formación del cuerpo luteo. El estro está definido conductualmente como la fase del ciclo durante la cual la hembra es receptiva al coito; en esta fase, se presenta un crecimiento rápido y cornificación (queratinización celular) del epitelio vaginal estimulado por estrógenos. El metaestro, es un estado de transición corto posterior a la ovulación en el cual, los niveles circulantes de estrógenos son bajos, y por ende sus efectos declinan, y la secreción de progesterona comienza a incrementarse. Finalmente, se designa con el nombre de anestro a un período de tiempo variable en el cual los órganos reproductores se encuentran inactivos o con un grado de actividad muy bajo. El anestro puede persistir cuando la secreción de estrógenos y progesterona ováricos son muy bajos y la hembra permanece en un período de infertilidad permanente; este estado es similar al de la menopausia presentada por los reproductores continuos o primates (Fig. 2) (7, 24 y 44).

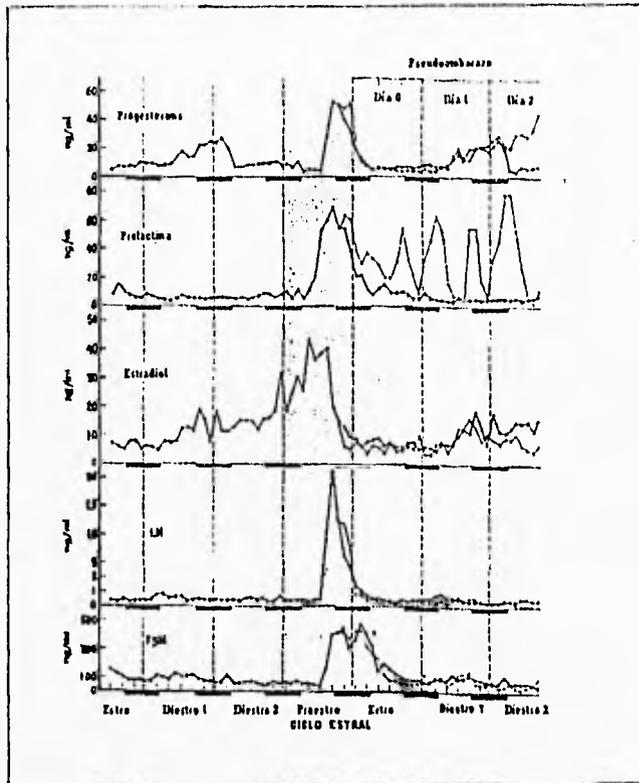


Fig. 2.- Niveles hormonales determinados en sangre de ratas durante los días del ciclo estral. (Tomado de Eckert R., et al. (1990) Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones Ed. Interamericana Esp. 320 pp.)

Fase del ciclo estral	Cambios en los ovarios	Tipos de células en los frotis vaginales
Diestro	Rápido crecimiento folicular	Leucocitos y células epiteliales nucleadas
Proestro	Formación de Cuerpos luteos	Células epiteliales nucleadas
Estro	Ovulación y Copulación	Cornificadas
Metaestro	Cuerpos luteos formados	Cornificadas y leucocitos
Comienzo de diestro o anestro	Cuerpos luteos funcionales durante la primera parte	Desaparecen las células cornificadas

Tabla 1 - Cambios en los ovarios e histología vaginal durante el ciclo estral en ratas.

En ambos ciclos, el proceso de reproducción y el desarrollo en general, comienza con la formación de los gametos (gametogénesis). Estas células que se originan en el epitelio germinal y que se diferencian en 2 tipos haploides (espermatozoide y óvulo, dependiendo del sexo del organismo), tienen como destino final la fecundación y la formación de un nuevo organismo. La unión de los gametos (masculino y femenino) da inicio a la fecundación que termina, con la fusión de los pronúcleos de dichas células (anfimixis), dando como resultado la formación de un huevo o cigoto. El cigoto, sufre una serie de divisiones mitóticas (segmentación) que forman la blástula que posteriormente se implanta en el endometrio uterino. Una vez concluido este proceso, se establece una fase mediante la cual las principales áreas que darán origen a los diferentes órganos del individuo, sufren una reorganización caracterizada por su desplazamiento y la formación de tres hojas germinales: endodermo, mesodermo y ectodermo (gastrulación). Una vez terminada la gastrulación, el embrión posee los esbozos primarios de los órganos que posteriormente, a través de movimientos morfogénéticos quedarán separados y formarán los esbozos secundarios (organogénesis) de los órganos, representando ésta la última fase en la formación del nuevo individuo.

## 1.2.- CONTROL NEUROENDÓCRINO DE LA REPRODUCCIÓN

En la naturaleza existe una estrecha relación entre los factores ambientales (como pueden ser: la duración del día, la disponibilidad de alimento, la temperatura y otros) y los seres vivos. Esta relación se observa claramente en el efecto determinante que las variaciones estacionales ejercen sobre los procesos reproductivos como son los periodos de apareamiento, celo, anestro, migración, etc. y que se ven afectados de manera diferente en cada especie. En los invertebrados segmentados y los vertebrados esta relación se encuentra regulada por el sistema nervioso central, quien vincula el medio externo con el ambiente interno (metabolismo, condiciones hormonales, etc.). Dentro del organismo, esta comunicación se realiza mediante la participación de tres tipos celulares: a) células nerviosas o neuronas, que se encuentran involucradas en la recepción, integración, conducción y transmisión sináptica de mensajes, y que, liberan neurotransmisores que se difunden solo a corta distancia a través de la sinapsis (uniones entre neuronas); b) células neuroendócrinas, que además de las características de las células neuronales, tienen propiedades de células endócrinas y convierten el impulso neural en una respuesta endócrina (síntesis y secreción de hormonas); y c) células endócrinas, que sintetizan y secretan hormonas (mensajeros químicos de naturaleza peptídica), los cuales son transportados por medio de la circulación sanguínea a los diferentes órganos (56). En general, los mecanismos neuroendócrinos desempeñan un papel fundamental en la regulación de las funciones corporales reproductoras, metabólicas y conductuales; las estructuras que llevan a cabo estas funciones son entre otras, el hipotálamo, la hipófisis, la glándula pineal y la médula suprarrenal (Fig. 3).

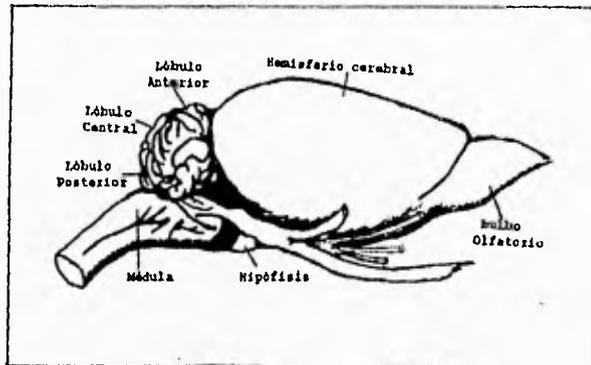


Fig 3 - Ubicación de la hipófisis en el cerebro de ratón. (Tomada de Eckert R., et al. (1990) *Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones*. Ed. Interamericana. Esp. 320 pp.)

La principal glándula endócrina que regula las funciones reproductivas y que se halla en íntima relación con el hipotálamo es la glándula hipofisiaria o hipófisis. De acuerdo con su origen embrionario la hipófisis se divide en dos partes, la adenohipofisis o hipófisis anterior (AH) y la neurohipofisis o hipófisis posterior (NH).

La porción anterior de la hipófisis, se desarrolla a partir de la invaginación de las células del ectodermo del techo de la cavidad oral del embrión (bolsa de Rathke). Esta bolsa posteriormente se cierra y se separa de la cavidad oral por el hueso esfenoidal del cráneo. El lumen de la bolsa se reduce entonces a una pequeña abertura. La porción neural posterior o neurohipofisis de la glándula, se desarrolla a partir de una evaginación del ectodermo del piso del tercer ventrículo en el cerebro. El lumen superior permanece formando una depresión en el tercer ventrículo del adulto. La porción superior de esta bolsa neural se expande para cubrir la porción inferior del hipotálamo, formando la eminencia media (Fig. 4) La glándula hipófisis completa se encuentra alojada en una cuenca del hueso esfenoidal denominada silla turca. Un pliegue de la duramadre, llamado diafragma, se extiende a través de la silla turca y separa a la hipófisis del cerebro. Sin

embargo, la bolsa neural penetra el diafragma, manteniendo su continuidad con el cerebro a través del tallo hipofisario o proceso infundibular (53).

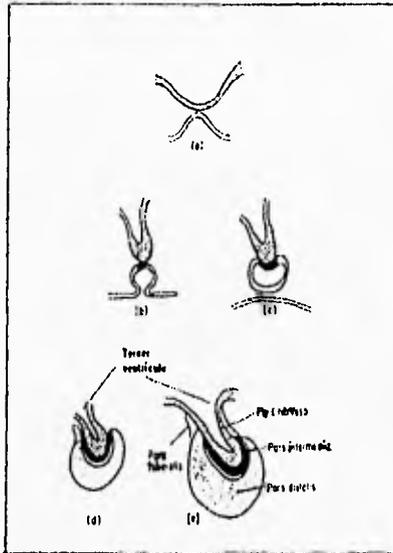


Fig. 4.- Diagrama que muestra los estados (a-e) del desarrollo de la glándula hipofisis a partir del tejido nervioso ( , dando lugar a la neurohipofisis) y tejido epitelial (la bolsa de Rathke forma la adenohipofisis, *pars distalis* , *pars intermedia* , y *pars tuberalis* ) (Tomada de Wallis M., Howell S.L. y Taylor K.W. 1985 The biochemistry of the polypeptide hormones)

Debido a su función, el suministro de sangre a esta glándula es particularmente importante. El tejido neural es irrigado por la arteria hipofisaria que presenta dos ramificaciones: la porción correspondiente al proceso infundibular se irriga principalmente de la arteria hipofisaria inferior, y el tejido neural superior de la bolsa y de la eminencia media están irrigados ampliamente por la arteria hipofisaria superior. El plexo capilar de esta arteria drena hacia el seno dural por la vena eferente. Los vasos portales de la arteria hipofisaria forman un grupo de largas venas, que llevan la sangre

hacia la parte inferior de la adenohipofisis. Este plexo capilar que suministra de sangre a las células del sistema endócrino, drena de igual forma al seno dural (Fig. 5)

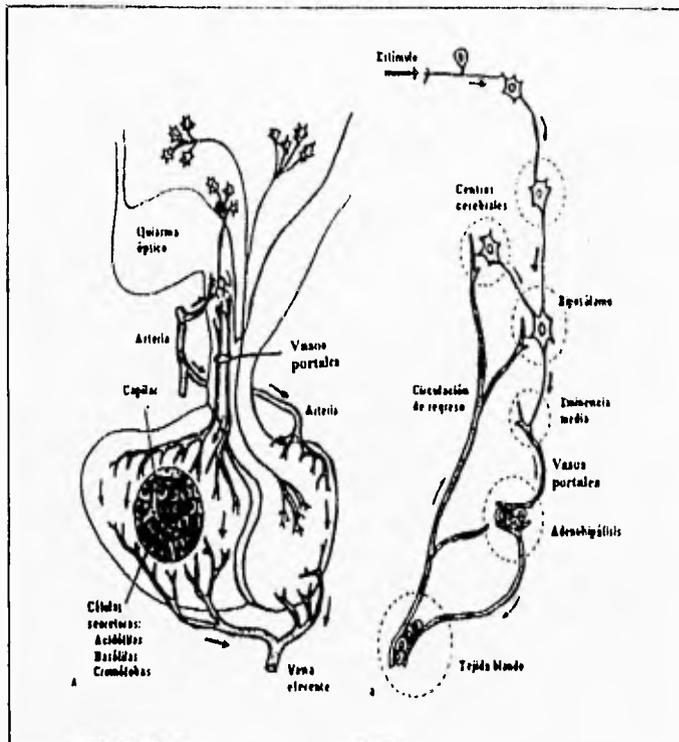


Fig. 5.- Diagrama de los vasos sanguíneos y las uniones nerviosas del hipotálamo y la hipófisis. (Tomada Eckert R., et al. (1990) Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones 13ª Interamericana. Esp. 320 pp.)

En el hipotálamo existe un grupo de neuronas magnocelulares (denominadas así por su tamaño) de donde derivan los axones que componen el 42% del volumen total de la NH, dichas neuronas se encuentran agrupadas en dos núcleos, el paraventricular y el supraóptico del hipotálamo. Estas células sintetizan, entre otras, 2 hormonas peptídicas, la oxitocina (OX) y la hormona antidiurética (ADH). Las cuales son transportadas en

forma granular por los axones hasta el lóbulo posterior de la hipófisis, donde se almacenan en las terminales axónicas. La estimulación eléctrica o química de los cuerpos celulares y la depolarización de sus terminales nerviosas, da lugar a que el contenido de los gránulos se libere por exocitosis y sea vertido a la circulación periférica via el plexo capilar de la arteria hipofisiaria inferior (4). Además de sintetizar éstas hormonas, en el hipotálamo existen neuronas que producen hormonas y/o factores liberadores e inhibidores de la secreción hormonal hipofisiaria los cuales, viajan por los axones hasta la eminencia media, en donde son almacenados en gránulos neurosecretores. Estos gránulos son descargados posteriormente a una estimulación de las células hipotalámicas y transportados por el plexo capilar portal de la arteria hipofisiaria superior (sistema portal hipotálamo-hipofisiario) hasta las células blanco en la adenohipófisis las cuales reaccionan incrementando o disminuyendo la síntesis y/o la secreción hormonal. Finalmente, las hormonas liberadas de la adenohipófisis entran a la circulación periférica vía el plexo capilar de la arteria hipofisiaria inferior (53). Esta relación vascular hipotálamo-hipófisis, permite la secreción hipofisiaria de las hormonas que, a su vez, irán a regular la secreción de las hormonas que determinan las funciones tiroideas, adrenales, reproductoras, de crecimiento somático, lactancia y del metabolismo hídrico (Fig. 6).

