

03068



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

---

---

**UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO DEL COLEGIO  
DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA**

**Mecanismos asociados a la heterogeneidad  
regional y a la transformación y liberación de la  
prolactina (PRL) por la adenohipófisis  
de la rata lactante**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS  
PRESENTA:  
M.V.Z. MONICA VIGUERAS VILLASEÑOR**

**ASESOR: DR. FLAVIO MENA JARA.**

**1997**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

Todo el material contenido en esta tesis 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.

**Esta tesis se realizó en el Centro de Neurobiología bajo la asesoría del Dr. Flavio Mena Jara.**

**Este trabajo fue realizado con apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología registro num. 85756**

## **DEDICATORIAS**

**A los dos grandes amores de mi vida a ti Carlitos, y a quien espero ansiosa y llena de felicidad, mi bebé.**

**A mis padres Martha y Rogelio porque sin su ejemplo, su fuerza, su sabiduria y sobre todo su amor, no seria quien soy. Mil gracias.**

**A mis hermanos: Gabi, Dani, Rosi, Adri y Marco por los recuerdos mas gratos de mi niñez.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al doctor Flavio Mena Jara por la dirección, el apoyo y por ser un ejemplo a seguir.**

**A los doctores Carlos Valverde, Carmen Aceves, Gonzalo Martínez, y Carlos Aramburo por sus valiosos comentarios para la realización de este trabajo.**

**Al doctor Andrés Quintanar y a Gerardo Perera por su valiosa ayuda y colaboración para la realización de este trabajo.**

**A Tere y Lolita por enseñarme, las técnicas en el laboratorio.**

**A mis compañeros de la maestría: Roxana, Claudia, Hilda, Chucho, Abel, Sonia, Aurea, Héctor, Humberto, Edna y Moni por su apoyo y por esos momentos tan gratos que pasamos juntos.  
Y a mis vecinos del laboratorio: Francisco, Salvador, Sulma, Luz, Anita y Jazmín por su alegría y amistad.**

## INDICE

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I Introducción</b>  |           |
| <b>Antecedentes Generales</b>  |           |
| <b>Estructura de la prolactina (PRL).....</b>  | <b>1</b>  |
| <b>Principales efectos de la PRL en los diferentes grupos de vertebrados.....</b>  | <b>2</b>  |
| <b>Secreción de PRL durante el ciclo reproductivo de la rata.....</b>  | <b>5</b>  |
| <b>Mecanismos de secreción de la PRL por la adenohipófisis (AH) de la rata lactante (cambios de detectabilidad de la PRL durante la secreción.....</b> | <b>8</b>  |
| <b>Heterogeneidad molecular de la PRL.....</b>   | <b>13</b> |
| <b>Antecedentes específicos</b>  |           |
| <b>Regionalización de secreción de PRL por la AH de la rata lactante.....</b>  | <b>14</b> |
| <b>Influencia del lóbulo posterior de la hipófisis en la transformación y liberación de la PRL estimulada por la succión.....</b>                      | <b>16</b> |
| <b>II Objetivos.....</b>   | <b>18</b> |
| <b>III Material y métodos.....</b>   | <b>19</b> |
| <b>IV Resultados.....</b>  | <b>28</b> |
| <b>V Discusión.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>VI Conclusiones.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>VII Anexo.....</b>  | <b>43</b> |
| <b>VIII Bibliografía.....</b>  | <b>47</b> |

## RESUMEN

En ratas lactantes las células productoras de la hormona prolactina (PRL), vgr., los lactotropos, están distribuidos de manera no homogénea en la adenohipófisis (AH) y se encuentran ubicados tanto en una zona interna cercana al lóbulo neurointermedio como en una zona externa de la misma que corresponde al resto de la glándula. Se considera que la mayor densidad de lactotropos en la zona interna está constituida por lactotropos clásicos y que existe una mayor abundancia de lactosomatotropos en la zona externa. Por otra parte, se ha considerado que la heterogeneidad funcional de los lactotropos puede ser un reflejo de la susceptibilidad de subpoblaciones celulares de cambiar su funcionalidad de acuerdo a los requerimientos fisiológicos de secreción de la PRL. Así, como ha sido mostrado recientemente en ratas lactantes, lactotropos de diferentes regiones de la AH cambian rápidamente su funcionamiento y su responsividad a secretagogos después de haberse aplicado un período de succión, observándose que células en cultivo primario provenientes de la zona interna de la AH de ratas succionadas son más sensibles a la tirolibarina (TRH) y no responden a la dopamina (DA). El que estos cambios parecen suceder de manera preferencial en los lactotropos de la región central o zona interna de la AH, ha sugerido que a partir de dichas células se produce la mayor liberación de PRL durante la succión. En apoyo a estas hipótesis, diversos experimentos sugieren que el lóbulo neurointermedio de la hipófisis puede participar en este fenómeno de regionalización, mediante la secreción de un factor liberador de la PRL durante la succión. Es importante mencionar que estas hipótesis surgieron a partir de estudios previos donde se reportó, por una parte, que la extirpación quirúrgica de los lóbulos posterior y neurointermedio bloquea la liberación de PRL inducida por la succión, y que a partir de esto se sugirió la existencia de secretagogos de la PRL en ese dicho lóbulo neurointermedio.

De acuerdo a estos antecedentes, y considerando que la transformación de la PRL es la fase limitante para la liberación de la hormona, en los experimentos que se han diseñado se plantearon tres objetivos fundamentales: 1) analizar si existen diferencias regionales en la adenohipófisis de ratas succionadas y no succionadas, tanto en la transformación y liberación de la PRL inducida por la succión como 2) en la secreción basal *in vivo* e *in vitro* de la hormona; y 3), en la responsividad de dichas regiones a la inhibición por DA y a la estimulación por TRH. Los resultados obtenidos apoyan en parte las observaciones previas sobre la responsividad diferencial regional a los secretagogos. Sin embargo se encontró que la regionalización de la secreción basal de la PRL depende en mayor grado del período de no succión, y que éste, a su vez, depende de la integridad anatómica del lóbulo posterior o neurointermedio.

Asimismo con relación al efecto de la succión, los resultados sugieren que la remoción del lóbulo posterior y neurointermedio de la hipófisis resulta en una depresión transitoria de la transformación y liberación de la PRL inducida por la succión, la cual es seguida por la restauración de la transformación y recuperación parcial de la liberación de la hormona. Esto sugiere que el lóbulo posterior participa, aunque no de manera esencial en la regulación de la secreción de la PRL por la AH de la rata lactante.

## SUMMARY

Within the anterior pituitary of the lactating rat, the cells that synthesize prolactin (PRL), are called mammatropes. Although these cells are distributed throughout the gland, they are more densely grouped in the peripheral rim (outer zone) and in a larger region located near the neurointermediate lobe (inner zone). It is considered that the inner zone is mainly composed by classic mammatropes, while the mammosomatotropes are the main population of the outer zone. Also, it has been considered that the functional heterogeneity of the mammatropes could result from the susceptibility of subcellular populations to change its functionality in response to the physiological demand of PRL secretion. Recently, it has been shown that the mammatropes of the different areas of the A.P. can rapidly change their functionality in response to secretagogues after suckling. As an example, the use of primary cultures of mammatropes of the inner zone from suckled rats using the reverse hemolytic plaque assay for PRL determinations showed that these cells are more sensible to TRH and are not responsive to DA. Apparently, these changes occurred preferentially in cells from the central zone of the adenohypophysis, which is suggestive that a higher level of secretion from the mammatropes of this zone occurs in response to the suckling stimulus. Consistent with this hypothesis, previous studies showed that the neurointermediate lobe produces a PRL releasing factor, which suggest its involvement in the phenomenon of regionalization. These hypothesis were on the influence of PRL releasing factors from the neurohypophysis, originated in previous studies in which removal of the posterior and neurointermediate lobes abolished the suckling-induced release of PRL.

On the other hand, when considering that PRL transformation is essential for PRL release in the lactating rat, in the present study we sought to determine whether a relationship may exist between PRL transformation and the above mentioned phenomenon of PRL regionalization. To analyze this, the present study was made with three objectives: 1) to analyze if regional differences exist in APs of suckled and non-suckled rats both with respect to PRL transformation and in the suckling-induced release of PRL; 2) To determine whether *in vitro* regional differences in basal secretion of PRL were apparent between the central and peripheral region of the AP; 3) To determine the responsiveness of these areas to DA inhibition and to TRH stimulation. The results obtained support the hypothesis of a different regional responsiveness to both secretagogues. However, the basal secretion of PRL was found to depend upon the length of non-suckling period, and this in turn was dependent of the anatomical integrity of the posterior and neurointermediate lobes.

Also, with respect to the effect of suckling, the results suggest that the removal of the posterior lobe of the pituitary gland results in a transient depression of suckling regulated PRL transformation and release, which is followed by the complete restoration of PRL transformation and partial recovery of hormone release. This suggest that the posterior lobe of the pituitary, albeit not in essential manner, participates in the regulation of PRL secretion by the lactating rat AP.

# I INTRODUCCION

## ANTECEDENTES GENERALES

### I ESTRUCTURA DE LA PROLACTINA (PRL)

La prolactina (PRL) es una hormona protéica que está formada por una cadena polipéptica de aproximadamente 200 aminoácidos según la especie y un peso molecular de 23000 daltones. La primera PRL aislada fué la ovina (Li 1974). La forma nativa de la PRL contiene 6 residuos de cisteina, los que se unen entre si formando 3 enlaces disulfuro (-s-s-) y tres asas de aminoácidos: dos asas menores en los extremos amino y carboxilo y un asa mayor intermedia. En la PRL de rata los enlaces se encuentran en los residuos 4 y 9 formando el asa amino terminal, en los aminoácidos 56 y 172 en el enlace central y en los aminoácidos 189 y 197 en el asa carboxilo terminal. De esta manera las dos asas pequeñas amino y carboxilo terminal estan formadas de 4 y 7 residuos de aminoácidos respectivamente y el asa mayor de 115 aminoácidos (Parlow y Shome 1976).

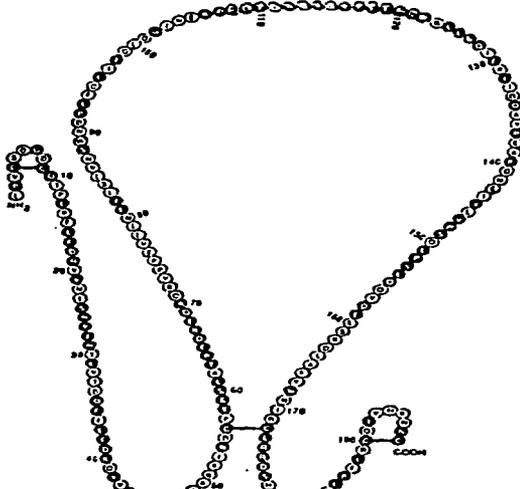


Fig 1 Estructura de la prolactina de rata  
(Fig. Tomada de Neill *et al.* 1994)

## **PRINCIPALES EFECTOS DE LA PRL EN LOS DIFERENTES GRUPOS DE VERTEBRADOS**

El descubrimiento de la PRL se realizó en 1928, cuando se demostró que la inyección de un extracto acuoso de adenohipófisis era capaz de estimular la síntesis de leche por la glándula mamaria de conejas pseudoembarazadas. Posteriormente, esta respuesta se observó en perros, cerdos y vacas. El compuesto responsable de éstos efectos fue aislado en 1933 por Riddle, Bates y Dyskhorn, quienes le asignaron el nombre de prolactina (Nicoll 1974, Nicoll *et al* 1980, Power y Hatala 1990).

En elasmobranchios, teleósteos, reptiles y aves las células secretoras de la prolactina están localizadas en la región anterior de la pars distalis. En los mamíferos, la hormona es producida por células de la adenohipófisis que son reconocidas por sus características tintoriales e inmunocitoquímicas y son denominadas lactotropos (Nicoll 1974, Power y Hatala 1990).

Desde el punto de vista filogenético, la PRL se localiza inicialmente en los ciclostomos, en los cuales desempeña un papel importante en la regulación metabólica de los electrolitos. En los peces teleósteos, la hormona posee acciones principalmente de tipo osmorregulador, ejerciendo su efecto principalmente sobre el riñón y las branquias. En los peces de agua dulce, la prolactina es fundamental para la adaptación de estas especies a su medio ambiente promoviendo específicamente la retención de sodio, así como reduciendo la permeabilidad al agua de las membranas expuestas a ella, tales como las branquias, la piel, la vejiga, el intestino y los riñones. En estos peces la hormona regula también la secreción del moco bucal, branquial y cutáneo. Asimismo el número y el tamaño de las glándulas mucosas del tegumento en varias especies de éste grupo son aumentadas por la PRL. El revestimiento que esta secreción mucosa proporciona puede funcionar reduciendo la permeabilidad de la piel del pez, contribuyendo a la regulación del flujo de sodio junto con el agua en las branquias y al mismo tiempo proveer alimento para las crías (Nicoll 1974).

En el grupo de los anfibios la PRL influye sobre el crecimiento somático y el desarrollo funcional, además de ejercer acciones osmorreguladoras en algunas especies de salamandras. Estudios realizados en varias especies de anfibios han mostrado que la prolactina ejerce acciones antimetamórficas en larvas de anuros y urodelos (Nicoll 1974).

En los reptiles se conocen pocas acciones de la PRL. Entre ellas se sabe que tiene acciones antigonadotrópicas, además de estimular el crecimiento

somático, de favorecer la regeneración de la cola de las lagartijas y los lagartos, así como de promover la muda de piel en algunas especies de culebras (Nicoll 1974, Nicoll 1980).

En las aves se conocen numerosas acciones de la prolactina que se hallan relacionadas principalmente con la reproducción. Una de las acciones fisiológicas característica y específica de esta hormona es la de estimular el crecimiento epitelial del buche de paloma. Este efecto de la PRL es ejercido desde pocos días antes de que el período de incubación de los huevos termine y durante una o dos semanas después de que la cría sale del cascarón. Durante este período las células mucosas epiteliales se hipertrofian y acumulan gránulos de grasa. Eventualmente se descaman, dando lugar a la llamada leche del buche, la cual es una sustancia blanca que el ave regurgita depositándola en la garganta de las crías para alimentarlas. Este fenómeno ha sido observado tanto en hembras como en machos de diversas variedades de palomas (Nicoll 1974).

Asociada a las acciones anteriores la PRL interviene de manera decisiva en el desarrollo de los patrones de conducta maternal en las aves. En éstos animales, antes y durante la postura de los huevos, se observa una gran vascularización con pérdida de las plumas de la piel de la región posterior del abdomen, la cual va a ser colocada sobre los huevos para empollarlos. A esta zona de la piel se le llama placa de incubación y su desarrollo es promovido por la acción conjunta de la prolactina y los esteroides gonadales (Nicoll 1974).

En este mismo grupo de vertebrados la PRL estimula el crecimiento de las plumas y se sabe que interviene en el funcionamiento de las glándulas nasales orbitales, gracias a las cuales ciertas variedades de aves son capaces de tomar agua marina y eliminar el exceso de sal mediante la secreción de un moco hiperosmótico (Flückiger *et al.* 1982, Nicoll 1974).

En los mamíferos, la PRL tiene a su cargo de manera fundamental una función característica y exclusiva de estas especies, que es la de la lactancia. Durante esta etapa del ciclo reproductor de los mamíferos, la PRL participa en el desarrollo del sistema ductal mamario que se presenta cuando la glándula mamaria pasa del estado postpuberal al estado lactacional. En la rata, el crecimiento lóbulo alveolar mamario es promovido por la PRL y la progesterona, que actúan de manera sinérgica con los estrógenos, corticosteroides, insulina, hormona del crecimiento y hormonas tiroideas. Asimismo, la PRL participa en la lactogénesis, la cual consiste en el inicio de la formación de la leche y su secreción. Además, se sabe que para algunas especies de mamíferos la PRL es indispensable para el mantenimiento de la secreción láctea, el cual es denominado

galactopoiesis. Por otra parte, durante el ciclo estral de algunas especies como la rata, el ratón, la oveja, etc., la hormona estimula la formación y mantenimiento del cuerpo lúteo, mientras que al mismo tiempo ejerce una acción antagonotrópica (Nicoll 1974).

En los mamíferos, al igual que en las aves, esta hormona está involucrada en la conducta maternal aunque en algunas especies, su acción es indirecta. En algunas especies las concentraciones de la hormona en el plasma aumentan justo antes del parto (Neill 1974). Asimismo, se ha observado que la inducción experimental de la conducta maternal en ratas por exposición a crías recién nacidas, va asociado a elevaciones en la secreción de la hormona. Esto sugiere que la hormona pudiera tener un papel causal en la determinación de la conducta maternal. Sin embargo, el desarrollo de la conducta maternal no está dado primariamente por la acción de esta hormona, ya que se ha demostrado que su acción se encuentra coordinada con la acción de los esteroides ováricos, los cuales poseen una acción primaria en la determinación de dicha conducta (Hutchinson 1978).

Además de las acciones mencionadas, se ha sugerido que la PRL tiene acciones osmorreguladoras sobre el epitelio mamario, ya que se ha observado en el ratón lactante un aumento en la absorción de sodio en células de dicho epitelio como respuesta a la aplicación de la hormona. Por otro lado se ha observado también que en tejido alveolar mamario de la coneja, las concentraciones intra y extracelulares del ión sodio se ven afectadas al incubar el tejido en presencia de prolactina y que dicho efecto es inhibido por la ouabaina un bloqueador del transporte activo de sodio (Falconer *et al.* 1977).

## SECRECION DE PRL DURANTE EL CICLO REPRODUCTOR DE LA RATA

**Ciclo Estral:** Las concentraciones de PRL circulante varían durante los distintos estados reproductivos de la rata. Durante el ciclo estral de esta especie, los niveles de PRL se mantienen elevados en la tarde y la noche del proestro (Kwa *et al.* 1967, Neill *et al.* 1971). Este aumento ocurre de manera espontánea, con descarga rítmica de la hormona, y va seguido por altos niveles circulantes de otras hormonas como el de la hormona luteinizante (LH), la hormona foliculo estimulante (FSH) y la progesterona (Smith *et al.* 1975). La secreción incrementada de estas hormonas es precedida y estimulada por niveles altos de estrógenos, por lo cual se supone que el esteroide estimula la liberación de PRL (Neill *et al.* 1974). En otros estudios se ha propuesto que la administración de estrógenos trae consigo niveles altos de PRL y de hormona luteinizante (LH) (Reece *et al.* 1937). Por otro lado se ha visto que al administrar un antisuero de estradiol se bloquea el pico de secreción de PRL durante el proestro (Neill 1974).

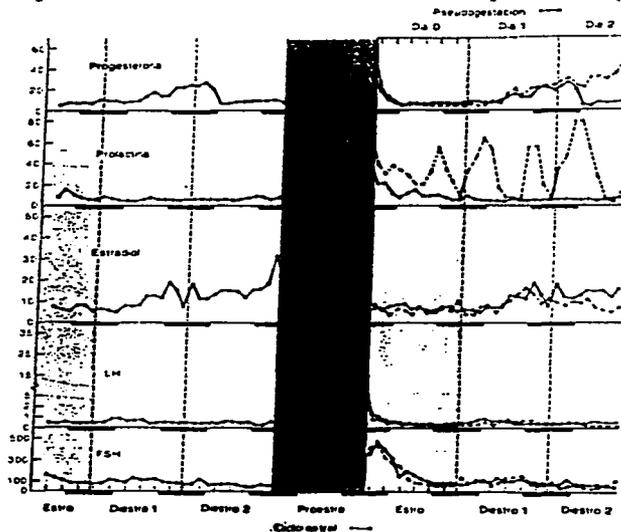


Fig 2 Niveles hormonales en sangre provenientes de ratas durante los distintos días del ciclo estral (Fig. Tomada de Eckert R *et al.* 1995)

**Embarazo:** La liberación de la PRL durante la gestación en la rata es mayor durante los primeros tres días de gestación que durante el resto de la misma (Amenomori *et al.* 1970).

Durante los primeros nueve días del embarazo en la rata, el patrón de secreción de PRL es esencialmente idéntico al que ocurre durante el pseudoembarazo hasta el día once de la gestación (Butcher *et al.* 1972). Los niveles séricos de la hormona son bajos, y no se elevan de manera significativa sino hasta dos días antes del parto. (Neill 1974 y Neill 1980). Por otra parte, como causa de dicho incremento de la hormona en el parto, se considera que el incremento de los esteroides ováricos en los últimos días del embarazo estimulan la secreción de la hormona hipofisiaria.

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

Después de aplicar la estimulación cervical en la rata, la secreción aumentada de PRL se manifiesta en dos elevaciones diarias de la misma en la circulación, una diurna y otra nocturna, que continúan durante todo el pseudoembarazo. Este tipo de secreción de la hormona es similar al que ocurre durante los primeros cuatro días de gestación (Butcher *et al.* 1972) El pico de secreción diurno se inicia en la tarde y alcanza sus valores máximos justo antes del comienzo del período de obscuridad, mientras que el pico nocturno se inicia después de la media noche y alcanza sus valores máximos al final del período de obscuridad (Freeman *et al.* 1974, Neill 1974, Neill 1980). Este patrón cíclico de secreción de la hormona sugiere que la información que se deriva de la estimulación cervical está, o queda almacenada, en el cerebro, resultando en la liberación de PRL durante cada noche (Rotchild 1965).

Se sabe que el pico diurno de secreción de PRL desaparece pero que el pico nocturno continúa hasta el último día del pseudoembarazo para posteriormente desaparecer antes de reanudarse el patrón normal de secreción de la hormona, propio de un nuevo ciclo estral (Freeman *et al.* 1972, Freeman *et al.* 1974, Neill 1980).

**Lactancia:** Es un fenómeno neuroendócrino complejo que constituye la fase final del ciclo reproductor de los mamíferos. En la rata, la secreción de PRL durante la lactancia depende del estímulo de la succión por parte de las crías recién nacidas, y por la estimulación exteroceptiva que se desarrolla a mediados de la lactancia y cuya importancia se incrementa hacia el final de la misma (Grosvenor *et al.* 1970). Como resultado de tal regulación, la hormona no es secretada de manera tónica sino fásica en respuesta a la estimulación (Grosvenor, C.E y F.Mena 1982). Así, en ausencia de dicha estimulación, los niveles circulantes de la hormona son bajos. Se ha visto que cuando las crías son separadas de sus madres durante varias horas el reinicio de dicha succión es seguido de una liberación rápida de PRL a la circulación (Neill 1980).

El efecto de la succión sobre la secreción de PRL en la rata consiste en una depleción<sup>1</sup> vgr., disminución, inicial rápida (1-2 minutos) y extensa (15-60 ug.) de la hormona contenida en la adenohipófisis (AH) después de ser depletada, la PRL AH se reacumula lentamente, es decir, se repleta, hasta alcanzar los niveles que tenía antes de la succión. El grado de depleción está relacionado directamente tanto con el número de animales en la camada, como con la duración del intervalo anterior de no succión (Mena 1978). Las concentraciones máximas de PRL (500-600 ng/ml) en la circulación se alcanzan entre los 10-20 minutos de haberse iniciado la succión.

Se considera que la lactancia llega a su fin debido en parte a que las crías succionan a la madre con menor frecuencia a medida que van creciendo. De esta manera la intensidad de la succión disminuye considerablemente y por ende la secreción de la hormona (Mena 1978, Neill 1974).

<sup>1</sup> Los términos "depleción" y "repleción" se utilizan para referirse a los términos depletion y repletion, que en el idioma inglés denotan agotamiento, disminución rápida, vaciamiento, etc. (depletion); y llenado, acumulación, repleción, etc. (repletion). Dado que el término "depletion" no existe en el idioma español, aunque sí el de repleción, se utilizan ambos en la presente tesis con el propósito de conservar su conotación y evitar posibles confusiones.

## **MECANISMOS DE SECRECIÓN DE LA PROLACTINA**

El proceso de secreción de la PRL en la rata lactante en respuesta a la succión, a la estimulación eléctrica del nervio mamario, a la estimulación exteroceptiva, o como resultado de la incubación *in vitro* de la adenohipófisis de ratas lactantes, es un evento multifásico, en el que la liberación de la hormona a la circulación es solamente una de las fases.

La secreción de esta hormona resulta de las interacciones que se establecen entre las influencias de control hipotálmico y los mecanismos reguladores intracelulares de la adenohipófisis. La PRL se encuentra almacenada en la adenohipófisis de la rata lactante en formas preliberables; posteriormente, la activación secretora inducida por el estímulo de la succión determina que la hormona sea transformada en formas liberables, y esto sucede antes de ser expulsada por exócitosis (Grosvenor y Mena 1982 y Mena *et al.* 1982). Este modelo de transformación y liberación de la hormona es la base de una hipótesis de trabajo sobre los mecanismos básicos que regulan la secreción de PRL. Además, el modelo propone que tanto el procesamiento como la transformación de la hormona ocurren de manera secuencial, después de la biosíntesis de la misma, y que diversos factores hipotálamicos pueden afectar diferencialmente la transformación y la liberación, dependiendo de la edad postsíntesis de la hormona (Mena 1978).