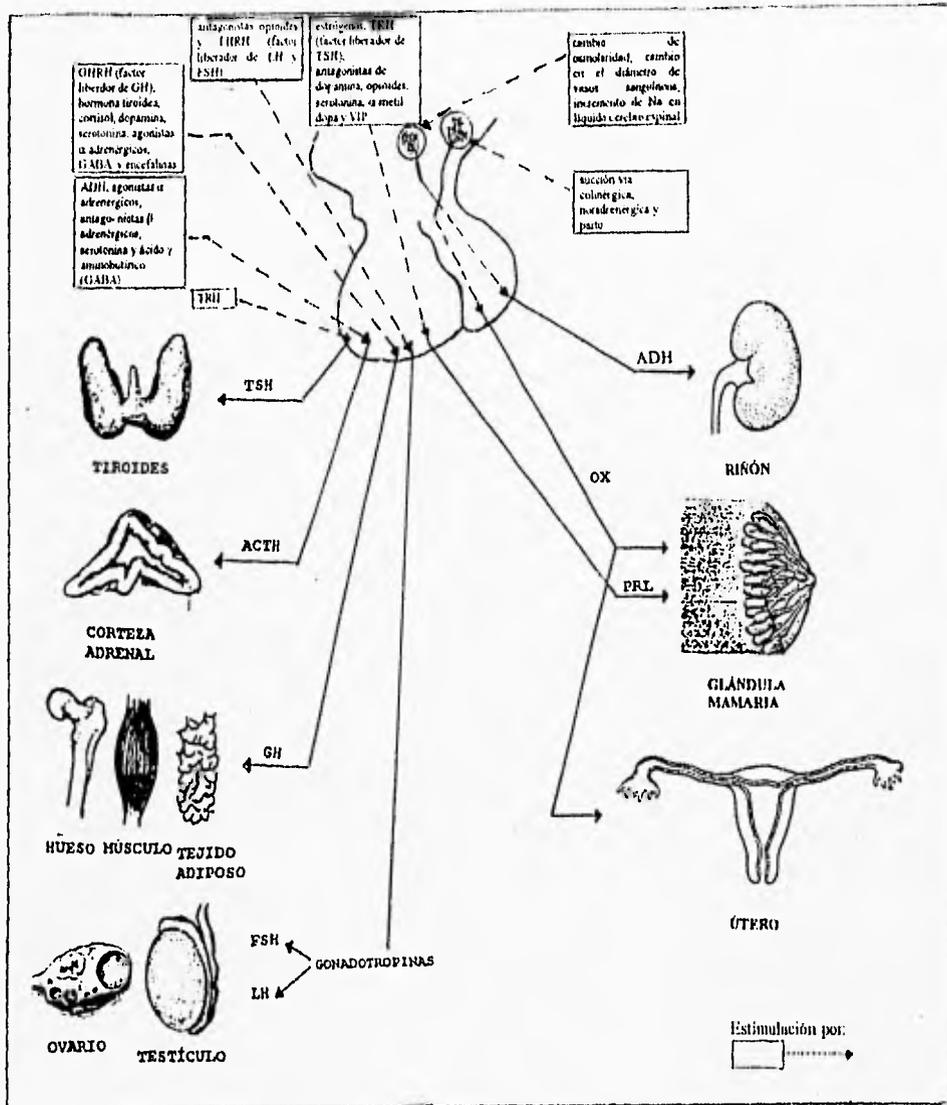


Fig. 6.- La hipófisis, sus hormonas (se indica los estimuladores de su liberación) y sus órganos blanco.

En los mamíferos, la parte anterior de la hipófisis se encuentra dividida morfológicamente en tres regiones: *pars distalis*, en donde se encuentra la mayor parte del tejido secretor, *pars tuberalis*, que se desarrolla alrededor del pedúnculo hipofisiario y, *pars intermedia*, que en algunos casos se encuentra parcialmente fusionada a la neurohipófisis (Fig. 7). Utilizando diferentes métodos citoquímicos, se han distinguido en la adenohipófisis cerca de 6 tipos celulares y, la presencia de por lo menos 10 péptidos y proteínas con actividad hormonal

Por sus relaciones estructurales, las semejanzas en sus actividades biológicas y por presentar un probable origen evolutivo común, estas hormonas se agrupan de manera natural en 4 familias que son:

- a) Las hormonas neurohipofisarias: oxitocina (OX) y vasopresina u hormona antidiurética (ADH o VP);
  - b) Las corticotropinas polipeptídicas: Hormona Adrenocorticotrópica (ACTH), Melanotropina (Hormona Estimulante de Melanocitos, MSH), Lipotropinas (LPH) y las endorfinas;
  - c) Las proteínas hormonales somatotrópicas: Hormona del Crecimiento (GH) y Prolactina (PRL); y
  - d) Las glicoproteínas: Hormona Estimulante de Tiroides (TSH), Hormona Luteinizante (LH) y Hormona Foliculo-Estimulante (FSH)
- (63)** (Fig. 7 y Tabla 2)

Nombre de la hormona	Abreviatura	Naturaleza Química	Población celular *	Estimulación por	Inhibición por	Acciones mediadas por	Principales Acciones
<b>LÓBULO POSTERIOR</b>							
Oxitocina	OX	péptido (9 residuos)		succión via colinérgica, noradrenérgica y parto	noradrenalina suprarrenal		Estimula la evacuación láctea por medio de la contracción de las células mioepiteliales del alveolo de la glándula mamaria y estimula la contracción uterina
Vasopresina u Hormona Antidiurética	VP ADH	péptido (9 residuos)		cambio de osmolaridad, cambio en el diámetro de vasos sanguíneos, incremento de Na en el líquido cerebro espinal	catecolaminas		Aumenta la presión sanguínea y ejerce una función antidiurética
<b>LOBULO ANTERIOR</b>							
Melanotropina	MSH	péptido (13-22 residuos)					Ocasiona oscurecimiento en la piel especialmente en anfibios, incrementando la síntesis de melanina en los melanóforos y melanocitos
Corticotropina	ACTH	polipéptido (13 residuos)	20%	ADH, agonistas $\alpha$ adrenérgicos, antagonistas $\beta$ adrenérgicos, serotonina y ácido y aminobutírico (GABA)	ACTH, opioides y encefalinas	adenilato ciclase	Se libera circadianamente y regula el crecimiento y secreción de la corteza adrenal.
Somatotropina	GH STH	proteína	40-50%	GHRH (factor liberador de GH), hormona tiroidea, cortisol, dopamina, serotonina, agonistas $\alpha$ adrenérgicos, GABA y encefalinas	IIGH (factor inhibidor de GH)	somatomedina	Estimula el crecimiento y desarrollo somático postnatal, presenta una acción sobre el metabolismo de proteínas, carbohidratos y grasas
Prolactina	PRL	proteína	10-25%	estrógenos, TRH (factor liberador de TSH), antagonistas de dopamina, opioides, serotonina, $\alpha$ metil dona y VIP	dopamina, agonistas dopaminérgicos, PRL, GABA y norepinefrina	Ca <sup>+</sup> , fosfato de inositol	Presenta acciones relacionadas con la reproducción, como la actividad lactogénica; efectos en el metabolismo lipídico, acciones sobre las estructuras ectodérmicas, efectos sobre el sistema inmunológico, efectos sobre el crecimiento y desarrollo y acciones relacionadas con el control hídrico
Tirotropina	TSH	glicoproteína (2 subunidades)	3-5%	TRH	Dopamina Somatostatina T3 y T4	cAMP	Regula el crecimiento y metabolismo de la glándula tiroidea
Folitropina Lutropina	FSH LH	glicoproteína (2 subunidades)	10-15%	antagonistas opioides y LHRH (factor liberador de LH y FSH)	dopamina y endorfinas	adenilato ciclase y cAMP	Regulan el crecimiento y maduración puberal, procesos reproductivos y la secreción de hormonas sexuales esteroides.

\* El porcentaje de las células se indica a partir del total de la población celular de la glándula hipofisiaria de un humano adulto. (54 y 63)  
Este porcentaje varía de acuerdo al estado fisiológico (edad, sexo, etc.).

Tabla 2.- Se muestran las hormonas secretadas por la hipófisis, los factores que regulan su secreción y sus principales efectos

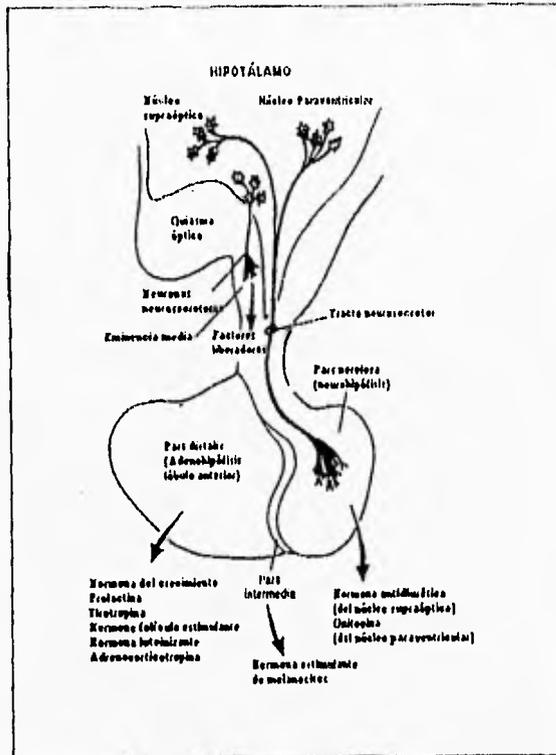


Fig. 7.- Esquema de las regiones de la hipófisis (lóbulo anterior, intermedio y posterior) y los factores y hormonas que son liberados en cada una de ellas. (Tomada de Eckert R., et. al. (1990) Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones. Ed. Interamericana. Esp. 320 pp.)

Dentro de toda esta gran variedad hormonal, la prolactina es una de las hormonas que han tenido un papel muy importante en la evolución fisiológica de los vertebrados, presentando en todos estos organismos una gran heterogeneidad funcional fisiológica, que le confiere a su estudio un gran importancia.



La PRL presenta una gran diversidad de acciones fisiológicas, y esta heterogeneidad funcional sugiere que la hormona ha jugado un papel importante en la diversificación fisiológica de los vertebrados durante su evolución. En general, si nos referimos a la historia evolutiva de las funciones que presenta, podemos comenzar con la acción temprana que tiene la PRL sobre el control de la homeostasis electrolítica, la cual es persistente en los vertebrados acuáticos. Así, en anfibios, se conocen sus acciones sobre el crecimiento y desarrollo, así como sus efectos metabólicos y de las funciones osmoreguladoras, mientras que, en los mamíferos, la PRL ejerce acciones sobre el crecimiento de órganos específicos asociados o no a la función reproductora, además de estar fuertemente ligada al proceso fisiológico de la producción láctea (23 y 47). Todas estas acciones de la PRL en vertebrados sugieren que la ontogenia de la hormona recapitula la filogenia de las funciones de la PRL en estos grupos (47)

Finalmente a pesar de la gran homología existente entre las PRLs de diferentes especies, se ha demostrado la presencia de procesamientos enzimáticos y modificaciones postraduccionales que le confieren a la hormona la posibilidad de generar variaciones importantes en sus actividades biológicas, dependiendo del cambio ocurrido por dichos procesos. El o los significados fisiológicos que puedan tener estos cambios aún no están del todo claros, pero su existencia sí presenta fuertes implicaciones sobre la evolución molecular y fisiológica de esta proteína y para explicar la multiplicidad de sus acciones en las diversas especies.

#### I. 4.- CARACTERÍSTICAS MOLECULARES DE LA PROLACTINA

El descubrimiento del efecto de la PRL sobre la glándula mamaria se llevó a cabo en 1928 por Stricker y Grueter, cuando se demostró que la inyección intraductal de un extracto acuoso de adenohipófisis era capaz de estimular la síntesis de la leche en la glándula mamaria de conejas pseudoembarazadas (46). Posteriormente esta respuesta se observó en perros, cerdos y vacas. El compuesto responsable de dichos efectos fue aislado en 1933 por Riddle, Bates y Dykshorn quienes le asignaron a la hormona el nombre de prolactina.

Los genes de la familia hormonal a la que pertenece esta hormona han sido bien caracterizados y se ha descrito que todos ellos presentan 5 exones de una longitud relativamente constante. La PRL de la rata está formada por un solo polipéptido de 199 aminoácidos y su purificación resulta difícil de realizar, dado que presenta una gran similitud en peso molecular con la GH quien está compuesta de 191 aminoácidos. La característica estructural que distingue a la PRL de la GH es la presencia en la primera de un puente disulfuro en el extremo amino terminal. Sin embargo esta característica no es esencialmente responsable de las acciones específicas de la hormona (48).

La PRL tiene 3 puentes internos de disulfuro que forman tres asas (a excepción de la PRL de caballo y de los teleósteos que presentan 2), la ruptura de los cuales provoca la pérdida completa de su bioactividad. En la rata, estos puentes o enlaces, se encuentran entre los residuos 4 y 9 formando el asa amino terminal, entre los aminoácidos 56 y 172 formando el asa central y entre los aminoácidos 189 y 197 para dar origen al asa carboxilo terminal (Fig. 9) (53). El 50-60% del polipéptido se encuentra organizado en alfa hélice (48) y, a pesar de la gran semejanza que existe entre las PRL's de diferentes organismos, las secuencias de aminoácidos se consideran especie-específicas. Al realizarse la comparación de secuencias entre diversos organismos, la

PRL que presenta mayores diferencias (cerca del 40% de diferencia del total de aminoácidos contenidos) es la PRL de rata (63).

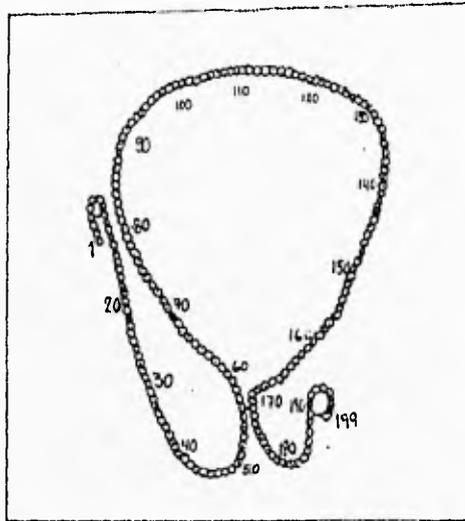


Fig. 9.- Esquema de la estructura de la prolactina de rata. (Tomada de Parlow A.F. y Shone B. Rat Prolactin the Entire Linear Aminoacid Sequence. in. Fed. Proc. (1976)35:219.)