Así, mientras que la inhibición dopaminérgica de la secreción de PRL resulta de inhibir tanto la transformación como la liberación de la misma (Grosvenor *et al.* 1980), los secretagogos como la TRH estimulan sólo la liberación de PRL (Grosvenor y Mena 1980). Por otra parte, aunque la lista de compuestos que presentan actividad liberadora de la PRL es muy extensa (Leong *et al.* 1983), se ha observado que la liberación de PRL por estímulos como la succión y la estimulación del cuello uterino, se asocian con la disminución de DA en la sangre portal, así como con un incremento en la liberación de TRH (DEGreef *et al.* 1981, Grosvenor *et al.* 1984, Martínez de la Escalera *et al.* 1988), potenciando con ello una mayor liberación de la PRL. Cuando experimentalmente se producen estos cambios de concentración de DA y TRH, la liberación de PRL es similar a la observada en condiciones naturales (Grosvenor y Mena 1980). En estudios recientes hechos con periferfusión de células aisladas, se ha observado que la suspensión transitoria (10 min) del tono dopaminérgico resulta en un incremento del efecto del TRH para inducir la liberación de la PRL (Martínez de la Escalera *et al.* 1988). Por otra parte, se sabe que la TRH estimula la

liberación de PRL al activar la movilización de calcio intracelular e incrementar el metabolismo de los fosfolípidos de la membrana, lo cual trae consigo un incremento en la concentración de trifosfato de inositol (IP3) y del diacilglicerol, responsables de la activación de las cinasas dependientes del calcio y de la protein cinasa C (Giannattasio, *et al.* 1984, Gourdjji *et al.* 1979).

Por otro lado, en estudios anteriores se demostró que la disponibilidad de la PRL para ser transformada a formas liberables y para ser liberada dependía del grado de maduración intracelular de la misma a partir de su síntesis (Mena *et al.* 1989). La PRL madura *vgr.*, aquella que había sido sintetizada 4-8 horas antes, era secretada de manera preferencial durante la incubación *in vitro* de adenohipófisis de ratas lactantes, comparada con la hormona más joven sintetizada 1 hora antes y sobre la mas vieja sintetizada 16-24 horas antes. Supuestamente, la hormona mas vieja era digerida por enzimas lisosomales intracelulares. Estos resultados, y otros de estudios previos, sugieren que el procesamiento, la transformación, la liberación y la degradación de la PRL ocurren de manera secuencial mas que preferencial, después de la biosíntesis de la hormona en forma granular (Farquhart *et al.* 1977).

En estudios anteriores, se ha propuesto que la PRL recién sintetizada es secretada preferencialmente y que esto se debe a la heterogeneidad funcional de los lactotrofos de la hipófisis (Walker *et al.* 1980). Sin embargo, los metodos empleados en estos estudios son diferentes a los utilizados en los estudios previos, para definir con precisión a la PRL recién sintetizada y a la PRL madura, además del hecho de que el papel secretorio de las PRLs de diferente edad cambia en función del tiempo de incubación (Mena *et al.* 1992). Es posible pues que las diferencias metodológicas hayan contribuido a las diferentes interpretaciones sobre la secreción de PRLs de diferente edad postsíntesis. Por otra parte la heterogeneidad funcional de los lactotrofos puede ser un reflejo de la susceptibilidad de subpoblaciones celulares de cambiar su funcionalidad de acuerdo a los requerimientos fisiológicos de secreción de la hormona.

## **MECANISMOS QUE REGULAN LA SECRECIÓN DE LA PRL**

### **A) Influencias de control hipotalámico:**

**Estimuladores: TRH**

**VIP**

**Serotonina**

**Oxitocina**

**Inhibidores: DA**

**GABA**

**Somatostatina**

**Neurotensina**

### **B) Mecanismos reguladores intracelulares de la adenohipófisis:**

**Cascada de segundos mensajeros**

**Grado de madurez intragranular relacionado con la secretabilidad**

**Modificaciones postraduccionales**

**Transformación de la hormona almacenada en granulos de formas preliberables a formas liberables**

### **C) Factores liberadores localizados en el lóbulo posterior y/o neurointermedio que influyen sobre la liberación de la PRL**

**$\alpha$ MSH**

**Péptido de peso molecular menor a 5000 daltones, capaz de estimular la liberación de PRL por células de la AH.**

## **Cambios de detectabilidad de la PRL durante la secreción**

Como ya se mencionó, la liberación de la PRL en la rata lactante inducida por la succión, constituye solamente una de las fases del proceso de secreción de la misma. Este concepto surge de los resultados obtenidos por el análisis a través de técnicas de bioensayo, de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE) y densitometría y de radioinmunoanálisis (RIA), del contenido y la detectabilidad de la hormona, y de su relación con la hormona secretada. Así la estimulación de la secreción durante un período breve de succión (1 a 2 min), provoca una disminución brusca, rápida y extensa (15-60 ug/mg) del contenido de la hormona en la glándula. Este resultado no coincide cuantitativamente con la proporción de la hormona liberada (2-3ug/mg de AH) a la circulación durante el mismo período. Este cambio en la hipófisis, es seguido de la reaccumulación gradual de la hormona dentro de la glándula, la que ocurre independientemente de que la activación que fue aplicada inicialmente sea o no sostenida (Grosvenor *et al.* 1979, Mena *et al.* 1982). Esto hace pensar que la disminución rápida, o "depleción" del contenido glandular de PRL no corresponde a la expulsión de la hormona de la glándula, sino a una pérdida reversible en la detectabilidad de la misma, la cual se recupera durante las fases de reaccumulación o "repleción", y de liberación. Se considera que dicha fase de transformación corresponde a la fase de indetectabilidad de la hormona y que la fase de liberación ocurre a partir de la hormona transformada. Dado que dicha transformación es reversible, permite explicar la recuperación de la detectabilidad tanto en la hormona repletada como en la liberada.

Asimismo, la transformación de la PRL por la hipófisis de la rata lactante es un fenómeno postraducciona de la hormona madura en forma granular, y desde el punto de vista fisiológico, tiene por objeto regular la disponibilidad de la hormona en forma liberable, y permitir las modificaciones estructurales de la misma que dan lugar a formas con diversa actividad biológica (Veáse mas adelante).

Por otra parte, la PRL transformada es resistente a la extracción en amortiguador Tris-HCL a pH neutro, pero puede ser extraída en amortiguador de bicarbonato a pH 10 (Mena *et al.* 1982) lo cual sugiere que la transformación de la PRL está asociada con un aumento en la estabilidad de la hormona.

Estudios anteriores muestran que tanto la depleción como la repleción y la liberación de la PRL, son procesos interdependientes. La hormona repletada y la hormona liberada, provienen de la previamnete depletada y consecuentemente indetectable. Si se aplica el estímulo de la succión durante un tiempo prolongado y se determina la cantidad de hormona liberada, se observa que la cantidad total liberada después de la succión corresponde a la cantidad de PRL depletada durante los primeros minutos de succión ( Grosvenor *et al.* 1979).

## **HETEROGENEIDAD MOLECULAR**

La PRL es una de las hormonas más versátiles de la hipófisis en término de acciones biológicas. Habiendo sido originalmente identificada en extractos de hipófisis, en años recientes se ha identificado en muchos otros órganos tales como la placenta, el cerebro y en el intestino. Sus funciones son muy diversas, aunque las acciones y efectos mejor conocidos son los que ejerce en la glándula mamaria y en el sistema reproductor. En general, se han descrito más de 100 efectos diferentes en toda la escala de los vertebrados, entre los cuales se incluyen efectos generales sobre crecimiento, desarrollo, osmorregulación y conducta (De Vlaming 1979). Por otra parte, como ya se mencionó de manera similar a lo que acontece con la gran mayoría de las hormonas peptídicas la PRL es empaquetada y almacenada en granulos de secreción. Posteriormente, como ha sido reportado, mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, intervienen en el proceso de transformación y liberación de la hormona (Mena *et al.* 1986).

¿Como es que la PRL puede participar en la regulación de una gran cantidad de mecanismos fisiológicos? Su heterogeneidad en la hipófisis de la rata fué reportada por primera vez en 1978 y a partir de entonces se han reportado múltiples formas de la hormona (Sinha 1986). Dichas formas variantes son producidas, en general, por modificaciones post-traduccionales, entre las que se citan: la glucosilación en las prolactinas de ovino y humano asociada a la disminución en la actividad biológica de las mismas (Lewis y Sinha *et al.* 1984); la desaminación de las prolactinas de ovino y de ratón (Haro, Talamantes *et al.* 1983); la agregación y la oligomerización de las prolactinas de rata, ratón y humano (Kiefer *et al.* 1978); la proteólisis de las prolactinas de rata y ratón, relacionada con la ruptura del asa mayor, formada por uno de los puentes disulfuro de la molécula; la reducción de un puente disulfuro, dando lugar a formas submonoméricas con actividad biológica e inmunológica diferente a la de la forma nativa (Mittra 1980); la generación de formas reducidas de PRL ovina carente de actividad biológica e inmunológica y, finalmente, la fosforilación de las PRLs de rata, pollo, pavo, ovino y bovino (Aramburo *et al.* 1992, Brooks *et al.* 1990, Sinha 1992 y 1986, Gul *et al.* 1989 y Oetting *et al.* 1986) Este grado de polimorfismo de la PRL sugiere que las diferentes formas de la molécula tienen diferente potencia biológica, hipótesis que propone que la heterogeneidad molecular de la PRL es uno de los mecanismos por los cuales se genera esa gran diversidad de acciones de la misma (Sinha 1992 y 1986).

## **ANTECEDENTES ESPECIFICOS REGIONALIZACION DE SECRECION DE LA PRL POR LA ADENOHIPOFISIS (AH) DE LA RATA LACTANTE**

Estudios ya referidos han propuesto que la liberación de la PRL inducida por la succión es un proceso multifásico que culmina con la exportación de la hormona a la circulación ( Grosvenor y Mena 1980 ) En estudios anteriores se ha observado que dosis altas de TRH inyectado a ratas que han sido separadas de sus crías por algunas horas causa una pequeña elevación en la concentración de PRL en el plasma, pero que esta respuesta se amplifica significativamente cuando las ratas son sometidas a un período previo de succión (Grosvenor y Mena 1980). Resultados similares se han obtenido cuando se usa el peptido vasointestinal (VIP) o morfina en lugar del TRH. Esto sugiere que la succión prepara a las células de la adenohipófisis (AH) a responder a agentes que estimulan la liberación de la PRL.

En la hipófisis se distinguen dos partes, la neurohipófisis y la adenohipófisis (AH). Esta última está compuesta por la pars distalis, la pars tuberalis y la pars intermedia, el conjunto de la pars distalis y la pars tuberalis constituye el lóbulo anterior, la neurohipófisis está compuesta por la pars nervosa, la pars infundibularis y la eminencia media. El conjunto de la pars nervosa y la pars infundibularis forma el lóbulo posterior. (Tresguerres *et al.* 1991) La pars distalis de la rata contiene más de dos millones de células de las cuales el 30-50% son lactotrofos (Frawley *et al.* 1985a, Liloyd *et al.* 1987, Porter y Frawley 1992). Asimismo, en ratas lactantes, los lactotrofos están distribuidos de manera no homogénea en la pars distalis, encontrándose ubicados en una zona interna cercana al lóbulo neurointermedio y en una zona externa que corresponde al resto de la glándula (Papka *et al.* 1986). Se considera que la mayor densidad de lactotrofos en la zona interna está constituida por lactotrofos clásicos y que existe una mayor abundancia de lactosomatotrofos en la zona externa (Boockfor y Frawley 1987).

Por otro lado, por estudios *in vitro* mediante el inmunoensayo de placa se han clasificado los lactotrofos de ratas adultas en lactotrofos que liberan pequeñas cantidades de PRL por unidad de tiempo (SP) y lactotrofos de placas grandes (LP) con mayor actividad secretora (Luque *et al.* 1986, Cota *et al.* 1990).

Por otra parte, se ha considerado también que la heterogeneidad funcional de los lactotrofos puede ser un reflejo de la susceptibilidad de subpoblaciones celulares de cambiar su funcionalidad de acuerdo los

requerimientos fisiológicos de secreción de PRL. Así, como ha sido mostrado recientemente, lactotropos de diferentes regiones de la adenohipófisis cambian rápidamente su funcionamiento y su responsividad a secretagogos después de haberse aplicado un período de succión (Nagy *et al.* 1991, Nagy y Frawley 1990). Estos resultados sugieren que en paralelo con los cambios moleculares que le suceden a la hormona durante su transformación, pueden suceder cambios funcionales en los lactotropos acordes a las situaciones fisiológicas. En apoyo de esto, está el hecho de que células de PRL en cultivo primario responden a la supresión de la inhibición por DA aumentando su secreción pulsátil y sincronizada y aumentando su responsividad al TRH (Martínez de la Escalera *et al.* 1978). Estas posibilidades han sido apoyadas recientemente habiéndose encontrado que después de la succión ocurren cambios drásticos en la proporción de células secretoras de PRL y en la responsividad de las mismas a la DA y a diferentes secretagogos; y observándose que células en cultivo primario provenientes de ratas succionadas son más sensibles al TRH y menos responsivas a la DA. (Boockford y Frawley 1987, Nagy y Frawley 1990). Por otra parte, el que estos cambios parecen suceder de manera preferencial en lactotropos de la región central de la AH ha llevado a los autores a sugerir que dichas células tienen mayor responsividad en los cambios agudos de secreción de la PRL inducida por la succión (Nagy *et al.* 1991).