### I. 5.- ACCIONES FISIOLÓGICAS Y EFECTOS DESCRITOS DE LA HORMONA

La Prolactina es una hormona fisiológicamente muy versátil y los numerosos efectos que se le han descrito se pueden tipificar en 7 grupos y presentarse de manera diferente en los diversos grupos de vertebrados:

ACCIONES FISIOLÓGICAS Y EFECTOS DESCRITOS	ORGANISMOS				
	TELEOSTEOS	ANFIBIOS	REPTILES	AVES	MAMIFEROS
Acciones relacionadas con el control de agua y el balance electrolítico.	Decremento del flujo de Na <sup>+</sup> y de la permeabilidad branquial; decremento de la absorción de agua y NaCl intestinal e incremento de su absorción en la vejiga urinaria; decremento de la excreción renal de Na <sup>+</sup> ; incremento de la tasa de filtración glomerular y resistencia al estrés generado por altas temperaturas.	Ayuda a las larvas a ajustarse a su medio hipotónico, estimula la habilidad de algunas especies para la absorción iónica en las bránqueas y estimula el transporte de agua y Na <sup>+</sup> a través de la vejiga.	Actúa sinérgicamente con corticosteroides en la restauración de la composición normal del plasma.	Puede tener efecto sobre la glándula nasal.	Probablemente contribuye a regular la osmorregulación en el embrión. Presenta efectos en el transporte de agua y iones en el intestino, participa en la regulación del transporte de fluidos y iones en la glándula mamaria; incrementa la tasa de excreción de Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> y agua.
Acciones relacionadas con la reproducción.	Desarrollo paternal, gonadotrópico y mantenimiento y secreción de vesículas seminales.	Secreción de la gelatina del oviducto, espermatogénico y/o antispermatogénico y estimulación de la conducta de migración de las larvas hacia el agua.	Acción antigonadotrópica.	Producción de la leche de buche, formación de la placa de incubación, antagonista, inquietud premigratoria, supresión de la fase reproductiva del ciclo sexual, desarrollo del tracto reproductivo femenino y comportamiento parental.	Estimulación y desarrollo de la glándula mamaria y estimulación de la síntesis de leche, mantenimiento, secreción del cuerpo lúteo en ratas, ratones y hurón, desarrollo parental y función espermatogénica.
Efectos sobre el crecimiento y desarrollo.	Estimulación del crecimiento glomerular.	Estimulación del desarrollo de la glándula cloacal, del crecimiento larval, de bránqueas y cola y, de la regeneración.	Estimulación del crecimiento somático y regeneración caudal.	Desarrollo prenatal y crecimiento de plumas.	Estimulación de la actividad y desarrollo de la glándula prepuccial y sebácea.
Efectos metabólicos.	Acumulación de lípidos y estimulación tiroidea.	Hiperglicemia o diabetogénesis y acumulación lipídica.	Reducción del depósito lipídico e hiperfagia.	Hiperglicemia o diabetogénesis y acumulación lipídica.	Acumulación lipídica, incremento de colesterol en los testículos, hiperglicemia o diabetogénesis y actividad renotrófica.
Acción sobre las estructuras ectodérmicas.	Secreción del moco en la piel.	Estimulación de la proliferación de melanóforos.	Estimulación de la muda de la piel.	Estimulación de la hiperplasia epidermal en la placa de incubación.	Maduración y crecimiento del cabello.
Acciones de sinergismo y/o antagonismo con hormonas esteroides.	Reducción de los efectos tóxicos de estrógenos. Sinergismo con corticosteroides en la retención de Na <sup>+</sup> en riñón y bránqueas.	Sinergismo con: estrógenos en la estimulación de la gelatina del oviducto; andrógenos en la espermatogénesis y en el desarrollo de la glándula cloacal y aldosterona en el transporte de Na <sup>+</sup> .	Sinergismo con corticosteroides en la reabsorción de Na <sup>+</sup> .	Sinergismo con progesterona y estrógenos en el tracto reproductor femenino; corticosteroides en la estimulación de la secreción de la glándula nasal y con esteroides ováricos y testiculares en la formación de la placa de incubación.	Sinergismo con: andrógenos en las glándulas sexuales accesorias del macho y en la espermatogénesis; estrógenos ováricos en el crecimiento de la glándula mamaria; estrógenos en la acción luteotrópica y en la mucificación vaginal y corticosteroides en el crecimiento del pelo y la secreción de las glándulas sebáceas y prepuccial.
Acciones sobre el sistema inmunológico.					Estimulación de la eritropoyesis y acciones sobre las células del sistema inmune.

## 1. 6.- SÍNTESIS, CONDENSAMIENTO Y SECRECIÓN DE LA PROLACTINA.

La prolactina es producida en células de la adenohipófisis llamadas lactotrofos o mamotrofos; en estas células la cisterna del retículo endoplasmático rugoso es generalmente abundante. Al igual que la GH, la PRL es sintetizada como un precursor (pre-prolactina) que presenta una secuencia péptido señal de 25 a 30 aminoácidos de largo, agregados en el extremo amino terminal de la proteína. La incorporación de los aminoácidos que forman la PRL ocurre en los ribosomas del retículo endoplásmico rugoso. La PRL recién sintetizada es transportada entonces al aparato de Golgi (12). En las cisternas de dicho aparato se lleva a cabo la concentración de la hormona, en gránulos inmaduros, la fusión de los cuales da lugar a gránulos de mayor diámetro, considerados como gránulos maduros o granulos secundarios (12). La agregación de la PRL en gránulos inmaduros y de éstos en gránulos maduros requiere de energía para mantener el gradiente de pH a pesar de que el proceso sea pasivo. La cisterna trans del aparato de Golgi es más ácida que el retículo endoplasmático y esta acidificación puede facilitar la agregación de las moléculas (55). La forma de los gránulos inmaduros es más variable que la de los maduros porque están formados a partir de la agregación de gránulos pequeños derivados del interior de los sáculos del aparato de Golgi. Los gránulos maduros son cilíndricos u ovoides y tienen un diámetro que puede alcanzar de 600 a 900 nm (Fig. 10) (54).

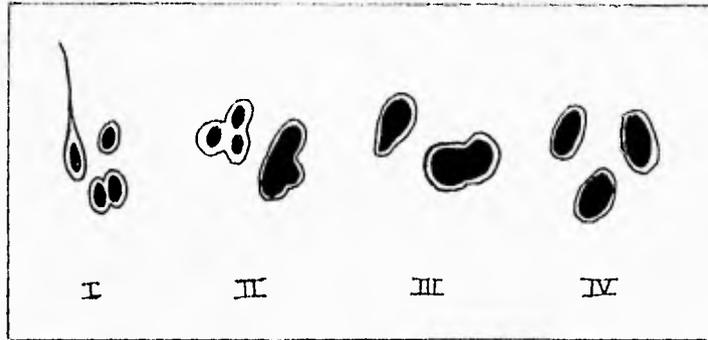


Fig. 10.- Diagrama que muestra la transición de los diferentes tipos de gránulos de secreción encontrados en los mamotropos de rata. El tipo I se refiere a gránulos pequeños o inmaduros (100-200 nm) encontrados en la cisterna del aparato de Golgi asociados a esta. El tipo II se refiere a formas agregadas de gránulos pequeños que presentan una alta variabilidad de tamaño y forma, siendo típicamente polimórficos. Los gránulos de tipo III son formas intermedias que no presentan gran variabilidad como el tipo II, pero son menos regulares que el tipo IV. Estos últimos, representan la forma madura de los gránulos y su forma puede ser ovoide o redonda, con un diámetro hasta de 600-900 nm. (Tomada de Farquhar M. et al. *Endocrinology* (1978) 102, 269-311)

En la hipófisis de la rata, la membrana de los gránulos está usualmente separada del contenido por un espacio y presenta una alta resistencia a la variación de pH y de sustancias que generalmente ocasionan la solubilización de gránulos. La gran variedad morfológica que tienen, sugiere que su contenido molecular está fuertemente organizado en una estructura relativamente estable, es decir que la hormona se encuentra en agregados poliméricos o unida a otras moléculas (15). Esta estabilidad, que es producida por la polimerización de la molécula, se demuestra al observar que la conversión de la hormona empaquetada con alto peso molecular a una forma con menor peso molecular incrementa la presión osmótica dentro del gránulo y que resulta en la captura de éste (31)

Para la liberación de la PRL, contenida en los gránulos, éstos migran a la membrana plasmática celular, a la cual se fusionan creando un espacio que permite el paso del contenido granular al espacio perivascular. Este proceso se ha denominado

exocitosis o emiocitosis. Después de 24 horas de que se presenta una inhibición de la secreción hormonal los gránulos se fusionan con lisosomas para que el exceso de gránulos secretores sea digerido, proceso conocido como crinofagia (Fig. 11) (54 y 60).

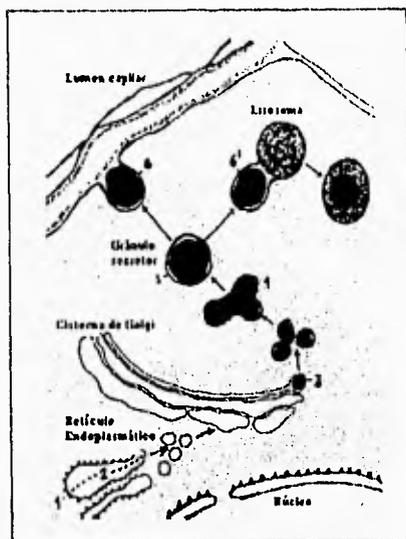


Fig 11 - Diagrama del proceso implicado en la formación de gránulos de prolactina (1-5), su secreción por exocitosis (6) y su degradación por crinofagia (6) (Tomada de Farquhar M, et al Endocrinology. (1978) Vol. 102, 269-311)

Shenai y sus colaboradores, han encontrado que la síntesis de la PRL esta representada como un proceso no-lineal. Este fenómeno puede deberse a que la degradación y secreción de PRL recién sintetizada no presenta una acumulación lineal dentro de la célula, ya que la PRL contenida en los gránulos no es procesada continuamente y la que acaba de ser sintetizada no es degradada hasta que se encuentra incorporada a los gránulos (Fig 12) (57).

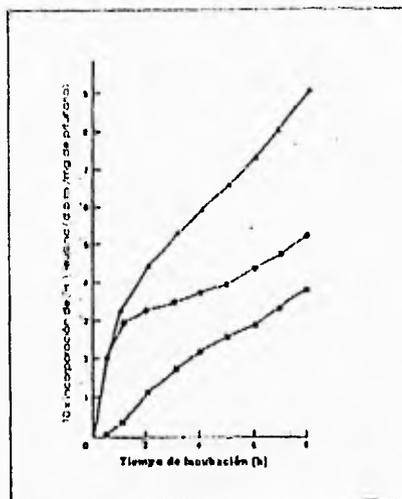


Fig. 12.- Incorporación de 1-[3H] leucina en la prolactina de rata por tejidos de hipófisis incubados con medio 199. Se muestra la concentración de PRL marcada en el medio (○), homogenizados (●) y ambos combinados (◐). (Tomada de Shenai R. Y Wallis M. Biochem. J. (1979) 182: 735-743)

Sin embargo, por otra parte se ha demostrado que el tiempo de empaquetamiento y el grado de madurez intracelular de la hormona determinan la viabilidad de esta para su transformación en una forma liberable. En este sentido se considera que la PRL madura es aquella que es sintetizada de 4 a 8 horas previas a la liberación. La hormona joven es sintetizada en 1 Hr o antes y, la PRL vieja es aquella que es sintetizada de 16 a 24 hrs antes de su liberación. En este mismo orden se preferencia su liberación de la célula (38).

En una rata en etapa lactante y como respuesta a la succión de las crías, se presentan dos fases en la secreción de la prolactina. La primera de ellas es la conversión de la PRL madura en una forma liberable, proceso que ocurre rápidamente y se caracteriza por una pérdida en la detectabilidad de dicha PRL. La segunda fase corresponde a la liberación de esta forma de prolactina al flujo sanguíneo (20).

La secreción de PRL de la hipófisis está bajo el control inhibitorio tónico de la dopamina (DA) hipotalámica, la cual después de ser liberada de la eminencia media a la vena hipofisiaria portal, se une al receptor específico en el lactotrofo generando una serie de eventos intracelulares que concluyen en la inhibición de la liberación de la hormona (esta inhibición actúa mayoritariamente en la secreción de las prolactinas recién sintetizada y vieja) (27, 33 y 34). La estimulación física de la liberación de la hormona, una vez que ha sido transformada se encuentra regulada por otros factores hipotalámicos como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y el péptido vasoactivo intestinal (VIP) (27, 33 y 34). El primero de estos factores causa un rápido incremento en los niveles de fosfato de inositol y diacilglicerol, además del aumento en la concentración interna de  $Ca^{2+}$ ; y el segundo, actúa en la célula activando a la enzima adenilato ciclasa (27, 33 y 34).

#### 1.6.1) SECRECIÓN DE LA PRL DURANTE EL CICLO REPRODUCTOR.

##### A) Prolactina durante el ciclo estral.

Durante la mayor parte del ciclo estral en la rata, los niveles de secreción de PRL son bajos y se asemejan casi todos al reportado durante el diestro, en el cual la concentración de PRL en el suero va de 10 a 20ng/ml (1 y 13). Sin embargo, en el periodo comprendido entre la tarde y la noche del proestro, se advierte un aumento en la secreción de la hormona que se mantiene durante el estro y que equivale a  $68.5 \pm 7.4$  ng/ml (1), presentándose el pico más alto por la noche. Se ha observado que el aumento en la secreción de PRL en esta fase del ciclo estral, se acompaña por picos similares en la secreción de LH, FSH y progesterona. Todos estos están precedidos y son estimulados directa o indirectamente por una elevación en la tasa de secreción de estrógenos por los folículos (Figs. 2 y 13) (13).

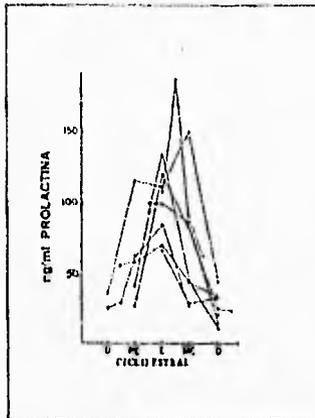


Fig. 13.- Cambio diarios de la concentración de PRL en el suero de rata. D = diestro, PE = proestro, E = estro y ME = metaestro (Tomada de Amenomori Y, et al. *Endocrinology* (1970) 86, 506-510)

#### B) Prolactina durante el embarazo.

Cuando la cópula se realiza durante el estro o la noche anterior (proestro) y ocurre la fecundación, se han observado que aparecen dos picos diarios en la concentración sanguínea de la hormona. Estos picos reflejan la secreción de PRL, (uno registrado por la mañana y el segundo por la noche) de aproximadamente 250 ng/ml cada uno y permanecen durante los primeros 4 días (5 y 13). Posteriormente, la secreción de la hormona decrece gradualmente manteniéndose hasta los días 11-12 del embarazo y después decae durante el resto de la gestación (1). Este decaimiento en la secreción de prolactina por la hipófisis puede ser debido a una inhibición de la secreción ejercida por el lactógeno placentario, el cual es secretado por la placenta (1).

Durante las últimas fases del embarazo se presenta un aumento en la secreción de estrógenos ováricos, y se ha sugerido que dicho aumento modifica la relación de

estrogenos/progesterona, lo cual determina la estimulación de la secreción de prolactina por la hipófisis (Figs. 2 y 14).

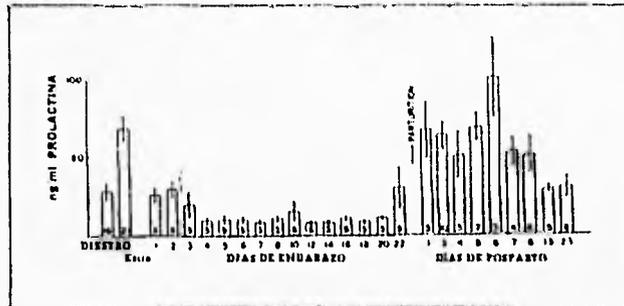


Fig. 14.- Diagrama sobre la concentración de PRL en el suero de rata durante el embarazo y después del parto. El número de ratas utilizadas en cada grupo, se indican en cada barra. (Tomada de Larson B y Smith V. 1974 Lactation a Comprehensive Treatise. Academic Press NY E U.)

Existen organismos en los que, sin haber ocurrido fertilización y por tanto embarazo, acontece una interrupción temporal de la ovulación (proceso conocido como pseudembarazo). Este puede ser inducido por el apareamiento de la rata con un macho estéril o por estimulación mecánica del cervix uterino. En estos casos, al igual que en el embarazo, se registra la presencia de 2 picos de secreción (uno diurno y otro nocturno) de PRL. Estos picos se mantienen elevados (80 ng/ml) por lo menos durante los primeros 6 días y se observan con menor magnitud (3 ng/ml) hasta los días 9 y 10 (Figs. 2 y 15) (14).

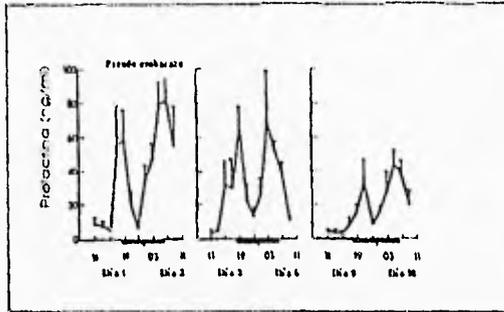


Fig. 15.- Concentración de PRL en el suero de ratas pseudoembarazadas. (Tomada de Freeman, et al. *Endocrinology* (1974) 94, 875-882)

#### D) PRL durante la lactancia.

Uno de los efectos más conocidos y de mayor importancia de la PRL, es su acción sobre el desarrollo de la glándula mamaria y durante la lactancia. Esta glándula accesoria es una de las más importantes de la piel. Su forma, número y organización varía de una especie a otra. En la rata, se presentan 6 pares de glándulas mamarias: tres torácicas, una abdominal y dos inguinales.

El parénquima de éstas glándulas está formado por alvéolos que drenan en conductos que convergen y dan lugar a ductos cada vez mayores que finalmente desembocan en el pezón. En la rata, los conductos mamarios convergen en un solo conducto principal o galactóforo. Cada alvéolo está constituido por células epiteliales secretoras de leche, y tanto éstos, como los conductos de calibre fino, están revestidos por células mioepiteliales contráctiles (6). Todo el parénquima está revestido a su vez por tejido conectivo que posee abundantes vasos sanguíneos y fibras del músculo liso (Fig. 16).

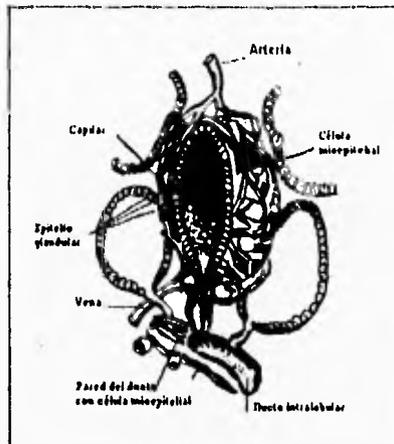


Fig 16.- Diagrama de la red sanguínea y las células micropiteliales alrededor de los alveolos mamarios. (Tomada de Kon S. y Cowie A. (1961) Milk, the Mammary Gland and its Secretion. Vol 1 Academic Press NY. E.U.)

La inervación aferente de la glándula mamaria está constituida por fibras sensitivas provenientes fundamentalmente de receptores ubicados en el pezón, la piel cercana al mismo y en el parénquima mamario. Estos receptores son sensibles al tacto y a la presión. La inervación eferente es de naturaleza simpática y se localiza principalmente en los vasos sanguíneos, el tejido conectivo y el músculo liso (6)

Durante la pubertad, el crecimiento y desarrollo de la glándula se encuentra bajo control estrogénico, aunque también participan la GH y la PRL. Durante el embarazo, el desarrollo de esta glándula involucra la formación de algunas ramas ductales adicionales y el desarrollo de alvéolos, lo cual es regulado por estrógenos, progesterona, glucocorticoides y PRL. La secreción de la leche es inhibida por progesterona y posiblemente por estrógenos

En el desarrollo de la glándula intervienen de manera secuencial y en paralelo, diferentes hormonas que poseen diferentes jerarquías de acuerdo a diferentes estados fisiológicos (Fig. 17):

1) Así, durante la pubertad, se presenta la proliferación y el crecimiento de la glándula. El proceso es inducido *in vitro* por insulina que estimula la síntesis de DNA, la formación de RNA y la fosforilación de nucleoproteínas; *in vivo*, esta estimulación parece estar dada por la acción de estrógenos de origen ovárico y por tiroxina (63).

2) Durante el embarazo se desarrolla la diferenciación de la glándula. Esta fase puede ser inducida *in vitro* por corticosteroides que estimulan la producción de retículo endoplasmático y aparato de Golgi en las células; *in vivo*, este proceso parece estar inducido por estrógenos y progesterona placentarios, por prolactina y por somatotropinas (63).

3) Durante la lactancia se produce una diferenciación terminal, la cual es inducida *in vitro* e *in vivo* por la PRL, y como resultado de ello las células adquieren la capacidad de producir y secretar las proteínas lácteas (caseína, lactalbumina, etc.) (63).

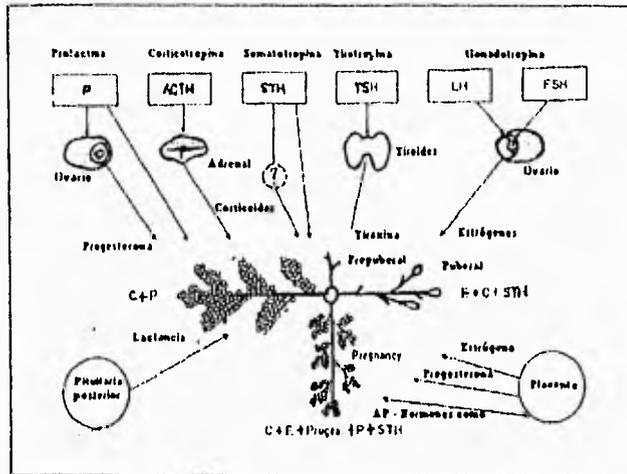


Fig. 17- Diagrama que ilustra el desarrollo de la glándula mamaria y el papel que juegan las hormonas en este proceso STH, hormona de crecimiento, P, prolactina, E, estrógenos, C, corticoesteroides. (Tomada de Wallis M., Howell S.L. y Taylor K.W. 1985 The biochemistry of the polypeptide hormones)

La lactancia es un proceso fisiológico que al igual que muchas otras fases del ciclo reproductor, se encuentra regulado por mecanismos neuroendócrinos bien establecidos. La evacuación láctea sucede como respuesta a la estimulación, por la succión de las crías, de los receptores situados en los pezones de la madre. De esta activación se genera un impulso nervioso aferente que llega al sistema nervioso central y provoca la liberación de oxitocina por la neurohipófisis, a su vez, la oxitocina en el torrente sanguíneo llega finalmente a la mama y mediante la activación de receptores específicos da lugar a la contracción de las células mioepiteliales de la glándula mamaria. Dada la ubicación anatómica de estas células (Fig. 16) su contracción trae consigo una reducción del volumen alveolar, y una dilatación y acortamiento de los conductos, dando lugar a la expulsión de leche (6). En la rata, la evacuación láctea no ocurre inmediatamente después de iniciada la succión, sino que sucede después de un periodo de aproximadamente 10 minutos (6).

Por otra parte, con relación al efecto de la succión sobre la secreción de PRL, se ha sugerido que dicho estímulo modifica la sensibilidad de la AH para responder a la acción de los secretagogos hipotalámicos y que uno de los principales efectos de la succión parece ser el de inducir una sincronización de los lactotrofos para la liberación de PRL, siendo más sensibles dichas células a la estimulación por TRH y la inhibición por DA (43).

Durante los 21 días del periodo de lactancia en la rata, se observa una alta tasa de secreción de PRL. A diferencia de la regulación interna de la secreción de PRL por los esteroides ováricos que se presenta en el ciclo estral, durante la lactancia la secreción de prolactina está sujeta al control de los impulsos aferentes generados por la succión y como consecuencia de esto, la PRL es liberada físicamente durante dicho periodo.

En el proceso de lactancia, la PRL actúa específicamente en la membrana plasmática de las células del epitelio de la glándula mamaria en donde se engarza covalentemente a su receptor, después de lo cual una considerable porción de la hormona o del complejo hormona-receptor es internalizado y situado dentro de la célula blanco en vesículas endocíticas pegadas a la membrana. Estas vesículas pueden ser degradadas por lisosomas o desplazarse al núcleo de la célula en donde realizan acciones directas y/o indirectas a través de provocar la activación de proteínas unidas a AMPc y proteínas cinasas que participan como segundos mensajeros en el proceso de interacción entre la hormona y la respuesta a nivel genético. Ambas acciones resultan en la alteración de la síntesis de algunas de las enzimas implicadas en la producción de los componentes lácteos, como son la lactosa sintetasa y enzimas del metabolismo de lípidos incluyendo Acetil-CoA carboxilasa. Además, el complejo hormona-receptor tiene la capacidad de activar la ATPasa Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> que ocasiona cambios iónicos dentro de la célula y afecta al aparato de Golgi (Fig. 18) (10 y 63).

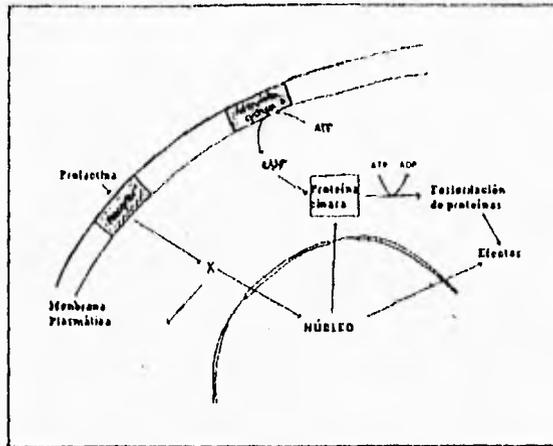


Fig. 18 - Esquema del mecanismo por el cual la prolactina puede estimular la fosforilación de proteínas en la glándula mamaria, por medio de la proteína quinasa dependiente de AMPc. La x representa un segundo mensajero putativo que puede mediar el efecto de la hormona a nivel del núcleo o a otros niveles. (Tomada de Wallis M., Howell S.L. y Taylor K.W. 1985 The biochemistry of the polypeptide hormones)

## I. 7.- HETEROGENEIDAD MOLECULAR DE LA PROLACTINA

Se han documentado más de 100 efectos biológicos distintos de la PRI., extendiéndose éstos como ya se mencionó, desde el desarrollo mamario y la lactancia en mamíferos, la osmorregulación en peces, el comportamiento de anidación en aves, hasta el crecimiento y la metamorfosis en anfibios. La pregunta que muchos autores se han hecho es: ¿cómo una hormona con tales características genéticas y moleculares puede provocar tan variadas respuestas fisiológicas?. La demostración de la existencia de la hormona en diferentes formas moleculares y la heterogeneidad que ésta presenta como

consecuencia de cambios postraduccionales, permiten abrir una puerta para responder a esta pregunta (21, 30, 49, 50, 59, 60 y 61).

En 1971 Karen Swearingen observó a partir de experimentos *in vitro*, de incubación de adenohipófisis provenientes de ratas tratadas con estrógenos y mediante el marcaje isotópico de PRL, y a través de establecer las diferencias entre la pérdida de la hormona marcada en el tejido y su secreción al medio de incubación, la presencia de por lo menos dos formas de PRL, una de ellas no detectable en el tejido y detectable una vez que es secretada en el medio, y la segunda detectable continuamente (61). Este es uno de los estudios que han sugerido que las diferentes formas de la hormona están asociadas con cambios intracelulares y la secreción de PRL de los mamotropos.

En la rata lactante, bajo la influencia de un estímulo neurológico como la succión, la prolactina madura de la AII presenta un rápido proceso de depleción-transformación, transitando de una forma preliberable a una liberable. Este proceso es reversible y la PRL que es transformada, es liberada constantemente en la circulación con una tasa de 400-600 ng/min. Esto ocurre simultáneamente a la repleción de la hormona depletada que queda empaquetada en la AII. Si la estimulación neurológica se mantiene un período suficiente de tiempo, el total de la prolactina liberada en el plasma eventualmente se aproxima al total de la PRL depletada dentro de la hipófisis (18 y 19). Este proceso de depleción-transformación parece estar relacionado con un incremento de estabilidad de la PRL debido a un cambio en su solubilidad (de una forma más soluble a una menos soluble) (35 y 37). El proceso de transformación de la hormona ocurre después de la biosíntesis y los factores hipotalámicos pueden afectar diferencialmente la transformación y secreción, dependiendo de la edad de la hormona. La inhibición dopaminérgica actúa sobre ambos procesos (transformación y secreción) y los secretagogos como TRH estimulan solamente la secreción de PRL (19 y 41).

Ahara se sabe que los cambios en la detectabilidad (depleción) de la PRL en AII de ratas lactantes se deben al incremento en las formas poliméricas, generadas a partir de la unión de formas monoméricas por medio de puentes disulfuro. Este intercambio tiol-disulfuro depende del pH intragranular (40). Se ha observado que una solución con pH alcalino incrementa la detectabilidad de la hormona y un pH ácido la decremента. El incremento o decremento en la detectabilidad de la hormona, sugiere que el intercambio tiol-disulfuro es reversible y por tanto puede cambiar de una forma detectable a una no detectable y viceversa (Fig. 19) (37).

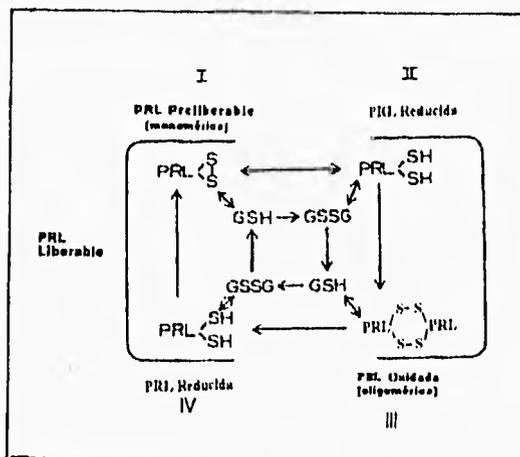


Fig. 19.- Esquema de las reacciones químicas de intercambio tiol-disulfuro que forma el oligómero de PRL. Como se observa en este esquema, dicha reacción puede ser reversible. (Esquema inédito proporcionado por el Dr. F. Mena)

Lewis en 1984 propuso la hipótesis de que la PRL puede ser una prohormona, sintetizada como un precursor y convertida en diferentes formas bioactivas a medida que pasa por el camino de la secreción. Estas modificaciones generan formas que difieren unas de otras en cuanto a peso molecular o a carga y son resultado de cambios postraduccionales (30 y 49) Es claro que muchas de las modificaciones enzimáticas

importantes en el procesamiento de péptidos no son únicas para la producción de péptidos neuroendócrinos. Sin embargo, se ha observado que el precursor del péptido neuroendócrino tiene una señal hidrofóbica en su amino terminal (NH<sub>2</sub>) y sufre dos modificaciones iniciales en la cisterna del retículo endoplasmático rugoso: la formación de puentes y la N/glicosilación. Las modificaciones postraduccionales más específicamente asociadas con la producción neuroendócrina de péptidos comienzan en la región trans-Golgi e incluyen la endoproteólisis, exoproteólisis y la amidación, otras modificaciones tienen lugar en las demás cisternas de Golgi, como el caso de la fosforilación específica de treonina y serina que se realiza en la cisterna Cis y se muestran en la figura 20 (32).