En apoyo a estas hipótesis, experimentos más recientes del grupo de Frawley sugieren que el lóbulo neurointermedio de la hipófisis puede participar en el fenómeno de la regionalización, ya que la región central de la AH es la más cercana al lóbulo NI. Estos autores sugieren que los vasos portales cortos que unen vascularmente al lóbulo neurointermedio con el anterior de la hipófisis pueden servir como conductos para la transmisión de una o más señales para la liberación de la PRL inducida por la succión (Frawley 1994), y se ha sugerido que la AH de la rata lactante se comporta como dos glándulas funcionalmente distintas, la región central de la AH influenciada por el lóbulo NI, y las regiones laterales que dependen de señales liberadas por el sistema porta hipotálamo-hipofisiario (György *et al.* 1991). Finalmente, es importante mencionar que todas estas hipótesis surgieron a partir de estudios previos donde se reportó, por una parte, que la remoción quirúrgica del lóbulo neurointermedio resulta en la no liberación de la PRL inducida por la succión (Murai y Ben Jonathan 1987) y, por la otra, en la existencia de secretagogos de la PRL en el lóbulo neurointermedio (Laudon *et al.* 1990).

## **INFLUENCIA DEL LOBULO POSTERIOR DE LA HIPOFISIS EN LA TRANSFORMACION Y LIBERACION DE LA PRL ESTIMULADA POR LA SUCCION.**

La neurohipófisis está compuesta por la pars nervosa, la pars infundibular y la eminencia media. El conjunto de la pars nervosa y la pars infundibular forman el lóbulo posterior (Tresguerres *et al.* 1991). Con técnicas inmunocitoquímicas se ha visto que el lóbulo posterior de la hipófisis está formado por células de la glia (Tweedle y Hatton 1980). Desde el punto de vista embriológico, la AH se origina de la invaginación de la bolsa de Rathke del ectodermo bucal y la neurohipófisis se origina de la evaginación del piso del tercer ventrículo del ectodermo neural (Tresguerres *et al.* 1991).

Por lo que respecta a la secreción de prolactina por la AH, cabe mencionar que ésta comprende dos fases, la transformación de la hormona de formas preliberables a formas liberables, y la liberación propiamente dicha de la misma. Este modelo propone que ambas fases están reguladas por el estímulo de la succión, que inhibe el tono dopaminérgico inhibitorio y por otro lado estimula la liberación de secretagogos de PRL tipo TRH. (Ben Jonathann 1985, Grosvenor y Mena 1980).

Estudios previos sugieren que secretagogos de PRL localizados en el lóbulo posterior o neurointermedio de la hipófisis pueden estimular la liberación de la hormona, a través de conexiones vasculares (vasos portales cortos). Se ha descrito mayor responsividad a esos secretagogos en los lactotropos localizados en la región central de la AH, proponiéndose que la  $\alpha$  MSH es la responsable de dicho efecto. (Moshe Laudon *et al.* 1990, Nagy y Frawley 1990)

Asimismo se ha sugerido que el lóbulo posterior de la hipófisis, así como el lóbulo neurointermedio, pueden participar en la liberación de la PRL inducida por la succión. Según esto, con dicho estímulo se estimula la liberación de oxitocina del lóbulo posterior, que trae como resultado la evacuación de la leche y se ha sugerido que dicha hormona también provoca la liberación de PRL (Samson *et al.* 1986, Moshe Laudon *et al.* 1990, Frawley 1994). Asimismo, se ha sugerido la presencia de un factor liberador de la PRL originado en el lóbulo neurointermedio (PRF) que controla la liberación de la PRL inducida por la succión. (Moshe Laudon *et al.* 1990). Estudios *in vitro* muestran que extractos obtenidos del lóbulo posterior de la hipófisis de ratas lactantes estimulan la liberación de PRL por células de la adenohipófisis, en contraste con extractos hipotalámicos que contienen significativamente

menor actividad secretora (Murai y Ben-Jonathan 1987 y Hyde *et al.* 1987) y que dicho factor liberador de PRL, es un péptido de peso molecular menor a 5000 daltones, distinto a cualquiera de los otros secretagogos, como el TRH, la oxitocina y el péptido vasointestinal (VIP). De acuerdo a estos autores, éste factor se requiere para la liberación de PRL estimulada por la succión (Murai y Ben Jonathan 1987) y para la generación del pico de liberación de PRL durante el proestro (Murai *et al.* 1989). Además se ha sugerido que dicho factor puede estimular la liberación de PRL *in vivo* en presencia de DA (Hyde y Ben-Jonathan 1989). Así, estudios previos sugieren que la lobectomía posterior inhibe la liberación de PRL estimulada por la succión. Estos resultados sugieren que durante la succión, el lóbulo posterior de la hipófisis secreta dicha señal química que estimula la liberación de PRL (Murai y Ben-Jonathan 1987).

Existen además otros factores capaces de estimular la liberación de la PRL como es el caso del péptido vasointestinal (VIP) que se ha encontrado en el lóbulo posterior de la hipófisis, pero en concentraciones muy bajas. El 90% de la oxitocina se encuentra en el lóbulo posterior, al igual que la vasopresina (Brownstein *et al.* 1980) y el 95% de la  $\alpha$ MSH y  $\beta$  endorfinas en el lóbulo neurointermedio (Eipper y Mains 1980). La dopamina y la serotonina se han detectado en ambos lobulos (Friedman *et al.* 1983). Estos mecanismos amplían el modelo de regulación hipotalámica de secreción de PRL, Sin embargo, se desconoce si estos factores influyen sobre la transformación y liberación fisiológica de la hormona, así como sobre el fenómeno de regionalización.

## II OBJETIVOS

Los estudios previos sobre la transformación y liberación de PRL por la adenohipófisis (AH) de la rata lactante, se han realizado analizando toda la AH. Este criterio fué adoptado porque no se habían detectado diferencias regionales importantes ni en el contenido de PRL, ni en la transformación o liberación de la misma (Mena *et al.* 1988 ). También, está el hecho de que células de PRL en cultivo primario respondiesen a la supresión de la inhibición por DA aumentando su responsividad a la TRH (Martinez de la Escalera *et al.* 1978).

En estudios anteriores del laboratorio cada AH fue dividida en cuatro partes (Mena *et al.* 1988), pero no hubo distinción entre las regiones centrales y laterales de la glándula. Por consiguiente en el presente proyecto se investigó si habían diferencias regionales, en relación a la transformación y secreción basal de la hormona, en adenohipófisis de ratas lactantes succionadas y no succionadas. Asimismo se determinó la influencia del intervalo previo de no succión en la regionalización de la secreción basal *in vitro* de la PRL, así como la responsividad de dichas regiones a la inhibición por la DA y a la estimulación por la TRH. Por ultimo dado que existen secretagogos de la PRL originados en el lóbulo posterior que pueden estimular la liberación de la PRL después de un período de succión. (Murai Ben-Jonathan 1987 y Landon M. Grossman 1990), y que éste lóbulo está relacionado con el fenómeno de la regionalización de secreción de la PRL, se determinó la influencia de dicho lóbulo posterior en la regionalización de la transformación y liberación de la PRL inducida por la succión y en la liberación *in vitro* de la hormona.

### III MATERIAL Y METODOS

#### Material biológico

##### 1) Animales

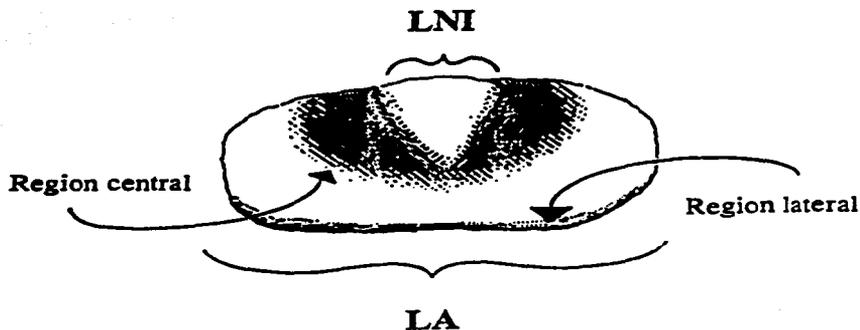
Se utilizaron ratas Wistar primíparas lactantes (intactas, neurohipofisectomizadas y testigo) de 7 a 14 días post-parto y de 8-10 crías por camada. Todos los animales se mantuvieron en cajas individuales en un cuarto con luz y temperatura controladas (0700-2100h) (23°C a 25°C). Las ratas fueron alimentadas con alimento para roedor (Ralston Purina Co., Chicago III) y agua *ad libitum*.

##### 2) Obtención de muestras

A) Las madres fueron separadas de sus crías durante distintos periodos (0,2,4,8,12,16 y 24 hrs.), dependiendo del tipo de experimento. Al cabo de dicho periodo las ratas fueron anestesiadas con éter y se les sacrificó por decapitación (grupo no succionado). Por otro lado, a un grupo de animales se les reunió con sus crías para un periodo de succión de 15 minutos y después fué sacrificado (grupo succionado).

Disección de la adenohipófisis: Posteriormente se extrajo la AH y se dividió en 2 porciones centrales y 2 laterales; las porciones centrales corresponden a la región interna de la glándula que rodea al lóbulo neurointermedio de la hipófisis y las porciones laterales al resto de la glándula (Fig. 3). (Papka *et al.* 1986). Las regiones centrales y laterales de cada animal fueron incubadas por separado en 300 ul de medio de Earle, a pH 7.3 en un agitador metabólico durante 120 minutos, bajo una atmósfera de 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub>. Durante la incubación cada media hora durante 2 hrs se tomó el medio de incubación de cada porción de tejido. Cada medio, a su vez, se reemplazó con la misma cantidad de medio fresco de Earle. Al final de la incubación las porciones de la AH fueron pesadas y mantenidas a -18°C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). La concentración de PRL liberada al medio de incubación fué cuantificada por PAGE.

B) Para determinar las concentraciones de la PRL liberadas a la circulación sanguínea por efecto de la succión, las ratas fueron anestesiadas con éter y posteriormente sacrificadas por decapitación. Se obtuvo sangre del tronco de cada animal y las muestras se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 minutos. Las muestras de suero obtenidas fueron mantenidas a -70°C hasta su posterior análisis mediante radioinmunoanálisis (RIA). Ver anexo.



**Fig 3** Localización de la región central y lateral de la adenohipófisis de la rata lactante. LA, lóbulo anterior; LNI, lóbulo neurointermedio. (Fig. Basada en los estudios hechos por Papka *et al.* 1986)

### 3) Análisis

La concentración de PRL en los tejidos (previamente homogenizados en buffer 0.05M tris HCL a ph 8.2) y medios de incubación se analizó mediante PAGE y densitometría y se cuantificó en curvas estándar de PRL 23K en geles de poliacrilamida al 7.5% en condiciones nativas de acuerdo al método de Nicoll *et al* (1969). Se utilizó un sistema de geles de tubo (75-80mm x 5mm). La electroforesis se llevó a cabo a 200V durante aproximadamente 45 minutos. Los geles fueron teñidos con Amido-Black al 7.5% y se destiñeron electroforeticamente con ácido acético al 7.5%.

#### **4) Analisis estadístico:**

Todos los datos están expresados como el promedio  $\pm$ EEM. La concentración de PRL en el plasma está expresada en ng/ml y las concentraciones de PRL en el tejido y en el medio de incubación están expresadas en ug/mg de AH. Las diferencias entre las medias de los grupos fueron comparadas por análisis de varianza (ANOVA) de una vía y seguidos por la prueba de Tukey. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## **EXPERIMENTO 1**

**A)** Para determinar el efecto del estímulo de la succión sobre la transformación de la PRL, se emplearon los animales en las condiciones antes descritas\*. Se utilizó un grupo de ratas succionadas (S) las cuales se les extrajo la AH y posteriormente se disecaron las distintas regiones de la glándula; posteriormente el tejido fué pesado y se mantuvo en congelación hasta que fué analizado por PAGE. Para determinar el efecto de la incubación sobre la transformación de la hormona en este grupo, las dos regiones de la AH provenientes de animales no succionados, se incubaron en 300ul de medio de Earle durante 30 minutos. Al término de la incubación del tejido se pesó y se guardó en congelación para su análisis posterior.