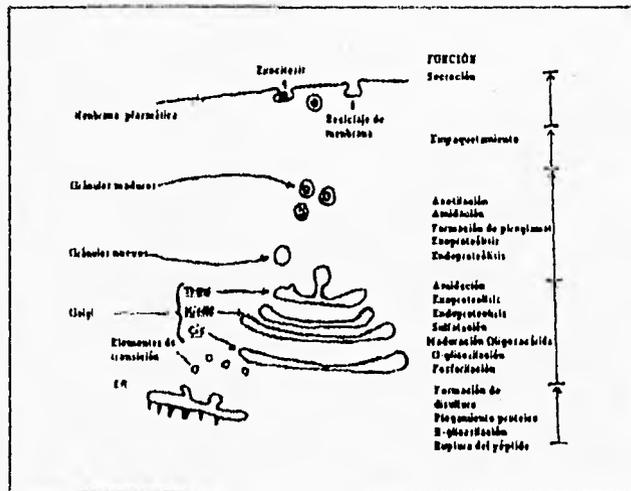


Fig. 20.- Diagrama de los principales pasos realizados en la conversión de las prohormonas en sus productos finales y los sitios en donde estos ocurren en la célula. (Tomada de Muir R., et. Al Cellular and molecular aspects of peptide hormone biosynthesis in *Front in Neuroendocrinol.* (1990) Vol. 11, No. 1.)

### 1) Corte

Es el cambio mediante el cual, la molécula es cortada por enzimas específicas, dando lugar a fragmentos con actividad biológica; este es uno de los procesos postraduccionales más observado. El corte más frecuente en la PRL ocurre en el asa mayor de la hormona y por medio de una reducción da lugar a un fragmento de 16K y uno pequeño de 8K (42, 58 y 59)

### 2) Glicosilación

En este proceso, la prolactina glicosilada (G-PRL) se forma a partir de la unión de una unidad carbohidratada en diferentes sitios de la secuencia aminoacídica de la molécula, y su cantidad en la glándula hipófisis varía considerablemente según la especie.

Con la forma glicosilada de la PRL, la actividad de unión al receptor se reduce ampliamente y sus acciones fisiológicas disminuyen, por lo que se ha propuesto que la G-PRL es un regulador selectivo de las acciones de la prolactina en los tejidos blanco (58 y 59).

### 3) Desaminación

Este proceso involucra la pérdida de un amonio de aspargina y glutamato. La desaminación se facilita por las condiciones alcalinas y confiere a la molécula una característica más ácida, reduciendo su actividad biológica e inmunológica (58 y 59).

### 4) Dímeros y Polímeros

Tanto los dímeros como los polímeros, pueden generarse por la formación de puentes covalentes y no covalentes (los puentes covalentes pueden incluir uniones disulfuro). En todos los casos, las proteínas oligoméricas se forman en el retículo endoplásmico. La molécula de alto peso molecular que se forma a partir de la unión de varios monómeros, generalmente presenta una actividad biológica reducida en

comparación con la molécula de bajo peso molecular (monomero). Como se mencionó anteriormente la formación de polimeros esta involucrada en el empaquetamiento, transformación y liberación de la hormona (Fig. 21) (8, 58 y 59)

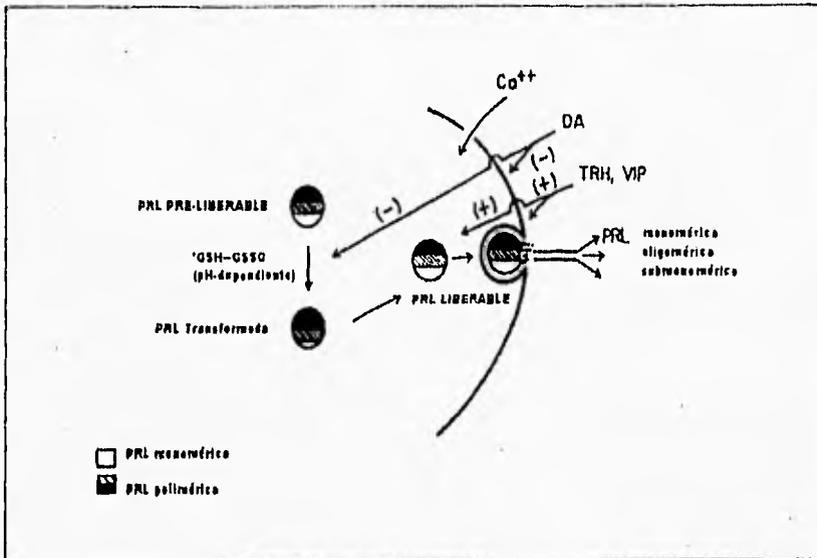


Fig 21 - Esquema de la formación de los oligómeros de PRL a partir de la estimulación o inhibición de factores hipotalámicos y el intercambio red-ox (Esquema inédito proporcionado por el Dr. F. Menu)

### 5) Fosforilación

Para la formación de la PRL fosforilada, se presenta una unión covalente de fosfatos a la cadena aminoacídica de la molécula en los residuos de serina y treonina. Este cambio postraduccional ocurre en los gránulos secretores de los lactotrofos, justo antes de la exocitosis. La fosforilación como la glicosilación generan una disminución en la actividad de la PRL en bioensayos clásicos como el de Nb2 (65).

En la rata se han descrito 4 isoformas de PRL que presentan el mismo peso molecular y diferente carga, estas isoformas son atribuidas a la fosforilación de la hormona. De todas estas isoformas, se ha observado que es en la isoforma 2 de la PRL en que la hormona se encuentra más condensada (21). Por medio del análisis bidimensional se ha encontrado que la incorporación de fosfatos se realiza en las isoformas 2, 3 y 3' (51). En este proceso de fosforilación de la PRL parecen estar involucrados 4 o 5 proteínas cinasas, como la proteína cinasa dependiente de AMPc que es activada por agentes  $\beta$ -adrenérgicos, vía la enzima adenilato ciclasa y la cinasa C (51). La actividad de muchas de estas enzimas, como la proteína cinasa A, parece ser específica (2).

La presencia de PRL fosforilada en el tejido de la hipófisis y en el medio obtenido a través del cultivo de dicho tejido, sugieren que esta forma de PRL puede ser liberada de los lactotropos y tener un significado fisiológico específico (2). Los resultados obtenidos a partir del análisis de hipófisis de ratas en diferentes estadios del ciclo estral, muestran una liberación desproporcionada de las diferentes isoformas de carga, por ejemplo, durante la tarde del proestro no se presenta una liberación de las 3 isoformas difosforiladas de PRL, durante el estro la isoforma 1 de PRL es liberada mayormente y durante el embarazo en éstos animales, la proporción de prolactina no fosforilada a fosforilada incrementa y sufre una notable fosforilación durante la inducción producida por la succión en la transformación y liberación de la hormona (59).

## ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

Actualmente se sabe que en los lactotrofos de la adenohipófisis de la rata lactante, la PRL se encuentra condensada en gránulos en formas pre-liberables. Estas formas se transforman a su vez en formas liberables a partir de las cuales sucede la liberación excitotóxica; tanto la transformación como la liberación son activadas por el estímulo de la succión de las crías a la madre (17, 25 y 29). Con base en este modelo, se ha desarrollado una hipótesis para el mecanismo que involucra la regulación de la secreción de PRL. Este modelo implica que tanto el procesamiento como la transformación y la liberación de la hormona, ocurren secuencialmente después de su biosíntesis (36 y 39) y que diversos factores hipotalámicos pueden afectar diferencialmente su transformación y liberación, dependiendo de la madurez de la hormona (38). La disponibilidad de PRL en la hipófisis para ser transformada en formas liberables y para la liberación propiamente dicha, requiere de un proceso de maduración intracelular de la hormona que se inicia a partir de su biosíntesis (36), en este sentido se ha demostrado que durante la incubación *in vitro* de AHs de ratas lactantes, la hormona madura (sintetizada y marcada isotópicamente 4-8 horas antes de su liberación) se libera con mayor preferencia que la hormona joven (sintetizada una hora antes) o que la hormona vieja (sintetizada de 16-24 horas antes de su liberación), y que esta última, es degradada por el sistema lisosomal del lactotrofo (60). Estos resultados, junto con otros estudios realizados previamente, sugieren que el procesamiento, transformación, liberación y degradación de la PRL, ocurre secuencialmente después de la biosíntesis en paralelo con la maduración de la PRL en la forma gránular (11).

Con respecto a la naturaleza de la prolactina liberable y al mecanismo involucrado en su transformación, trabajos recientes han demostrado que ésta ocurre como resultado de la activación de mecanismos reversibles de intercambio tiol-disulfuro, pH dependientes, entre monómeros/polímeros de prolactina (40). Esta transformación de la molécula de prolactina, producida por un cambio postraduccional en su conformación,

genera una disminución en su detectabilidad y puede determinar el aumento o disminución de su liberación (35). Esta disminución en su detectabilidad es ocasionada, en parte, por la polimerización de la hormona (40), ya que, además de esta modificación, recientemente se ha observado que pueden ocurrir otros tipos de cambios postraduccionales a la molécula que le confieren esta característica. En este sentido, algunos autores han demostrado que la hormona puede presentar una fosforilación específica en al menos una de las variantes de carga que se han reportado (2 y 51). Este hecho ha generado la hipótesis de que durante la transformación de la hormona, pueden ocurrir reacciones de fosforilación que le confieran cambios en sus propiedades de detectabilidad inmunológicas e incluso biológicas.

## OBJETIVO

Este estudio tiene como objetivos analizar la posibilidad de que además de los cambios en las variaciones de masa de la prolactina, ocurran cambios que formen variantes de carga de esta hormona producto de una fosforilación durante su transformación, y analizar si la fosforilación de la PRL implica modificaciones en su detectabilidad por métodos convencionales de titulación o cambios en su actividad inmunológica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

En todos los experimentos se emplearon 20 ratas primíparas lactantes de la cepa Wistar, mantenidas en jaulas individuales en un cuarto con temperatura de 23 a 25 °C con un período de 14 hrs luz y 10 hrs oscuridad; con alimento y agua *ad libitum*. Las ratas fueron sacrificadas por medio de decapitación, previa anestesia ligera de éter, después de haber sido separadas de sus crías (de 7 a 10 días) durante un periodo de 8 hrs. Las AHs de estos animales fueron rápidamente extraídas y divididas en 4 porciones (cada porción con un peso aproximado de 2 a 3 mg.).

### **Procedimiento de incubación para la obtención de medios.**

Las porciones de adenohipófisis de cada rata, utilizadas para la obtención de medios de incubación, fueron incubadas en 0.3 ml. de medio Earle (pH 7.2-7.4). En una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>, en un agitador metabólico a 37 °C (125 rpm, American Optical Corp. modelo 0256), durante 30 min.; los medios de incubación fueron colocados en tubos Eppendorf de 1ml que contenían 0.1 ml de residuo deshidratado de 0.75 M sacarosa en buffer Tris-glicina a pH 8.3. Al terminar la incubación los tejidos fueron pesados y conservados en congelación hasta su utilización.

### **Procesamiento de las muestras y determinación de la concentración de PRI en tejido y medio.**

Las concentraciones de prolactina fueron determinadas con el método de PAGE-densitometría (electroforesis en geles de poliacrilamida) en condiciones nativas (45). Para ese fin se emplearon tubos para geles de poliacrilamida al 7.5%, preparado a pH 9.4 el gel espaciador y con un grosor de 5 mm preparado a pH 7.2 el gel concentrador. Los tejidos de las AH de rata pre- y post- incubados fueron homogeneizados mediante un homogeneizador de vidrio (Micro Tissue Grinder Kontes) en buffer Tris-HCl 0.05 M a

pH 8.2, y se colocó en el gel un volumen correspondiente a un miligramo de tejido ó 200 µl de medio en cada columna. La electroforesis se llevó a cabo con buffer Tris-Glicina, pH 8.3 y se aplicó una corriente de 1mA por gel durante 2 min.; después de esto, la corriente se incrementó a 4 mA por gel, hasta que el frente iónico se desplazó a aproximadamente 5 mm del extremo inferior del gel. Los geles fueron teñidos durante 3 hrs. con Amido Black en 7.5% de ácido acético y el exceso de tinte fue removido utilizando un baño de ácido acético al 7.5%, en un desteñidor por corriente (Cabalco). La concentración de PRL se obtuvo a partir de la lectura densitométrica de la banda de prolactina (previamente identificada su posición mediante su comparación con un estandar) utilizando un vídeo densitómetro, modelo 620 Bio-Rad.

#### Condiciones experimentales

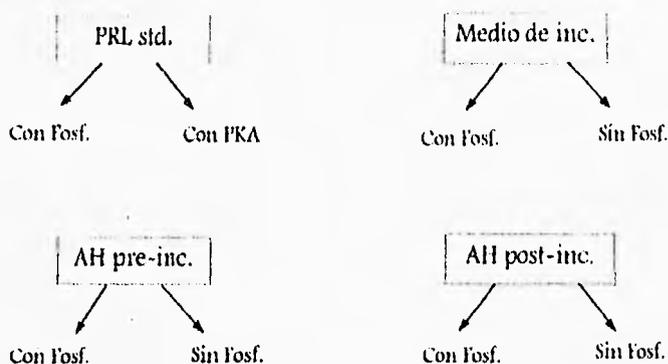
Para este estudio, se emplearon AHI de ratas lactantes previamente separadas de sus crías durante 8 Hrs. Las glándulas fueron incubadas o no durante 30 min. Posteriormente se determinó en ellas y en los medios de incubación la concentración de PRL y se utilizó el estandar B6 de PRL (NIDDK, NIH).

Con el propósito de observar el cambio en la detectabilidad de la PRL en cada una de las condiciones experimentales y una vez determinada la concentración de PRL para cada uno de estos grupos, se utilizó el material de cada uno de ellos que contuviese 50 µg de PRL para posteriormente ser incubados con o sin fosfatasa ácida, durante 2 hrs. a 37°C en un agitador metabólico. Se empleó fosfatasa ácida de próstata humana (Sigma) de la cual se utilizaron 0.1 U (en buffer de acetatos de Sodio 0.1M a pH 5.0) por cada 20 µg de PRL.