**B)** Para analizar la secreción basal de PRL de fragmentos de tejido provenientes de la región central y lateral de la AH, se utilizaron ratas succionadas y no succionadas y se procedió a obtener y analizar los medios de incubación en las condiciones antes descritas\*\*

**C)** Para determinar si la regionalización de la secreción de la PRL por la AH de la rata lactante tenía relación con el intervalo de no succión, se utilizaron varios grupos de animales y cada grupo correspondió a distintos periodos de separación de las crías de sus madres (0,2,4,8,12,16 y 24 hrs). Estos animales fueron sacrificados después de 8 horas de no succión e inmediatamente las ratas fueron sacrificadas (grupo no succionado). Posteriormente se disecaron las regiones centrales y laterales de la AH y se incubaron mediante el procedimiento antes mencionado. La concentración de la hormona secretada fue determinada mediante los métodos descritos previamente.\*\* (ver cuadro 1)

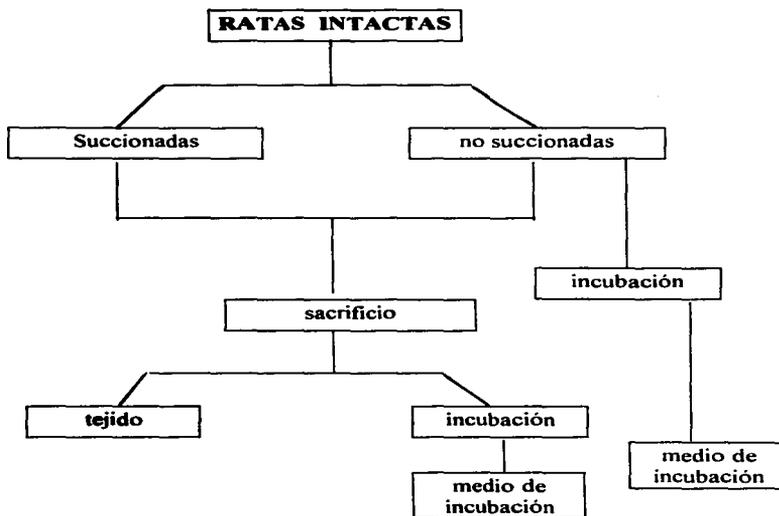
---

\* Ver material y Métodos inciso 1

\*\* Ver obtención de muestras inciso A y sección de análisis 22

# CUADRO I

## EXPERIMENTO I



## **EXPERIMENTO 2**

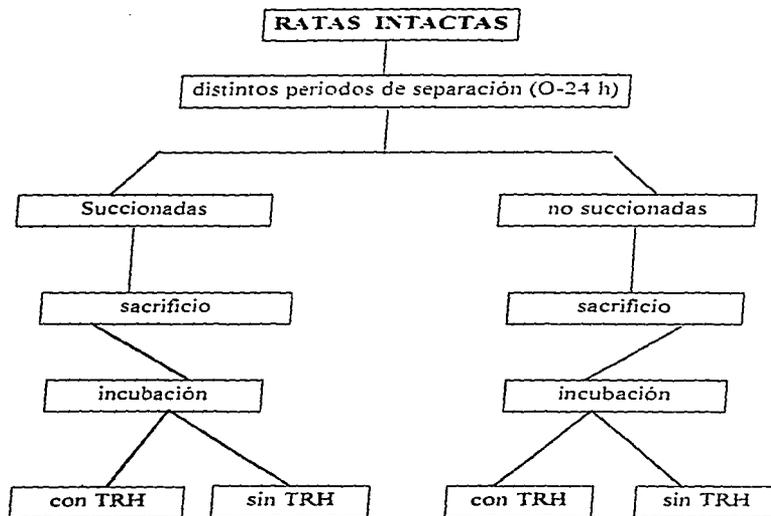
Con el objeto de determinar la sensibilidad de las diferentes regiones de la AH a la estimulación por la TRH y a la inhibición por DA, se integraron los animales en diferentes grupos con periodos de separación de sus crías de 0,4,8,12 y 16 hrs. Cada grupo a su vez se distribuyó en succionadas y no succionadas. Al extraer la AH, las regiones de la glándula (centrales y laterales) fueron divididas en dos partes, una parte fue incubada con TRH (.35 $\mu$ m) y otra en ausencia de la TRH, y para el caso de la DA en presencia (50um) o en ausencia de la misma. La obtención y análisis de los medios de incubación fué el descrito anteriormente\* ver cuadro II

---

\* Ver obtención de muestras inciso A sección de análisis 24

## CUADRO II

### EXPERIMENTO 2



Se utilizó el mismo procedimiento para analizar la sensibilidad inhibitoria por la DA

### EXPERIMENTO 3

A) Para determinar la influencia del lóbulo posterior de la hipófisis sobre la liberación *in vivo* de la PRL en respuesta al estímulo de la succión, se utilizaron varios grupos de ratas; un grupo de intactas, un grupo de ratas testigo (sham) y un grupo de ratas lobectomizadas utilizadas 16 hrs, 1 y 4 días después de la cirugía. Estos animales fueron anestesiados con éter y lobectomizados por la vía parafaríngea. Previo al período de separación y con el fin de que las crías pudieran obtener leche de sus madres, se les aplicó 200mu de oxitocina vía subcutánea a intervalos de 8 horas, con el propósito de que las crías obtuvieran la leche de las madres y con ello se evitara la involución de las glándulas. Sin embargo estas dosis de oxitocina no se administraron 8 horas antes del experimento debido a que como se sabe la oxitocina *per se* puede estimular la liberación de PRL.

En todos los grupos las ratas fueron empleadas de acuerdo a las condiciones antes descritas<sup>\*\*</sup> y de cada grupo se utilizó un grupo de ratas succionadas y un grupo de ratas no succionadas. La obtención y análisis de muestras se describió anteriormente<sup>\*\*\*</sup>

B) Para determinar la influencia del lóbulo posterior de la hipófisis en la transformación de la hormona en la glándula, se integraron los animales de igual forma que en el inciso anterior. Se extrajo la AH y se disecaron las regiones. Estas fueron guardadas en congelación para posteriormente determinar la concentración de PRL en la AH por PAGE. En cada experimento se revisó el complejo hipotálamo-hipofisiario y sólo se incluyó a las ratas con una lobectomía completa y sin daño en estructuras cercanas.

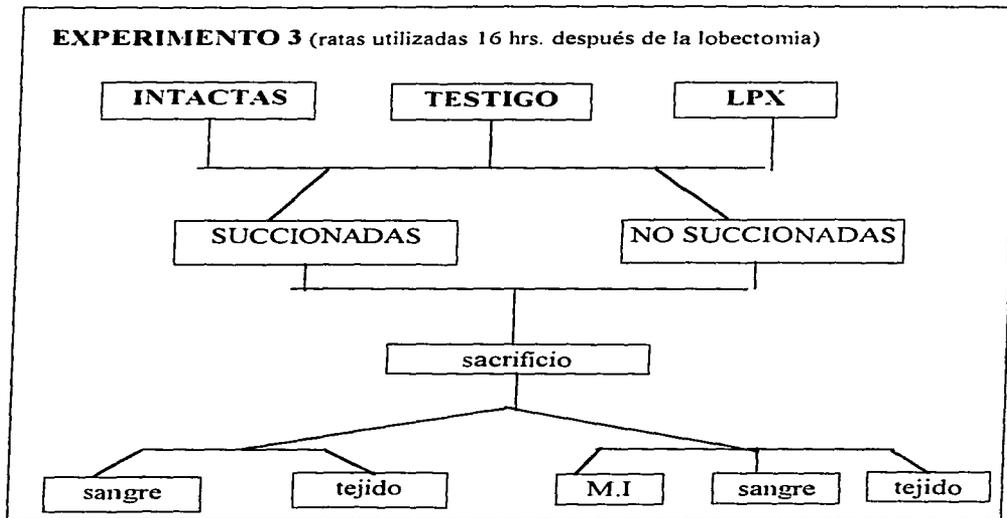
C) Con la finalidad de determinar la influencia del lóbulo posterior de la hipófisis sobre la regionalización de la liberación *in vitro* de la PRL, se integró a los animales de igual forma que como he descrito en los dos incisos anteriores, excepto que todos los animales fueron empleados sin succión previa, debido que en estudios previos se observó que la succión afecta la regionalización de la secreción de la PRL. (Mena *et al.* 1993). La AH extraída fué dividida en regiones centrales y laterales y cada una de estas regiones divididas a la mitad; una mitad fué utilizada para determinar la concentración

<sup>\*\*</sup> Ver material biológico: Animales

<sup>\*\*\*</sup> Ver obtención de muestras inciso B

inicial de PRL en el tejido y la otra mitad de cada región fue incubada durante 30 minutos en las condiciones previamente descritas\* . (ver cuadro III)

### CUADRO III



medio de incubación: M.I

Se utilizó el mismo procedimiento con las ratas lobectomizadas de 1 a 4 días.

## IV RESULTADOS

### Transformación *in vivo* e *in vitro* de la PRL

La transformación de la PRL es un cambio postraduccional que se manifiesta por un decremento en la detectabilidad de la hormona, el cual es inducido por la succión de las crías o por la incubación de la adenohipófisis. Se observó que la transformación de la PRL inducida por la succión, fue similar en la región central que en las regiones laterales de la glándula. Sin embargo, cuando se incubaron los tejidos de ambas regiones provenientes de ratas no succionadas, se observó que la transformación de la PRL ocurrió solo en la región central pero no en las regiones laterales de la glándula. Por otro lado, cuando se añadió la dopamina (DA) al medio de incubación, se observó que ésta inhibió la transformación en fragmentos de tejido de la región central de la AH. Estos resultados sugieren que de acuerdo al método que se use para producir la transformación ya sea la incubación o la succión, se va a presentar el fenómeno de la regionalización de la transformación de la PRL en la AH de la rata lactante.

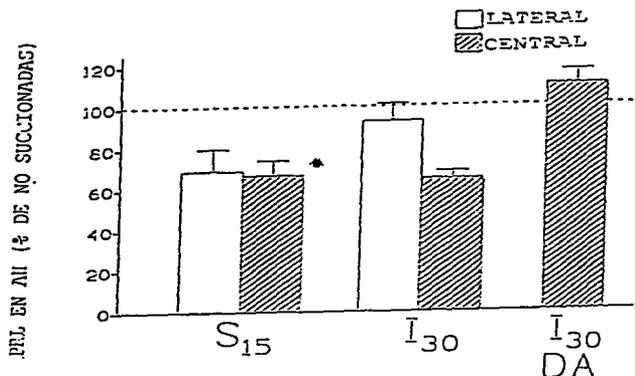


Fig 1 Efecto del estímulo de la succión (S<sub>15</sub>), incubación *in vitro* (I<sub>30</sub>) e incubación con dopamina (I<sub>30</sub> DA) sobre la concentración de la PRL en fragmentos provenientes de la región central y lateral de la adenohipófisis de la rata lactante. Los resultados están expresados en porcentaje de concentración de PRL (ug/mg) en las respectivas regiones de la AH de ratas separadas de sus crías por 8 hrs. Cada columna representa el  $\pm$  SEM. Cada grupo está formado por 4-5 ratas. \* denota diferencias significativas (P < 0.05)

## Secreción basal de la PRL por la AH de ratas no succionadas y succionadas:

En la fig 2 se observa que la secreción de la PRL por la AH fué mayor en los fragmentos de tejido provenientes de la parte central de la glándula que en los de la región periférica. Esta diferencia no se hizo evidente en tejido proveniente de ratas succionadas, donde no hubo diferencia significativa en la secreción de la PRL entre ambas regiones. Estos resultados sugieren que la succión elimina las diferencias regionales en la secreción de la PRL, y que este estímulo de la succión determina que los lactotrofos de ambas regiones se sincronicen para tener una capacidad secretora similar, es decir que los lactotrofos con alta capacidad secretora (localizados principalmente en la región central de la glándula), se sincronicen con los de baja capacidad secretora (localizados de manera preferencial en la región lateral) para liberar la hormona. Estos resultados están en parte de acuerdo con los descritos anteriormente por Frawley *et al* 1990, aun y cuando estos autores no determinaron la secreción basal de la hormona.

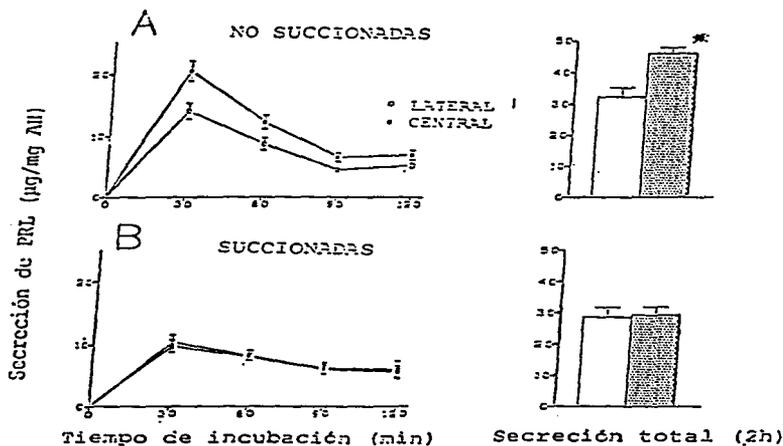
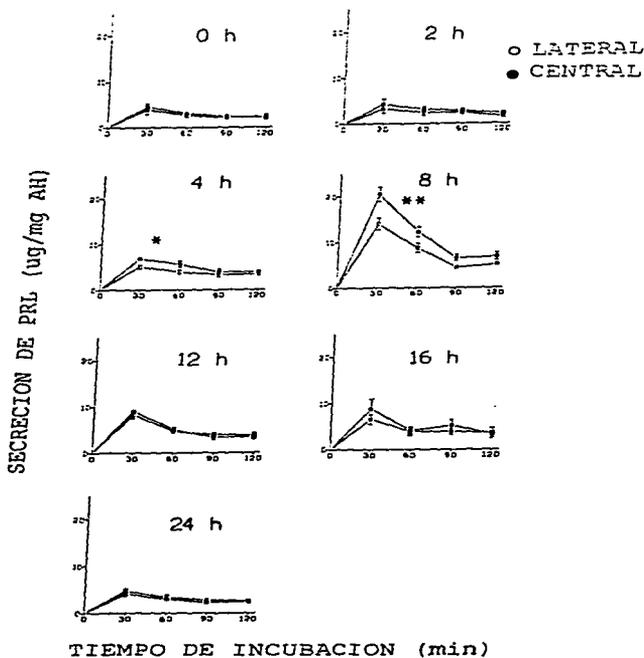


Fig 2 Secreción basal de PRL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  AH) durante (panel de la izquierda) y después de 2 hrs de incubación (panel de la derecha) de fragmentos de tejido provenientes de la región central y lateral de la AH de ratas no succionadas (A) y succionadas (B) \* denota diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

**Secreción basal de la PRL provenientes de la región central y lateral de la AH de ratas lactantes no succionadas:**

La región central de la AH liberó mayor cantidad de PRL que la región lateral, pero esto solo sucedió en aquellos fragmentos provenientes de ratas separadas de sus crías durante 4 y 8 hrs, mientras que en fragmentos de ratas separadas por periodos menores o mayores a los señalados, no se presentaron diferencias de regionalización en la secreción de la hormona.



**Fig 3** Secreción basal de PRL provenientes de fragmentos de la región central y lateral de la AH de ratas lactantes no succionadas, separadas de sus crías por distintos periodos (0,2,4,8,12,16 Y 24hrs) En las ordenadas se indica la concentración de PRL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de AH) y en las absisas se indica el tiempo de incubación en minutos.

**Responsividad a la estimulación por la TRH y a la inhibición por la DA de la liberación *in vitro* de la PRL, por cada región de la AH provenientes de ratas no succionadas y succionadas:**

Con excepción del grupo separado por 8hrs, no hubo diferencias significativas de responsividad a los secretagogos. En los fragmentos de tejido provenientes de ratas no succionadas la responsividad a la TRH se incrementó en la región central pero no en la región lateral de la AH. En contraste, con los fragmentos de tejido provenientes de ratas succionadas, ambas regiones fueron responsivas a la TRH.

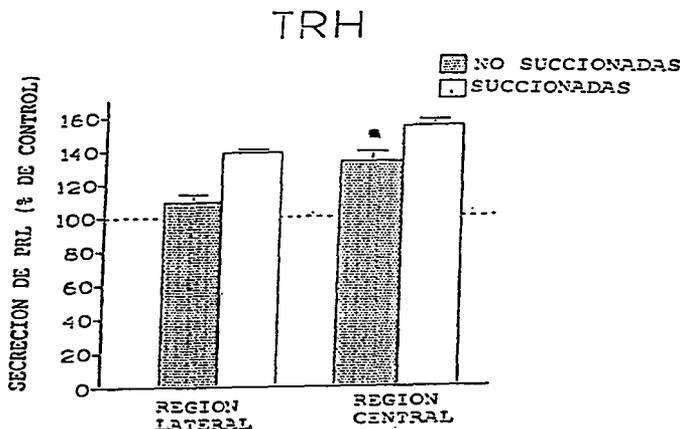


Fig 4 Efecto de la TRH (0.35µM) sobre la liberación *in vitro* de PRL por tejido proveniente de la región central y lateral de la AH de ratas no succionadas y succionadas. \* denota diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

En la figura 5 se observa que la inhibición por DA de la secreción de PRL fue mayor en tejidos de la parte central que en los de las porciones laterales de la AH de ratas no succionadas. Sin embargo, en ratas succionadas hubo mayor inhibición en las regiones laterales que en la región central de la AH.

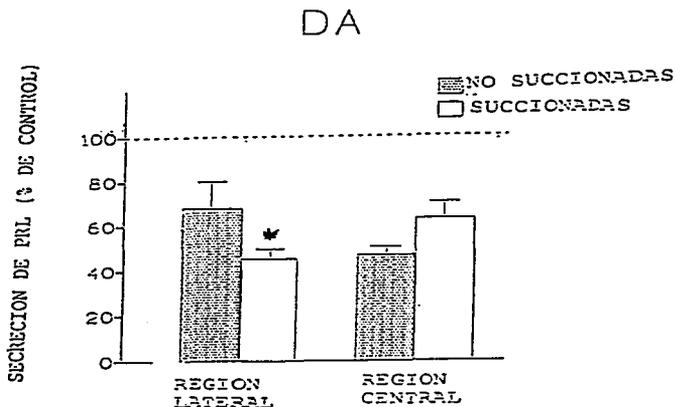


Fig 5 Efecto de la DA (50uM) sobre la liberación *in vitro* de la PRL por tejido proveniente de la región central y lateral de la AH de ratas no succionadas y succionadas. \* denota diferencias significativas ( $P < 0.05$ )

**Efecto del estímulo de la succión sobre la concentración de PRL en el plasma de ratas intactas, testigo y de ratas lobectomizadas :**

La concentración de la hormona aumentó después de 15 minutos de succión en el plasma de ratas intactas y de ratas testigo utilizadas 16 horas, 1 y 4 días después de la lobectomía y en menor proporción en el plasma de ratas lobectomizadas succionadas 1 y 4 días después de la cirugía. Sin embargo no hubo diferencias entre los niveles basales y los niveles de PRL en el plasma del grupo de ratas utilizadas 16hrs después de la cirugía y aquellas que fueron succionadas durante 15 minutos.

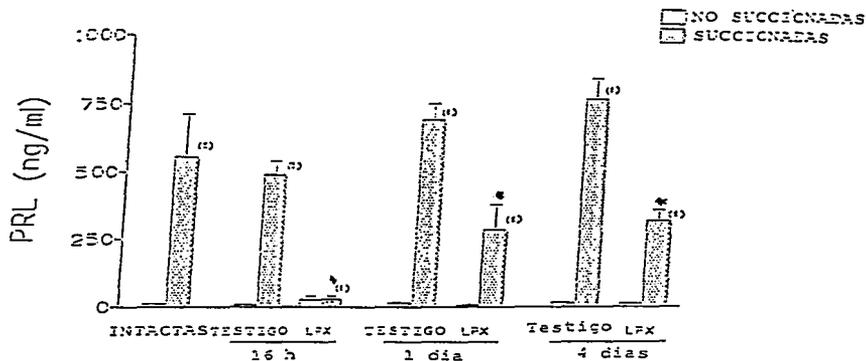


Fig 6 Concentración de PRL en plasma (ng/ml) proveniente de ratas intactas, ratas testigo (sham) y ratas lobectomizadas, las cuales fueron utilizadas 16hrs, 1 y 4 días después de la cirugía. Estos animales fueron separados de sus crías por 8 hrs y posteriormente fueron succionadas por sus crías por 15 mins. (Grupo succionado) o bien fueron sacrificados inmediatamente (grupo no succionado). El parentesis indica el número de ratas en cada grupo. \* denota diferencias significativas (P<0.05)

## Efecto del estímulo de la succión sobre la concentración de PRL en la AH:

La transformación de la hormona se observó en la región central, pero no en la región lateral de la AH, de ratas testigo utilizadas 4 días después de la cirugía, así como del grupo de ratas intactas, y de ratas LPx empleadas 4 días después de la cirugía. Sin embargo, no se observó transformación de la PRL por la succión en el tejido proveniente de ratas testigo utilizadas 16 horas después de la cirugía ni en el de ratas LPx usadas 16 horas y 1 día después de la cirugía. La concentración total de PRL en el tejido de ratas LPx de 16 horas y de un día, fué menor a la observada en la AH de los grupos restantes.

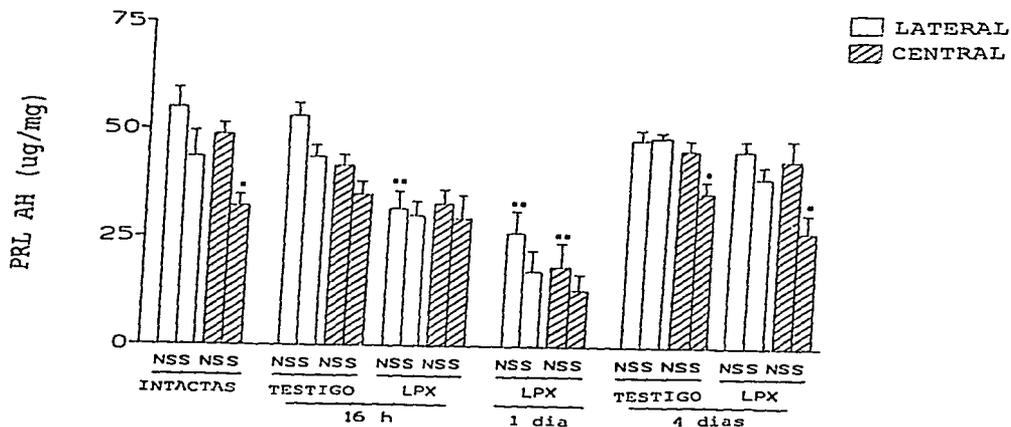


Fig 7 Concentración de PRL en fragmentos de la AH (ug/mg) provenientes de la región central y lateral de la AH de ratas lactantes succionadas y no succionadas de los diferentes grupos experimentales \* denota diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) \*\*denota que los valores fueron menores a  $P < 0.01$  comparados con los valores de los grupos

**Secreción *in vitro* de la PRL por fragmentos de la AH de la región central y lateral de la glándula:**

Los fragmentos de AH de ratas lobectomizadas de un día liberaron aproximadamente 50% menos PRL que los grupos de ratas intactas, testigo y lobectomizadas utilizadas 4 días después de la cirugía. La región central de la AH de ratas intactas y testigo liberaron 20-30% más PRL/mg de tejido que la región lateral; sin embargo, esto no se observó en el tejido proveniente de ratas lobectomizadas utilizadas 1 y 4 días después de la cirugía.

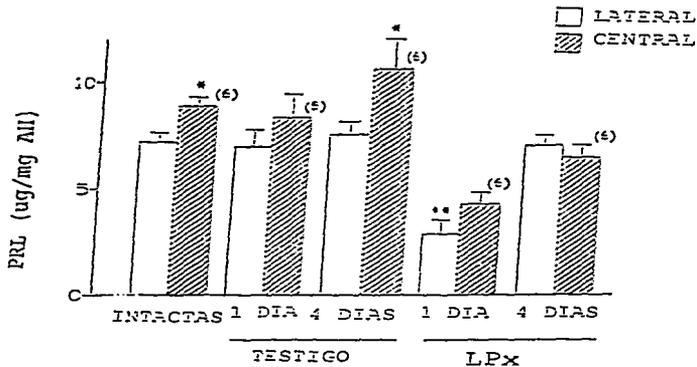


Fig 8 Secreción basal de PRL (ug/mg) después de 30 mins. de incubación de fragmentos de tejido derivados de la región central y lateral de la AH provenientes de ratas intactas, de ratas testigo (sham) y lobectomizadas usadas 1 y 4 días después de la cirugía. El parentesis indica el número de ratas en cada grupo.

\*Denota diferencias significativas ( $P < 0.05$ ). \*\* denota que los valores fueron significativamente menores ( $P < 0.01$ ) comparados con los demás grupos experimentales.

## V DISCUSION

De los resultados obtenidos, se concluye que el fenómeno de la regionalización de la secreción de la PRL por la AH de la rata lactante se desarrolla en función del tiempo que la madre ha estado privada de la succión. Dado que dicha regionalización fue observada únicamente en adenohipófisis provenientes de ratas separadas por 4 y 8 hrs, esto sugiere que la síntesis y almacenamiento de la PRL puede ser mayor en la región central que en la región lateral de la glándula. Por otro lado el hecho de que la succión elimine las diferencias en la secreción de la PRL sugiere que este estímulo produce una disminución en la secreción incrementada de la hormona por la región central y, por ende una sincronización de toda la población de lactotrofos en la glándula para la secreción de la hormona. De acuerdo a los resultados obtenidos con DA y TRH, en general nuestros resultados concuerdan con resultados previos (Frawley *et al.* 1987, 1990 y 1991) Las principales diferencias entre los estudios hechos por Frawley y Mena se encuentran en el cuadro anexo.