Antes de la incubación, a todas las muestras experimentales se les adicionó la fosfatasa ácida correspondiente. Las muestras control recibieron una cantidad de buffer de acetatos igual a la cantidad de fosfatasa adicionada a las muestras experimentales.

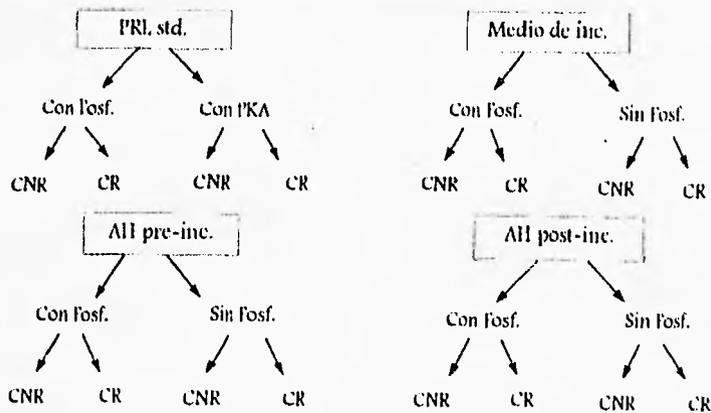
además; a todas ellas se les agregó 1.5 µl de cada uno de los inhibidores de proteasa (Pepstatina, Pefabloc, Fosforamidón, PMSF y EDTA; Sigma).

Con el fin de observar las diferencias entre la PRL desfosforilada y la PRL refosforilada, las muestras de PRL estándar fueron desalinizadas y posteriormente incubadas durante 90 min. a 37°C con o sin 30U de la subunidad catalítica de la proteína cinasa A (PKA, Sigma), 5 mM ATP (Calbiochem) en buffer Tris-HCl 50 mM, MgCl<sub>2</sub> 10 mM a pH 1.4. A continuación, se muestra el esquema correspondiente a estas manipulaciones.

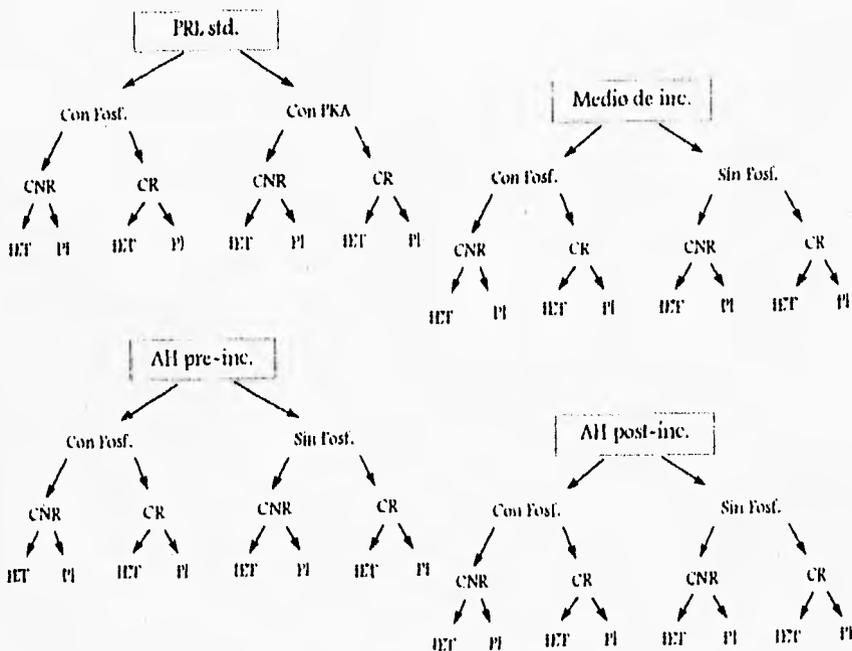


Concluidas las incubaciones, para eliminar las sales las muestras fueron colocadas en tubos con un filtro de 10Kd y centrifugadas (centrifuga Sorvall RMC 14 (DuPont) a 2700 rpm y 4°C, durante 3 periodos de 30 min. Al cabo de cada periodo de centrifugación se adicionaron 100 µl de agua bidestilada. Una vez lavadas, las muestras fueron divididas en dos para ser evaporadas (en un evaporador Savant Speed Vac SC 110).

Con el objetivo de separar las proteínas de acuerdo a su carga eléctrica, las muestras evaporadas se sometieron al procedimiento electroforético de primera dimensión. Con este propósito, la mitad de las muestras se disolvieron en 7  $\mu$ l de solución SDS 10% reductora (Detergente de Dodecil Sulfato de Sodio con DTT 2.32%, Dithiothreitol) y su contraparte en solución SDS 10% no reductora (sin DTT). Ambas muestras recibieron además, 25  $\mu$ l de agua bidestilada y 70  $\mu$ l de solución de SDS 1%. Una vez preparadas, las muestras se depositaron en los capilares que contenían los geles de acrilamida/bis-acrilamida (29.3:0.7) y se aplicó una corriente de 500 V durante 10 min. y 750 V durante 3 hrs con 30 min. Terminado este proceso, se empleó la segunda dimensión para obtener la distribución de las proteínas, por medio de su separación de acuerdo a su masa. Para este propósito, los geles fueron transferidos a geles de poliacrilamida en placa en condiciones desnaturalizantes. La concentración de poliacrilamida en el concentrador fue de 4% y de 12.5% en el resolvidor. Los geles que en la primera dimensión fueron corridos con solución reductora, en las placas de segunda dimensión fueron bañados con 100  $\mu$ l de condiciones reductoras (solución con 5% de  $\beta$ -mercapto etanol) y, a los geles que en la primera dimensión fueron corridos con solución no reductora se les adicionó igual cantidad de condiciones no reductoras (sin  $\beta$ -mercapto etanol) y, estas condiciones contenían además azul de bromofenol. Durante la electroforesis se aplicaron 100 V en el gel concentrador y 200 V para el gel resolvidor. A continuación, se muestra el esquema empleado en esta fase de los experimentos.



Terminada la electroforesis de 2ª dimensión, la mitad de los geles fueron electrotransferidos a una placa de papel de inmobilón (Bio-Rad Immun-lite Blotting Membrane 162-0170), durante 30 minutos a 250 mA, la cual posteriormente fue enjuagada con agua destilada e inmunoteñida. Para realizar la inmunotinción se emplearon dos anticuerpos disueltos en leche 1% (diluida con solución de TTBS). El primero de ellos, la Prolactina Anti-rata generado en suero de conejo (Sigma, AFP425-10-91) en dilución 1/10,000, y el segundo: igG (H+L) Anti-conejo generado en suero de cabra con fosfatasa alcalina conjugada (Bio-Rad, 170-6518) en dilución 1/3,000. Posteriormente se incubaron las placas con el sustrato quimioluminiscente (Immun-lite Chemiluminescent substrate kit. Bio-Rad 170-6473) por 5 min. y se expusieron por 10 min. a una placa fotográfica Kodak X-OMAT. La otra mitad de los geles, fue teñida con tinción de plata para observar la cantidad total de proteína contenida en las muestras.



## RESULTADOS

Los resultados obtenidos con el procedimiento antes descrito, son los siguientes: Bajo condiciones no reductoras (CNR) sin fosfatasa ácida, en los tejidos de adenohipófisis pre-incubados y post-incubados fueron detectadas las variantes de tamaño de 24, 26, 45 y 66-100 KDa (Figs. 22A y 22B); mientras que en el medio de incubación, solamente se observó la variante de 24 KDa (Fig. 23A). Por otro lado, bajo condiciones reductoras (CR) sin fosfatasa ácida fué detectada en las AHs una variante adicional de 22 KDa (Figs. 24A y 24B), mientras que en el medio de incubación sólo se encontró la misma variante de 24 KDa (Fig. 23B). En los resultados obtenidos para estas muestras tratadas con fosfatasa ácida se observa que en la mayoría de ellas (no en tejido pre-incubado CR) se presenta un aumento en la detectabilidad de las variantes de masa, además de la aparición en todas las condiciones de una variante de carga con un punto isoeléctrico (pI) de 5 y en algunos casos menor a 5 (Figs. 22 C y D, 23 C y D y 24 D). En el caso de la PRL-B6 de rata con fosfatasa (en IET y plata), solamente se observaron variantes de 24 y 45 KDa (Fig. 25).

En las regiones de cada una de las variantes de tamaño que se observaron, se encontraron también diferentes variantes de carga con puntos isoeléctricos (pI) de 4.8, 5.1, 5.2, 5.5, 5.7, 6.0 y, en algunos casos, 6.3, 6.7, 6.9 y 7.0. La detectabilidad y presencia de estas variantes de carga, cambió de acuerdo con el tipo de muestra (tejido, medio o PRL estándar), condición (CR o CNR) y tratamiento experimental (con o sin fosfatasa).

El efecto de la desfosforilación (por incubación con fosfatasa) y refosforilación (por la incubación con PKA) de rPRL-B6 estándar se muestra en la figura 25, en la cual, se observa que la refosforilación repercute sustancialmente en la inmunodetectabilidad de la hormona (Figs. 25 B vs. D). Por el contrario, si se compara el estándar defosforilado con el estándar refosforilado teñidos ambos con plata (Figs. 25A

vs 25C), se observa que como resultado de estas manipulaciones no ocurre ningún cambio mayor en la detectabilidad de la proteína bajo este método. Por otro lado, si se compara la PRL desfosforilada teñida con plata con el mismo estándar inmunoteñido (Figs 25A vs. 25B), se revela en esta última una detectabilidad de la hormona considerablemente mayor y la presencia de al menos 3 variantes adicionales de carga (pl 5.0, 5.2 y 6.0).

Ahora bien, con relación a los tejidos se hicieron las siguientes observaciones. Si se comparan los resultados obtenidos de las AHS pre-incubadas con los resultados de las AHS post-incubadas bajo condiciones no reductoras sin fosfatasa (Figs 22A vs. 22B), se advierte en ésta última una disminución en la inmunodetectabilidad de la variante de 24 KDa asociada a un incremento en las variantes de alto peso molecular (mayores de 100 KDa). Estos cambios que se observan en condiciones NR, se acentuaron con relación a la variante monomérica (24KDa) y dimerica (~45KDa) y desaparecieron en las variantes menores a 100 KDa, bajo condiciones reductoras. Por otra parte, bajo condiciones CR y CNR, con fosfatasa ácida, se observó un incremento en la detectabilidad de la hormona (PRL de 24 y 45 KDa) de AHS post-incubadas (con respecto a AHS pre-incubadas y a AHS post-incubadas sin fosfatasa) y medio de incubación (Fig 22D vs. 22C y 22B, 24D vs. 24C y 24B y 23D). Asimismo, en condiciones reductoras la detectabilidad de PRL fue menor en AHS pre-incubadas (Figs. 24C vs. 24A). Este efecto que se observa, ocurre en las regiones 24 y 45 KDa y afecta sobre todo a las variantes de carga de 5.1-5.7 y menores a 5.

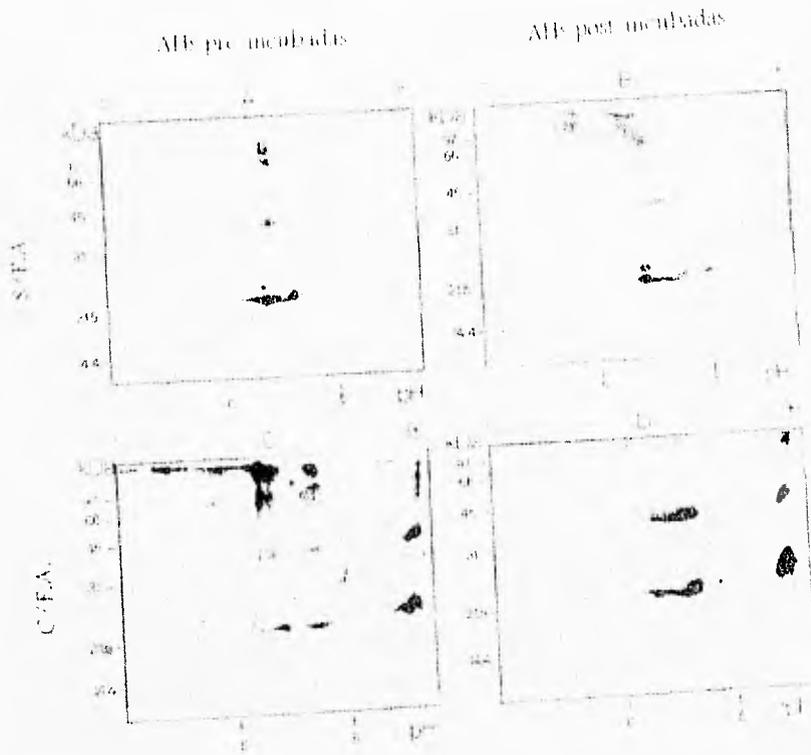


Fig. 22.- Análisis por electroforesis bidimensional realizada bajo condiciones no reductoras, se muestran las placas electrotransferidas e inmunocuidadas de los tejidos pre-incubados (A y C) y post-incubados (B y D), sin fosfatasa ácida (A y B) y con fosfatasa ácida (C y D).