En estudios previos se observó que la región central de la AH es mas sensible a la transformación que la región lateral (Mena *et al.* 1993). Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el estímulo de la succión indujo una transformación de la PRL en la región central, proveniente de tejido de ratas intactas, testigo y lobectomizadas utilizadas 4 días después de la cirugía, mientras que no se produjo la transformación en el tejido proveniente de ratas testigo empleadas 16hrs después de la cirugía y en ratas lobectomizadas utilizadas 16hrs y 1 día después. Por otro lado, el contenido de PRL en la AH fué significativamente menor en el tejido proveniente de ratas lobectomizadas que fueron utilizadas 16hrs y 1 día después de la cirugía. Este fenómeno de transformación se presentó en ratas lobectomizadas empleadas 4 días después de la cirugía, lo cual sugiere que la ausencia de la transformación en los grupos restantes fue parte de un efecto transitorio y que el lóbulo posterior no ejerce un papel determinante en la transformación de la PRL.

Con relación a la influencia del lóbulo posterior de la hipófisis en la liberación de la PRL inducida por la succión, se observó que las concentraciones de PRL aumentaron después de 15 minutos de succión en el plasma de ratas intactas y de ratas testigo y en menor proporción en el plasma de ratas lobectomizadas succionadas 1 y 4 días después de la cirugía, aun y cuando no se observaron diferencias entre los niveles

basales y los niveles de PRL en el plasma del grupo de ratas utilizadas 16 hrs después de la cirugía y que fueron succionadas durante 15 minutos. Estos resultados sugieren que existe un período transitorio quizá asociado al estrés postraumático, posterior a la extirpación del lóbulo posterior de la hipófisis, en el cual el estímulo de la succión no es eficaz para producir la secreción de la PRL y que la función de la glándula es recuperada a las 24 horas después de la remoción del lóbulo posterior. Asimismo, los resultados sugieren que la eficiencia de la succión para provocar la liberación de la hormona disminuye después de la lobectomía posterior, una vez que el animal se ha recuperado de la operación. Esta suposición se basa en que las concentraciones de la PRL en el plasma de ratas succionadas están disminuidas aún 4 días después de la operación. Estudios previos utilizando ratas ciclantes y ratas lactantes (Murai y Nira 1987, Fagin *et al.* 1982, Ben Jonathan *et al.* 1982 y Murai 1989) mostraron que al extirpar el lóbulo posterior, las concentraciones basales de PRL se incrementan de 3 a 4 veces sobre las concentraciones prequirúrgicas. Este aumento se presenta inmediatamente después de la lobectomía, retornando a los niveles normales unas horas después de la cirugía (Ben-Jonathan *et al.* 1982, Froehlich *et al.* 1984) o de 3 a 4 días después. (Fagin *et al.* 1982, Murai *et al.* 1986) y esto va asociado a la incapacidad del estímulo de la succión para inducir la liberación de la hormona. (Murai *et al.* 1987). Se ha sugerido que el aumento en las concentraciones basales de la PRL después de la lobectomía son el resultado de la remoción de la inhibición dopaminérgica, y dado que las concentraciones de DA en el lóbulo posterior igualan a las concentraciones de la DA encontradas en el hipotálamo basal medio (Ben-Jonathan y Froehlich 1985, Perkins *et al.* 1979 y Saavedra *et al.* 1975), se supuso que la supresión de la inhibición por DA provocaba una mayor secreción basal de la PRL. La ausencia de la liberación de la PRL inducida por la succión en ratas que fueron utilizadas de 12 a 14 hrs después de la lobectomía, apoyan los resultados de Murai y Ben-Jonathan (Murai *et al.* 1987). En dicho estudio las ratas fueron utilizadas de 12 a 14 hrs. después de la cirugía y los resultados demostraron ausencia de secreción de la PRL después del estímulo de la succión. Sin embargo, en relación a la elevación de los niveles basales de la hormona que no se observaron en el presente estudio, es posible que ello sea debido al menor estrés de nuestras ratas las cuales, por ejemplo, no fueron canuladas crónicamente.

Con respecto a la secreción *in vitro* de la PRL por fragmentos de la AH, los fragmentos de la AH de ratas lobectomizadas de un día

liberaron aproximadamente 50% menos PRL que los grupos de ratas intactas, testigo y lobectomizadas utilizadas 4 días después de la cirugía. Como se indicó anteriormente, este efecto es transitorio ya que se restaura la funcionalidad de la glándula y puede ser debido al estrés postquirúrgico.

En resumen, los resultados del presente estudio sugieren que con relación a la importancia del lóbulo posterior para la liberación de PRL por la succión, la importancia de esta estructura es solo relativa y, por ende, que en su ausencia, la liberación de la hormona es regulada por factores de un origen distinto. Por otra parte, dado que en los experimentos en que se incubaron las diferentes porciones de la AH de ratas LPx no se observó la regionalización en la secreción de la hormona, esto sugiere que dicho fenómeno si esta regulado por influencias provenientes de dicha estructura.

Se ha reportado anteriormente que el lóbulo neurointermedio de la hipófisis contribuye por diferentes mecanismos a la compleja regulación de la liberación de la PRL y que después de la succión cambios drásticos se presentan en la sensibilidad de los lactotropos a los secretagogos, principalmente en las células localizadas en la región central de la AH. (Hill *et al.* 1991, Porter *et al.* 1992). Además estudios hechos anteriormente sugieren la liberación del  $\alpha$ MSH durante la succión (Hill *et al.* 1991, Taleisnik *et al.* 1966, Nagy *et al.* 1991) y de la existencia de factores liberadores que influyen sobre la liberación de la PRL (Mena *et al.* 1995, Hill *et al.* 1991, Hill *et al.* 1993, Hyde *et al.* 1988, Landon *et al.* 1990)

**CUADRO IV: PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LOS ESTUDIOS HECHOS POR FRAWLEY *et al* y MENA *et al*.**

**PROPORCIÓN DE LACTOTROPOS Y LIBERACIÓN DE PRL EN LAS DIFERENTES REGIONES DE LA ADENOHIPOFISIS (AH)**

**FRAWLEY *et al*.**

**MENA *et al*.**

Ratas no succionadas

Hay dos poblaciones de lactotrofos: 1. baja proporción de lactotrofos con alta capacidad secretora y 2. alta proporción de lactotrofos con baja capacidad secretora, supuestamente los lactotrofos de alta capacidad se encuentran en la región central

La región central de la AH, liberó mayor cantidad de PRL que la región lateral

Ratas succionadas

Aumenta la proporción de lactotrofos con baja capacidad secretora

La región central de la AH, liberó la misma cantidad de PRL que la región lateral

**EFFECTO DEL TRH SOBRE LA LIBERACIÓN DE PRL**

Ratas no succionadas

Los lactotrofos de la región lateral fueron mas sensibles a la estimulación por la TRH que los de la región central

La región central fue mas sensible a la estimulación por la TRH

Ratas succionadas

Ambas regiones fueron sensibles a la estimulación por la TRH

Ambas regiones fueron sensibles a la estimulación por la TRH

**EFFECTO DEL TRH SOBRE LA PROPORCIÓN DE LACTOTROPOS**

Ratas no succionadas

Disminuye un poco la proporción de lactotrofos con baja capacidad secretora y aumenta la proporción de lactotrofos con alta capacidad secretora

Ratas succionadas

Aumenta la proporción de lactotrofos con alta capacidad secretora

**FRAWLEY et al.**

**MENA et al.**

**EFFECTO INHIBITORIO DE LA DA SOBRE LA LIBERACIÓN DE LA PRL**

**Ratas no succionadas**

Mayor inhibición en la región central

Mayor inhibición en la región central

**Ratas succionadas**

No hubo inhibición a la DA en ambas regiones

Mayor inhibición en la región lateral

**EFFECTO DE LA DA SOBRE LA PROPORCIÓN DE LACTOTROPOS**

**Ratas no succionadas**

Aumenta la proporción de lactotrofos con baja capacidad secretora y disminuye la proporción de lactotrofos con alta capacidad secretora

**Ratas succionadas**

Aumenta la proporción de lactotrofos con baja capacidad secretora y hay muy baja proporción de lactotrofos con alta capacidad secretora

**EFFECTO DE LA  $\alpha$ MSH SOBRE LA PROPORCIÓN DE LACTOTROPOS Y LA LIBERACIÓN DE PRL POR AMBAS REGIONES DE LA AH**

**Ratas no succionadas**

La proporción de lactotrofos de la región central aumentó en presencia de la  $\alpha$ MSH, no teniendo efecto en la proporción de lactotrofos de la región lateral

Las dos regiones de la AH liberaron la misma cantidad de PRL, vgr., desapareció la regionalización

## HIPÓTESIS

La sensibilidad a los secretagogos es distinta en las dos regiones de la AH, y depende del estado fisiológico de la glándula. Durante la succión hay mayor sensibilidad a la TRH y no hay sensibilidad a la DA en ambas regiones.

La región central de la AH de la rata lactante responde de manera independiente

Reclutamiento

La sensibilidad a los secretagogos es distinta en las dos regiones de la AH, y depende del estado fisiológico de la glándula. Durante la succión hay sensibilidad a la estimulación por la TRH en ambas regiones y menor inhibición a la DA en la región central

La AH de la rata lactante se comporta como una sola glándula

Sincronización

## **VI CONCLUSIONES**

a) Los resultados sugieren que el fenómeno de la regionalización de la transformación de la PRL por la AH de la rata lactante se manifiesta dependiendo del método que se use para producir la transformación, ya sea la incubación o la succión.

b) El estímulo de la succión elimina las diferencias regionales de la secreción de la PRL, lo cual sugiere que éste estímulo produce una disminución en la secreción incrementada de la hormona por la región central y por ende una sincronización de la secreción de la hormona por la población de lactotropos en la glándula.

c) La regionalización de la secreción de la PRL por la AH de la rata lactante es un fenómeno que depende del intervalo de no succión.

d) Se sugiere la existencia de heterogeneidad regional funcional de la AH, es decir, que la glándula en su totalidad no se comporta de manera homogénea a los reguladores hipotálamicos, y que la responsividad diferencial a los secretagogos está asociada al estímulo de la succión. Se presentó mayor responsividad a la estimulación por la TRH en ambas regiones y menor responsividad a la DA en la región central, lo cual apoya la sugerencia que en dicha región se genera la mayor secreción de la hormona durante la succión.

e) Se sugiere que el lóbulo posterior de la AH participa en la liberación *in vivo* de la PRL inducida por la succión, pero no es esencial para la liberación de la hormona, ya que existe un efecto pasajero de no liberación de la PRL en ratas utilizadas 16 horas después de la lobectomía y que se recupera a las 24 horas de la cirugía.

f) La remoción del lóbulo posterior de la hipófisis resulta en una depresión transitoria de la transformación y liberación de la PRL inducida por la succión, la cual es seguida por la restauración de la transformación y recuperación parcial de la liberación de la hormona. Asimismo, esto sugiere que el lóbulo posterior participa, aunque no de manera esencial, en la regulación de la secreción de la PRL por la AH de la rata lactante.

g) Se sugiere que la regionalización de la secreción de PRL está regulada por el lóbulo posterior y/o neurointermedio, ya que dicho fenómeno no se observó en tejidos incubados provenientes de ratas operadas 4 días antes.

## VII ANEXO

### RIA

#### a) Marcaje de la hormona:

El marcaje de la hormona se hizo de acuerdo al método de Iodo-Gen (Bolt *et al* 1986) con las siguientes modificaciones:

La hormona NIDDK-rat-PRL-I-6 (5ug hormona en presencia de 1.5 ug Iodo Gen) con agitación manual, durante 10 minutos. La detención de la reacción se realizó con metabisulfito de sodio (6ug/200ul) y yoduro de potasio (20ug/200ul). Al término de la reacción, la mezcla se purificó en una columna de exclusión molecular (Sephadex G50-150). Con una actividad específica de 49.0 uc/ug de PRL y una eficiencia de marcación de 49.89 %.

#### B) Titulación del anticuerpo

Una vez obtenida las fracciones útiles para el RIA, se tituló el primer anticuerpo (anti rat PRL), diluciones de 1:10,000 hasta 1:320,000 fueron analizadas, siendo la dilución de 1:80,000 que presentó un porcentaje de unión de 50% (%B/Bo). El segundo anticuerpo (generado en borrego contra IgG de conejo) se utilizó a una dilución de 1:40

#### C) Curva Estándar

se utilizó un amortiguador de fosfatos salino (0.05M) ph 7.2 en presencia de albúmina serica bovina (BSA) al 1%. La curva estandar se desarrolló con la proteína NIDDK-rat-I-6 a las dosis de 0.1 hasta 12.8 ng/tubo. La incubación con el primer anticuerpo fué a temperatura ambiente por 20hrs y la segunda incubación se llevó a cabo por 20 hrs a temperatura ambiente.