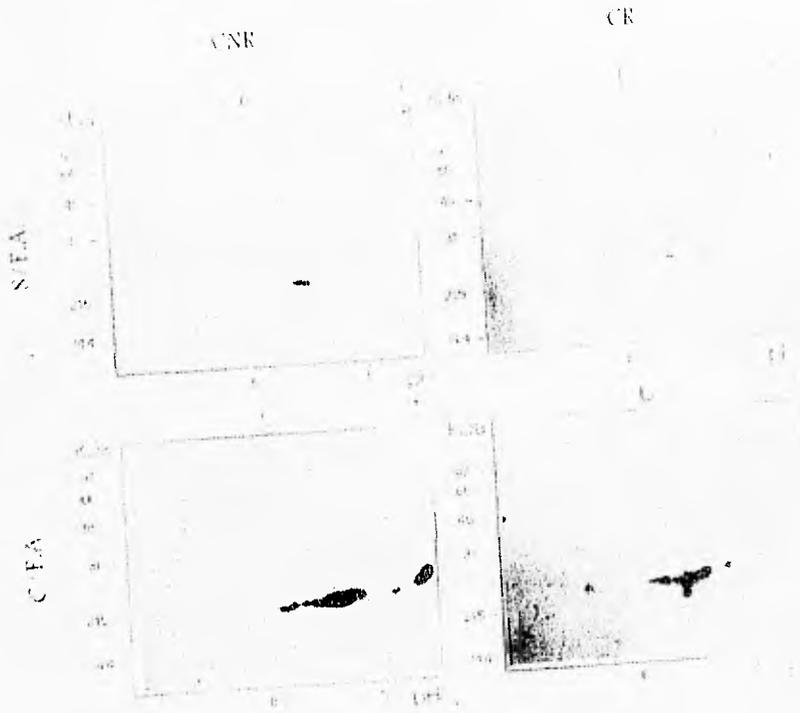


Fig. 23 - Analisis por electroforesis bidimensional realizada bajo condiciones no reductoras (A y C) y reductoras (B y D) e inmunotinción de la PRE secretada (medio de incubación), incubada con fosfatasa ácida (A y B) y sin fosfatasa ácida (C y D)

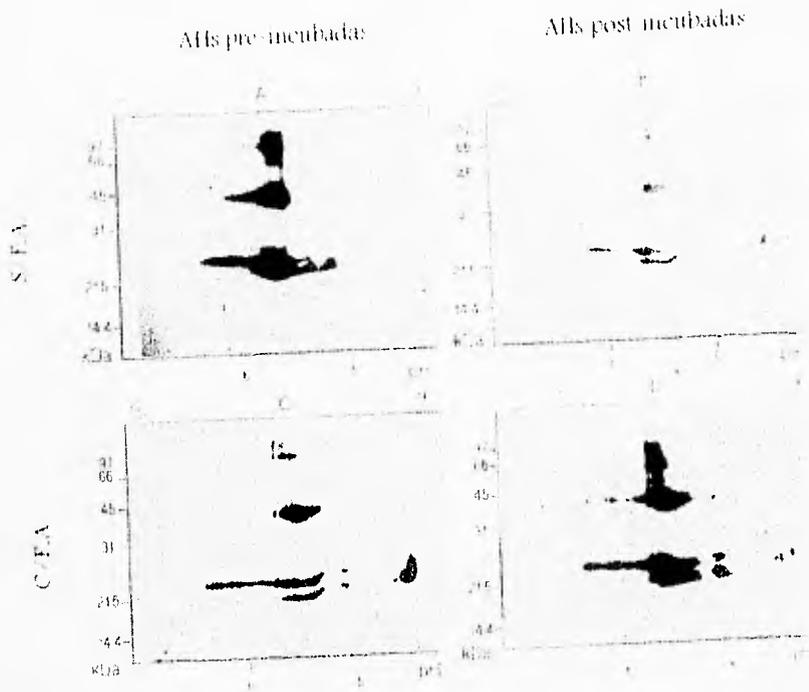


Fig. 24 - Analisis por electroforesis bidimensional realizada bajo condiciones reductoras, se muestran las placas electrotransferidas e inmunotendidas, de los tejidos pre-incubados (A y C) y post-incubados (B y D), sin fosfatasa acida (A y B) y con fosfatasa acida (C y D)

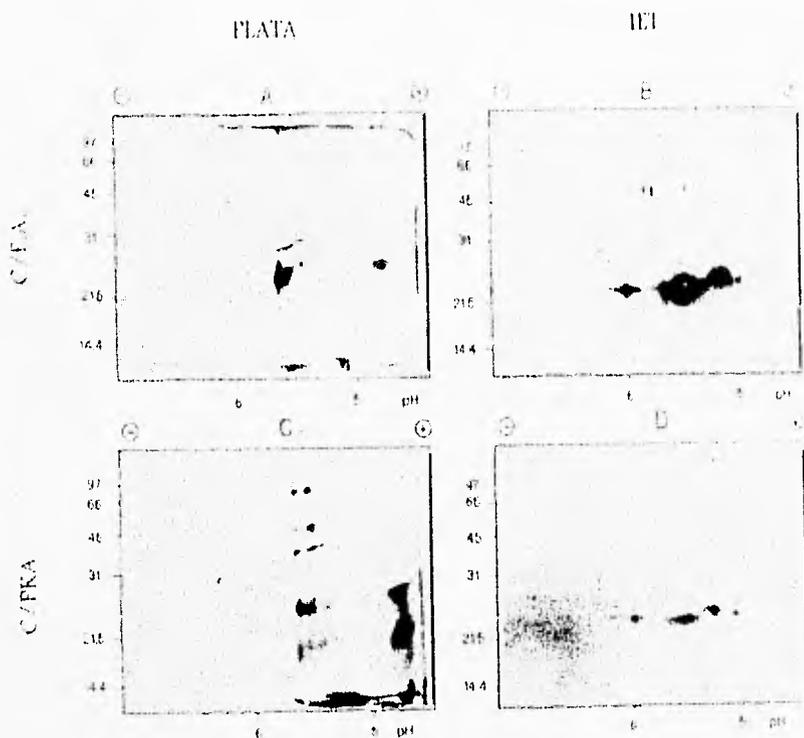


Fig. 28.- Efectos de la desfosforilación y refosforilación de la prolactina. El estandar B6 de PRL (3µg) fue inicialmente desfosforilado por el tratamiento con fosfatasa ácida (0.1 U, 2 hrs. A 37°C en 0.1 buffer de acetato de sodio, pH 5.0). Después de desalinizadas, las muestras fueron incubadas con la proteína cinasa A (PKA, 30U) y 5mM ATP en buffer 50mM Tris-HCl, MgCl<sub>2</sub> pH 7.4, por 90 minutos a 37°C. Después, las muestras fueron sometidas a una electroforesis bidimensional seguida por una tinción de plata o por una inmunotinción. En las placas A y B, se muestra el efecto de la desfosforilación (rPRI-B6 tratada con fosfatasa ácida) y, en las placas C y D se muestra el efecto de la refosforilación (rPRI-B6 desfosforilada y tratada con PKA). Las placas A y C, con tinción de plata y B y D inmunotintadas. El análisis de estas muestras, fue hecho bajo condiciones reductoras.

Tabla que sintetiza los resultados obtenidos en el presente trabajo.

	CNR		CR	
	Sin Fosfatasa	Con Fosfatasa	Sin Fosfatasa	Con Fosfatasa
<b>Tejido pre-incubado</b>	Variantes de masa: 24, 26, 45, 66-100 KDa Variantes de carga: pl de 5.1 a 5.7.	Aumenta la detectabilidad de las variantes de peso de 24, 66-100 y mayores a 100 KDa; desaparece la variante de 26 KDa. Se observa una variante de carga adicional menor a un pl de 5	Variantes de masa: 22, 24, 26, 45 y 66-100 KDa. Variantes de carga: pl de 5 a 7.	Disminuye la detectabilidad de las variantes de diferente peso molecular, desaparece la variante de 26 KDa y se observa una variante de carga adicional con un pl menor a 5.
<b>Tejido post-incubado</b>	Variantes de masa: 24, 26, 45 y 66-100 KDa. Variantes de carga: pl de 5.1 a 5.7	Aumenta la detectabilidad de las variantes de peso de 24 y 45 KDa, desaparece la variante de 26. Se observa una variante de carga adicional, menor a un pl de 5.	Variaciones de masa: 22, 24, 26, 45 y 66-100 KDa. Variantes de carga: pl de 5.4 a 7.	Aumenta la detectabilidad de todas la variantes de peso molecular y se observa una variante de carga con un pl 5.1 y menor a 5.
<b>Medio de incubación</b>	Variante de masa: 24 KDa. Con un pl de 5.5	Aumenta considerablemente la detectabilidad de la variante de peso de 24 KDa y esta se presenta con pl de 5 a 6 y menor que 5.	Variante de masa: 24 KDa Con un pl de 5.5	Aumenta la detectabilidad de esta variante de peso molecular y se presenta con pl de 5.5 a 6.

	PLATA		IET	
	Con Fosfatasa	Con PKA	Con Fosfatasa	Con PKA
<b>PRI-B6</b>	Variantes de masa: 24 y 45 KDa.	Variantes de masa: 24, 26, 45 y 66 KDa Disminuye la detección de la variante de 24 KDa.	Variantes de masa: 24 y 45 KDa.	Baja considerablemente la detectabilidad de las variantes de masa.

## DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo indican, en primer lugar, que la fosforilación de la PRL está asociada al decremento en su inmunodetectabilidad. De este modo, a diferencia de la comparación del resultado de la acción de la fosfatasa ácida y la refosforilación, en las placas teñidas con plata (Fig. 25 A vs. C) en las cuales no se observó ningún cambio en la detectabilidad del estándar rPRL-B6, en las placas inmunoteñidas se pudieron observar diferencias marcadas entre la rPRL-B6 estándar tratada con fosfátasa y la prolactina estándar tratada con PKA (Fig. 25 B vs. D); en la cual se observa una disminución clara en la detectabilidad de la hormona al ser refosforilada por el tratamiento con PKA. Estos resultados son consistentes con los reportados por Krown y colaboradores (1992) y Wang y Walker (1992), sobre el incremento en la bioactividad del estándar de PRL de rata (a través de su efecto en cultivo de células) producido por la desfosforilación. En el caso de nuestros resultados, el aumento en la detectabilidad inmunológica de la hormona por su desfosforilación, supone un aumento en su actividad inmune. El efecto que se genera a partir de la fosforilación de la prolactina, puede suponerse que es debido a un cambio postraduccional de la hormona, que puede dar lugar a una modificación de la conformación molecular de la proteína, afectando la unión de los anticuerpos a la molécula y por tanto su reconocimiento inmunológico.

La unión de fosfatos en la superficie de la molécula, no solo modifica su comportamiento inmunológico, sino que además, le confiere a la molécula de prolactina diferentes cargas según el lugar y la cantidad de fosfatos que se le unan. Este efecto se hace notable por la diversidad de puntos isoelectrónicos que se encontraron y que varían entre 4.8 y 7.0 según la muestra, la condición y el tratamiento de las muestras con factores que modifican de una u otra forma la unión y el tipo de unión de los fosfatos a la prolactina. En adición, en el presente estudio, la inmunotinción reveló la presencia de al menos 3 variantes adicionales de carga de rPRL (Fig. 25B) no reportadas previamente.

Al hacer la comparación de los resultados de las AII's pre-incubadas con los de las AII's post-incubadas, se muestran cambios en las variantes de masa y de punto isoeléctrico, asociadas a un decremento en las formas monoméricas y un incremento en las formas poliméricas de PRL, que confirman los resultados presentados previamente por Mena y colaboradores en 1992

La transformación de la hormona durante la fosforilación de la misma, tiene como algunos autores han reportado, al menos 3 repercusiones fundamentales:

- 1) El análisis de la secuencia aminoacídica de la prolactina de rata ha revelado que existen 24 residuos que pueden ser potencialmente fosforilados (16 serina y 8 treonina) y que estos residuos son, a su vez, parte de la secuencia de reconocimiento de muchas proteínas cinasas, estos hechos, hacen suponer que la fosforilación de dichos residuos, resulta en una protección de la hormona para no ser degradada (50).
- 2) Los experimentos realizados en células GH<sub>3</sub> (células secretoras de GH y PRL) muestran que algunas isoformas fosforiladas de PRL, inhiben la proliferación de estas células en la hipófisis y regulan de una manera autócrina su propia secreción (26 y 59)
- 3) El efecto inhibitorio de la PRL fosforilada sobre la tasa de división de las células Nb<sub>2</sub> que antagoniza el efecto estimulador sobre las mismas células por la PRL desfosforilada, presumiblemente asociada a una afinidad diferencial al receptor y/o por generar diferentes señales intracelulares; y las diferencias encontradas en la secreción de las isoformas de PRL durante el ciclo estral, sugieren que las fluctuaciones en la actividad biológica e inmunológica de la PRL durante este ciclo y las diferentes funciones fisiológicas que esta hormona presenta en los organismos, pueden estar dadas al menos en parte por las fluctuaciones en las isoformas de prolactina liberadas al plasma (21 y 60).

En conjunto, los resultados enfatizan la importancia de la fosforilación de la PRL tanto como que representa un mecanismo de protección de la hormona en el medio, como también una función fisiológica de la misma.

Por otro lado, en los experimentos presentes, en paralelo al cambio de las formas monoméricas a poliméricas y viceversa, se observó un decremento en la detectabilidad de la hormona en el tejido post-incubado (Figs. 22 y 24 B) y de la PRL liberada (Fig. 23 A y B) en condiciones sin fosfatasa. Para el primero de estos casos, se puede concluir que uno de los efectos más importantes de la incubación del tejido de AH es la activación de los mecanismos de transformación de la hormona, merced de la suspensión del tono dopaminérgico, de manera similar al efecto de la succión, que la convierten de una forma preliberable a una liberable como efecto de una estimulación y que se observa en la presencia de una mayor cantidad de prolactina fosforilada. Esto sugiere que la acción de un efecto fisiológico que representaría una función particular de la hormona estimula la fosforilación de la PRL y que ésta se presenta efectivamente durante la transformación, siendo la forma resultante subsecuentemente liberada de la glándula. En el segundo caso, los datos sugieren que tanto la fosforilación como la polimerización constituyen mecanismos de protección para que la hormona pueda ser conservada en la célula sin ser degradada y pueda ser liberada posteriormente.

La caracterización de las isoformas que se obtuvieron en este trabajo a partir de el estudio de la prolactina de rata lactante, no se realizó debido a las diferencias cualitativas que presentaron estos resultados con respecto a las caracterizaciones realizadas de la hormona por diferentes autores, en otras etapas del ciclo sexual o en otras condiciones experimentales (21, 50 y 51). Sin embargo, podemos suponer que estas diferencias no son producto de artefactos generados por el método, y si más bien, resultado de las diferencias moleculares generadas en las diferentes etapas del ciclo sexual de la rata, dependientes de acciones fisiológicas específicas en cada una de ellas. Esta suposición se ve reforzada por los resultados obtenidos para la PRL estándar (que

en este caso finge como un posible control para su comparación con resultados presentados por otros autores) en donde, si se observaron las 4 isoformas de PRL (1, 2, 3, 3'), reportadas principalmente por Oetting en 1986.

Otro punto importante es que para el análisis inmunoquímico de este trabajo se utilizaron anticuerpos policlonales, que usualmente permiten hacer estudios en los que los resultados deben tomarse de una forma cualitativa y observar si ocurren o no cambios inmunoquímicos en la proteína. Esto se debe a que los anticuerpos no pueden generar pruebas conformacionales de la proteína y, su heterogeneidad, en términos de los sitios antigénicos que reconocen en sus proteínas blanco, es muy alta y poco específica. Por estas razones, la presente investigación proporciona en su mayoría pruebas preliminares de la existencia de cambios inmunoquímicos en la molécula de PRL durante la lactancia. En relación con el análisis cuantitativo y específico de los cambios que se reportan, aún deben realizarse más experimentos, empleando anticuerpos monoclonales, obtenidos quizá para ambas formas de prolactina (fosforilada y no fosforilada) que permitan una identificación más puntual y específica del cambio postraduccional.

Las diferencias encontradas en la detección de la hormona en distintas condiciones (fosforilada o desfosforilada) nos inducen a sugerir que la determinación de PRL por métodos estándar (como el Radioinmunoanálisis, RIA y otros) puede estar subestimada y que sería entonces necesario realizar modificaciones a estos métodos que tomaran en cuenta estas diferencias.

En conclusión, se puede decir que los resultados del presente estudio, apoyan la hipótesis de que los cambios en la detectabilidad de la PRL hipofisaria están relacionados con mecanismos postradireccionales que involucran la polimerización de la hormona mediante la reducción reversible de los puentes disulfuro entre variantes monoméricas (24 KDa) de la PRL y, la fosforilación de esta. Ambos cambios serían

realizados previamente a la liberación de la hormona, durante su transformación y como respuesta a la estimulación específica.

Por último, también puede concluirse, que el estudio de los cambios postraduccionales abre una puerta para entender y encontrar las fuentes bioquímicas que dan origen a la gran variedad de acciones fisiológicas que presentan las hormonas y en este caso, la prolactina.

En resumen, podemos concluir los siguientes puntos:

- 1.- La fosforilación es un cambio postraducciona l que se lleva a cabo durante la transformación de la prolactina antes de que ésta sea liberada y como producto de una estimulación específica.
- 2.- La fosforilación de la PRL ocurre además de los cambios en las variantes de masa de la hormona.
- 3.- La fosforilación de la prolactina genera diferentes variantes de carga de la misma.
- 4.- La fosforilación disminuye la actividad inmunológica de la PRL y por tanto, su inmunodetectabilidad.

## BIBLIOGRAFÍA.

1. Amenomori Y., Chen C. y Meites. Serum Prolactin Levels in Rat During Different Reproductive States. *Endocrinol.* (Marzo 1970)Vol.86: 506-510
2. Arámbaro C., Montiel J.L., Proudman J.A., Berghman L.R. y Scanes C.G. Phosphorylation of Prolactin and Growth Hormone. *J. of Mol. Endo.* (1992)8: 183-191.
3. Blackwelder R. y Shepard B. (1981) *The Diversity of Animal Reproduction.* CRC Press. Inc. Estados Unidos. 141 pp.
4. Brownstein M., Russell J. y Gainer H. Synthesis, Transport and Release of Posterior Pituitary Hormones. *Science.* (Enero 1980)Vol.207, No.25: 373-378.
5. Butcher R., Fugo N. y Collins W. Semicircadian Rhythm in Plasma Levels of Prolactin During Early Gestation in the Rat. *Endocrinol.* (1972)Vol.90, No.4: 1125-1127.
6. Clapp C. y Mena F. Control Neuroendócrino de la Evacuación Lactea en la Rata. *Biol. Estud. Med. Biol. Mex.* (1982)32: 119-155.
7. Cole H.H. y Cupps P.F. (1969) *Reproduction in Domestic Animals.* Academic Press N.Y. Estados Unidos. 657 pp.
8. Darnell J., Lodish H. y Baltimore D. (1990) *Molecular Cell Biology.* Ed. Scientific American Books. E.U. 1105 pp.
9. Eckert R., Randall D. y Agustine G. (1990) *Fisiología animal: mecanismos y adaptaciones.* Ed. Interamericana. España. 320 pp.
10. Falconer I. y Rowe J. Effect of Prolactin on Sodium and Potassium Concentration in Mammary Alveolar Tissue. *Endocrinol.* (1977)Vol.101, No.1: 181-186.
11. Farquhar M.G. Secretion and Crinophagy in prolactin cells. In: *Comparative Endocrinol. of Prolactin.* Editado por H.D. Dellman, J.A. Johnson y D. M. Klachka, Plenum Press, N.Y. (1977) 309 pp.
12. Farquhar M., Reid J. y Daniell L. Intracellular Transport and Packaging of Prolactin: a quantitative electron microscopic autoradiographic study of mammatrophs dissociated from rat pituitaries. *Endocrinol.* (1978)Vol.102, No.1: 269-311.
13. Freeman M., Reichert L. y Neill J. Regulation of the Proestrus Surge of Prolactin Secretion by Gonadotropin and Estrogens in the Rat. *Endocrinol.* (Enero 1972)Vol. 90: 232-238.

14. Freeman M., Smith M., Nazian S. y Neill J. **Ovarian and Hypothalamic Control of the Daily Surges of Prolactin Secretion During Pseudopregnancy in the Rat.** *Endocrinol.* (1974)Vol.94, No.3: 875-882.
15. Giannattasio G., Zanini A. y Meldolesi J. **Molecular Organization of rat Prolactin Granules.** *The J. of Cell Biol.* (1975)Vol.64: 246-251.
16. Gilbert S.F. (1991) *Developmental Biology.* Sinauer Associates, Incorporation Publishers. E.U. 891 pp.
17. Grosvenor C. E., Mena F. y Whitworth N. **The Secretion Rate of Prolactin in the rat During Suckling and Its Metabolic Clearance rate Following Increasing Intervals of Non-suckling.** *Endocrinol.* (1979)104: 372-377.
18. Grosvenor C., Mena F. y Whitworth N. **Evidence That the Dopaminergic Prolactin-Inhibiting Factor Mechanism Regulates Only the Depletion-Transformation Phase and Not the Release of Prolactin Secretion Suckling in the Rat.** *Endocrinol.* (1980)Vol. 106, No.2: 48-484.
19. Grosvenor C. y Mena F. **Evidence that Thyrotropin-Releasing Hormone and Hypothalamic Prolactin-Releasing Factor May Function in the Release of Prolactin in the Lactating rat.** *Endocrinol.* (1980)Vol.107, No.4: 863-868.
20. Grosvenor C. **The Release of Prolactin in the Lactating Rat: effect of chloroquine.** *Neuroendocrinol.* (1984)39: 64-67.
21. Ho T., Leong F., Olaso C. y Walker A. **Secretion of Specific Nonphosphorylated and Phosphorylated Rat Prolactin Isoforms at Different Stages of the Estrous Cycle.** *Neuroendocrinol.* (1993)58: 160-165.
22. Howard A. B. **Prolactin and Osmoregulation.** *Amer. Zool.* (1975)15:937-948.
23. Howard A.B. y Nicoll Ch. **The Comparative Endocrinology of Prolactin.** *Recent. Prog. Horm. Res.* (1968)24: 681-720.
24. Knobil Ernest y Hotchkiss Julane (1988) *The Physiology of Reproduction* editado por Knobil E. y J. Neill Raven Press, Ltd., N. Y., E.U. 2351 pp.
25. Kun S.K. y Cowie A.T. (1961) *Milk: The Mammary Gland and Its Secretion.* Academic Press. Vol. 1. N.Y. 515 pp.
26. Kraun K.A., Wang Y-F., Ho T., Kelly P. y Walker A. **Prolactin Isofor 2 as an Autocrine Growth Factor for GH<sub>3</sub> Cells.** *Endocrinol.* (1992)131: 595-602.

27. Lamberts S.W. y MacLeod R.M. Regulation of Prolactin Secretion at the Level of the Lactotroph. *Physiological Rev.* (Abril 1990) Vol. 70, No.2: 279-318.
28. Larson B. y Smith V. (1974) *Lactation: a comprehensive treatise.* Academic Press. N.Y Vol. 1. 516 pp.
29. Lawson D., Haisenleder D., Gala R. y Moy J. The Occurrence of Pituitary Prolactin Depletion-Transformation in Lactating rats: dependence of strain of rats, homogenization conditions and method of assay. *J. Endocrinol.* (1987) 113: 71-80.
30. Lewis U. Variants of Growth Hormone and Prolactin and their Posttranslational Modifications. *Ann. Rev. Physiol.* (1984) 46: 33-42.
31. Lorensen M., Miska S. y Jacobs L. Molecular Mechanism of Prolactin Release from Pituitary Secretory Granules. In *Prolactin secretion: a multidisciplinary approach.* editado por F. Mena y C. Valverde. Ed. Marcella W. Vogt Estados Unidos. (1984) 141-160.
32. Mains R., Dickerson I., May V., Stoffers D., Perkins S., Ovafik L'H., Husten J. y Eipper B. Cellular and Molecular Aspects of Peptide Hormone Biosynthesis. *Front. Neuroendocrinol.* (1990) Vol. 11, No. 1 52-89.
33. Martínez de la Escalera G. y Weiner R. Dissociation of Dopamine from Its Receptor as a Signal in the Pleiotropic Hypotalamic Regulation of Prolactin Secretion. *Endocrine Rev.* (1992) Vol. 13, No. 2: 241-255.
34. MacLeod R., Schettini G. y Canonico P. On the Intracellular Mechanisms that Regulated Prolactin Secretion. In *Prolactin secretion: a multidisciplinary approach.* editado por F. Mena y C. Valverde. Ed. Marcella W. Vogt Estados Unidos. (1984) 249-262.
35. Mena F., Martínez de la Escalera G., Clapp C., Aguayo D., Forray C. y Grosvenor C. A Solubility Shift Occurs during Depletion-Transformation of Prolactin within the lactating Rat Pituitary. *Endocrinol.* (1982) Vol. 111, No. 4: 1086-1091.
36. Mena F., Martínez de la Escalera G., Clapp C. y Grosvenor C. *In vivo* and *In vitro* secretion of Prolactin by Lactating rat Adenohypophyses as a Function of Intracellular age. *J. Endocrinol.* (1984) 101: 27-32.
37. Mena F., Clapp C., Aguayo D., Lorensen M. y Martínez de la Escalera G. Thiol Regulation of Depletion-Transformation and Release of Prolactin by the Pituitary of the Lactating Rat. *Endocrinol.* (1986) Vol. 118, No. 5: 1795-1802.
38. Mena F., Clapp C., Aguayo D., Morales T., Grosvenor C. y Martínez de la Escalera G. Regulation of Prolactin secretion by Dopamine and Thyrotropin-Releasing Hormone in

Lactatin rat Adenohypophyses: Influence of intracellular age of the hormone. *Endocrinol.* (1989)Vol.125, No.4: 1814-1820.

39. Mena F., Clapp C., Aguayo D. y Martínez de la Escalera G. Differential effects of Thyrotropin-releasing Hormone on *In vitro* release of *In vivo* or *In vitro* Newly Synthesized and Mature Prolactin by Lactating rat adenohypophyses. Further Evidence for a Sequential Pattern of Hormone Release. *Neuroendocrinol.* (1989)49: 207-214.

40. Mena F., Hummel G., Aguayo D., Clapp C., Martínez de la Escalera G. y Morales T. Changes in Molecular Variants during *In Vitro* Transformation and Release of Prolactin by the Pituitary Gland of the lactating rat. *Endocrinol.* (1992)Vol.130, No.6: 3365-3377.

41. Mena F., Montiel J., Aguayo D., Morales T. y Aránburu C. Recent Findings on Prolactin Transformation by the Lactating rat Pituitary. *Endoc. Reg.* (1993)Vol. 27: 105-113.

42. Mitra I. A Novel "Cleaved Prolactin" in the Rat Pituitary: Part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1980)95: 1750.

43. Nagy G. y Frawley S. Suckling Increases the Proportions of Mamotropes Responsive to Various Prolactin-releasing Stimuli. *Endocrinol.* (1990)Vol.127, No.5: 2079-2084.

44. Nalbandov A. (1969) *Fisiología de la Reproducción* Ed. Acribia Zaragoza, Esp. 303 pp.

45. Nicoll Ch., Parsons J.A., Fiorindo R.R. y Nichols JR. Estimation of Prolactin and Growth Hormone Levels by Polyacrylamide Disc Electrophoresis. *J. Endocr.* (1969)45: 183-196.

46. Nicoll Ch. (1974) *Physiological Actions of Prolactin*. In *Handbook of Physiology-Endocrinology* Vol. IV, parte 2. Ed. American Physiological Society. 253-281 pp.

47. Nicoll Ch. *Ontogeny and Evolution of Prolactin's functions*. *Fed. Proc.* (Jun.1980)Vol.39, No.8: 2563-2566.

48. Nicoll Ch., Mayer G.L. y Russell S. *Structural Features of Prolactin's and Growth Hormones that can be related to their Biological Properties*. *Endoc. Rev.* (1986)Vol.7, No.2: 169-203.

49. Oetting W. y Walker A. **Intracellular Processing of Prolactin.** *Endocrinol.* (1985)Vol.117, No.4: 1565-1570.
50. Oetting W. y Walker A. **Differential Isoform Distribution between Stored and Secreted Prolactin.** *Endocrinol.* (1986)Vol.119, No.3: 1377-1381.
51. Oetting W., Polygena T., Jolinda T. y Walker A. **Phosphorylation of Prolactin.** *The J. of Biol. Chem.* (Feb.1986)Vol.261, No.4: 1649-1652.
52. Parlow A. y Shome B. **Rat Prolactin the Entire Linear Aminoacid Sequence.** *Fed. Proc.* (1976)34: 219.
53. Patton H. (1989) **Textbook of physiology.** W. B. Saunders editores. Philadelphia, E.U. 1584 pp.
54. Pelletier G., Antakly T. y Labrie F. **The Prolactin Cell: structure and function.** In *Prolactin secretion: a multidisciplinary approach.* editado por F. Mena y C. Valverde. Ed. Marcella W. Vogt Estados Unidos. (1984): 74-92.
55. Reaves B. y Dannies P. **At the Cutting Edge Is a sorting signal necessary to package proteins into secretory granules?.** *Mol. and Cellular Endocrinol.* (1991)79: C141-C145.
56. Reeves J.J. **Neuroendocrinología de la Reproducción.**
57. Shenai R. y Wallis M. **Biosynthesis and Degradation of Prolactin in the rat Anterior Pituitary Gland.** *Biochem. J.* (1979)182: 735-743.
58. Sinha Y.N. **Prolactin Variants.** *TEM* (1992)Vol.3, No.3: 100-106.
59. Sinha Y.N. **Structural Variations of Prolactin: occurrence and physiological significance.** *Endocrin. Rev.* (1995)Vol.16, No.3: 354-369.
60. Smith R. y Farquhar M. **Lysosome Function in the Regulation of Secretory Process in Cells of the Anterior Pituitary Gland.** *The J. of Cell Biol.* (1966)Vol.31: 319-347.
61. Swearingen K. **Heterogeneous Turnover of Adenohypophysial Prolactin.** *Endocrinol.* (1971)Vol. 89: 1380-1388.

UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
LIBRARY

62. Walker A. y Farquhar M. **Preferential Release of Newly Synthesized Prolactin Granules in the result of Functional Heterogeneity among mammatrophs.** *Endocrinol.* (1980)Vol.107, No.4: 1095-1104.
63. Wallis M., Hawell S.L. y Taylor K.W. (1985) *Biochemistry of the polypeptide hormones.* Ed. John Wiley & Sons. Inglaterra. 488pp.
64. Wallis M. **The Molecular Evolution of Prolactin and related Hormones.** In *Prolactin secretion: a multidisciplinary approach.* editado por F. Mena y C. Valverde. Ed. Marcella W. Vogt Estados Unidos. (1984) 1-16.
65. Wang Y. y Walker A. **Dephosphorylation of Standar Prolactin Produces a More Biologically Active Molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of Nb2 cell proliferation.** *Endocrinol.* (1993)Vol.133, No.5: 2156-2160.