El coeficiente de variación intraensayo fué de 4.28% y el coeficiente de variación interensayo fué de 11.18%.

## **Extirpación quirúrgica del lóbulo posterior de la hipófisis (descripción de la técnica)**

### **Material:**

- Mesa de operaciones
- Disectores de vidrio (varillas de 10cm. de largo por 4 mm de ancho)
- Separador curvo de vidrio (varilla de 12 cm de largo por 6cm de diámetro)
- Aspiradores de sangre
- Aspirador de hipófisis
- Horquilla para incisivos superiores
- Separadores curvos de metal
- Abatelenguas
- Abrehocicos y mandriles para manipular los catéteres endotraqueales
- Cánulas endotraqueales
- Legra para hueso
- Aguja para meninges
- Estereomicroscopio con lámpara integrada  
(Detalles en Quintanar *et al.* 1994)

### **Manejo preoperatorio:**

Previamente a la anestesia se inyectó a los animales con atropina para evitar la secreción de moco (3mg/100g de peso/via subcutánea) y posteriormente se intubó la tráquea con una cánula endotraqueal de plástico.

### **Procedimiento quirúrgico: (vía parafaríngea)**

La cara anterior del cuello se limpia con cloruro de benzalconio y se hace una incisión de 2 a 3 cm en la línea media de la piel, a un cm por detrás del borde inferior de la mandíbula, hasta un poco por delante del esternón. Se corta la fascia que recubre a los músculos digástricos y esternohioideos. Usando como referencia el tendón central del músculo digástrico izquierdo, con los disectores de vidrio rectos se hace una separación roma de las siguientes estructuras: vena yugular interna izquierda y cara interna del músculo masetero del mismo lado, los cuales quedan hacia afuera, y el músculo digástrico y conductos faringoesofágico y laringotraqueal, que quedan hacia la línea media. De aquí en adelante la operación se hace bajo control microscopico

(estereomicroscopio con lámpara integrada) con aumento de 7.5x o 10x. Con el separador de vidrio se retraen las estructuras internas hacia la línea media. En el fondo aparece el piso de la nasofaringe de la que sobresale el extremo distal de la apófisis pterigoidea izquierda, tomando esto como referencia y a 1.5 cm en dirección posterior, se desprenden del hueso occipital los músculos largos de la cabeza que en él se insertan. Al hacer esto aparece en la línea media del hueso una cresta longitudinal, la cual termina un poco antes de llegar a la articulación del occipital con el esfenoides, que se identifica fácilmente como una línea azul en dirección horizontal. Se colocan los separadores de metal de tal forma que haya una buena visibilidad de la zona operatoria. Para evitar el daño por compresión, es importante que los separadores no queden excesivamente apretados. El número de separadores y el lugar de su localización dependerá de la visibilidad de la zona operatoria. Generalmente se coloca uno retrayendo hacia adelante el músculo nasofaríngeo y otros dos que tiran hacia abajo y a los lados, formando un triángulo de base inferior. Con la broca se trepana el hueso occipital justo en el extremo anterior de la cresta y por debajo de la línea azul hasta llegar a la duramadre teniendo cuidado de no romperla. Con la legra para hueso, se levantan y desprenden los restos de la lámina interna del hueso, y se redondean los bordes del orificio, hasta que quede con un diámetro final de 3mm aproximadamente. Para extraer la neurohipófisis, se rompe la duramadre en el borde posterior de la hipófisis. Con una espátula se levanta ligeramente el lóbulo anterior; esto permite observar a la neurohipófisis. Para extraer el lóbulo, se toma un pedazo de malla de nylon fina, (la parte más cerrada del tejido de una pantimedida) y se interpone a manera de red entre el aspirador de hipófisis y el tubo de un sistema vacío, se coloca un dedo en el orificio lateral del aspirador y con suavidad se aspira la neurohipófisis, la cual deberá salir completa, de una sola aspiración. Al extraer la neurohipófisis se observa bajo el microscopio y se determina si realmente es dicho lóbulo. Hay que asegurarse de que no haya hemorragia. Se procede a retirar los separadores de metal y a suturar la piel. (Técnica desarrollada por Quintanar Stephano *et al.* 1994)

### **Preparación de ratas Testigo**

El material, manejo preoperatorio y el procedimiento quirúrgico fue el mismo que el utilizado en las ratas a las que se les extirpó el lóbulo posterior de la hipófisis, a excepción de que en el momento de romper la duramadre en el borde posterior de la hipófisis, se aspira muy suavemente, simulando con esto

la extracción de la neurohipófisis. Se procedió a retirar los separadores de metal y a suturar la piel. Los cuidados posoperatorios consistieron en que las ratas tuvieran libre acceso al agua y alimento, se les aplicó solución salina (.2ml) por vía subcutánea a intervalos de 8 horas hasta que fueron utilizadas el día del experimento.

### **Cuidados postoperatorios**

Antes de retirar la cánula traqueal, se aspira el moco de la faringe a través del hocico y de la nasofaringe a través de los orificios nasales. El moco suele ser sanguinolento o con coágulos, se debe aspirar lo más que se pueda y se procede a retirar la cánula. El primer efecto de la extirpación del lóbulo posterior es la poliuria, que aparece entre los 40-90 mins. después de la operación, y se autocontrola en las siguientes 12 horas. Es importante que la rata tenga libre acceso al agua glucosada para evitar la muerte por deshidratación y que la temperatura ambiente sea de 28-30°C.

## VIII BIBLIOGRAFIA

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

Aramburo C., Montiel J.L., Proudman, L.R. Bergham and C.G. Scanes. (1992):Phosphorilation of prolactin and growth hormone. **J.Mol:Endocr.**, **8**:183-191.

Barrington E.J.W. ed hormones and evolution. New York, Academic Press. p.p. 561-642.

Brooks Ch.L,Yeong G. K, Prarthana A, Bettina E., Kleeman and Gayle C Johnson. (1990): Phosphorylated variant of bovine prolactin: **Molec.and Cell. Endoc.**, **71** : 117-123.

Ben-Jonhatan N,Luanne L. Peters.(1982): Posterior lobectomy:Differential elevation of plasma prolactin and luteinizing hormone in estrous and lactating rats.**Endocrinol.**, **119**:1861-1865

Ben Jonathan N, Froehlich J.C. (1984): Posterior pituitary involvement in the control of luteinizing hormone and prolactin secretion during the estrous cycle. **Endocrinol.**, **114**:1059-1064.

Ben-Jonathan N. (1985):Dopamine: a prolactin inhibiting hormone. **Endocr. Rev.**, **6**:564-589.

Ben-Jonathan N,Froehlich JC.(1985):The posterior pituitary dopaminergic system and its regulation of anterior pituitary hormone secretion In: Catecholamines as hormone regulators.**Raven Press**:145-149

Boockfor F.R, Frawley S.L. (1987): Funcional variations among prolactin cell from different pituitary regions. **Endocrinol.**, **120**: 874-879.

Brownstein M.J, Russel J.T, Gainer H. (1980): Synthesis,transport,and release of posterior pituitary hormones.**Science.**, **20**:373-375

Butcher R.L, Fugo N.W and W.E Collins. (1972): Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rats. **Endocrinol.**, **90**:1125

Cota G.,Hiriart M,Horta J. and Torres Escalante J.L.( 1990): Calcium channels and basal prolactin secretion in single male rat lactotropes. **Am. J Physiol.**, **259**:C949-C959

DeGreef W.J,Plotsky P.M, Neill J.D.(1981): Dopamine levels in hipophysial stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lacting rat: effects of a simulated suckling stimulus. **Neuroendocrinol.**, **32**:229-233

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

De Vlaming V.L. (1979): Actions of prolactin among the vertebrates. In: Barrington EJW (ed) **Hormones and Evolution**, Academic Press, New York, 561-642

Eckert R .(1990): **Fisiología animal mecanismos y adaptaciones**. 7 Ed. Interamericana, España. 320pp.

Eipper BA ,Mains RE. (1980): Structure and biosynthesis of prolactin-releasing hormone.

Fagin K.D, Neill J.D. (1982): Involvement of the neurointermediate lobe of the pituitary gland in the secretion of prolactin and luteinizing hormone in the rat. **Life sci**. **30**:1135-1141

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

Farquhart M.G.(1977): Secretion and crinophagy in prolactin cell en:Comparative endocrinology of prolactin. Eds.A.D Dellman, J.A. Johnson,M.D. Klachko. **Plenum press.**, 37-53

Frawley L.S.(1994): Role of the hypophyseal neurointermediate lobe in the dynamic release of prolactin. **Endocrinol. Metab.**,**5**:107-112

Fluckiger E.E. and Von Werde K. (1982):Prolactin Physiology, Pharmacology and clinical Finding. **Monographs on Endocrinol.**, Vol **23**.

Freeman M.E, Reichert L.E Jr. (1972): Regulation of the proestrus surge of prolactin secretion by gonadotropin and estrogens in the rat. **Endocrinol.**,**90**:232.

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

Froehlich,J.C, Ben-Jonathan N,(1984): Posterior pituitary involvement in the control of luteinizing hormone and prolactin secretion during the estrous cycle.**Endocrinol**. **114**:1059-1064

Ganong W.F., (1980): Prolactin: A general overview. En central and peripheral regulation of prolactin function (Mac leod,R.M. y Scapagnini, U. Eds.) raven Press. New york. pp 1-10

Giannattasio G,De Ferrai M.E, Sapda A. (1984): Transduction of dopamine and Vip signals in prolactin secreting cells. En:prolactin secretion a Multidisciplinary Approach. Eds. F.Mena,C.M. Valverde. Academic Press,Orlando. p.p. 187-208

Gourdji D, Bataille D, Vandin N, Grouselle D, Rosselin G, Tixiervidal A. (1979): Vasoactive intestinal peptide (VIP) stimulates prolactin (PRL) release and cAMP production in a rat pituitary cell line (GH3/B6) Additive effects of Vip and TRH release. **FEBS letters.**, **104**:165-168.

Grosvenor C.E, Maiweg H and Mena F. (1970): Effect of non-suckling interval on the ability of prolactin to stimulate milk secretion in rats. **Am. J. Physiol.**, **219**: 403-408.

Grosvenor C.E, Mena F, Withworth N.S. (1979): The secretion rate of prolactin in the rat during suckling and its metabolic clearance rate after increasing intervals of nonsuckling. **Endocrinol.**, **104**:372-376

Grosvenor C.E, Mena F. (1980): Evidence that the dopaminergic prolactin-inhibiting-factor mechanism regulates the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. **Endocrinol.**, **106**:481-484

Grosvenor C.E, Mena F. (1980): Evidence that thyrotropin releasing hormone and hypothalamic prolactin, in the rat. **Endocrinol.**, **107**:863-868.

Grosvenor C.E, Martinez de la Escalera G and Mena F. (1982): Regulation neuroendocrina de la secreción de PRL durante la lactancia. En nuevos Conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisiaria. CONACYT. México p. 153

Grosvenor C.E, Mena F. (1982): Regulating mechanisms for oxytocin and prolactin secretion during lactation : **Neuroendocrine perspectives.**, **1**:69.

Grosvenor C.E, Goodman G.T, Mena F. (1984): Control of the multiphase secretion of prolactin in the lactating rat: In Prolactin Secretion: A multidisciplinary Approach. Eds. F.Mena, R.M. Valverde. Academic Press, Orlando. p.p.275-284

Gul N,S and Hymer W.C. (1989): Prolactin variants in the rat adenohypofisis. **Mol. and Cell Endocr.**, **61**:97-107

György M, Nagy F.R, Boockfor and Stephen Frawley L. (1991): The suckling stimulus increases the responsiveness of mammatropes located exclusively within the central region of the adenohypofisis. **Endocrinol.**, **128**: 761-764.

Gyorgy M, Nagy G.M, and Stephen Frawley . (1990): Suckling increases the proportion of mammatropes responsive to various prolactin releasing stimuli. **Endocrinol.** **127**:2079-2084

Haro L.S., Talamantes S. (1983): Secreted mouse prolactin and stored ovine prolactin in desamino isoforms: Effect of deamination on both receptor binding and immunoreactivity. **Endocrinol. (Suppl)** **62S**:255-259

Hyde James F, Ichiro Murai and Nira Ben-Jonathan. (1987): the rat posterior pituitary contains a potent prolactin releasing factor: Studies with perfused anterior pituitary cells. **Endocrinol.** 121:1531-1539

Hill J.B, Nagy G.M, Frawley L.S.(1991): Suckling unmasks the stimulatory effect of dopamone on prolactin release: possible role for  $\alpha$  melanocyte stimulating hormone as a mammatrope responsiveness factor. **Endocrinol.** 129:843-847

Hill JB, Lacy E.R, Nagy G.M, Gorcs T.J, Frawley L.S. (1993): Does  $\alpha$  melanocyte stimulating hormone from the pars intermedia regulate suckling-induced prolactin release? Supportive evidence from morphological and functional studies. **Endocrinol.** 133:2991-2997

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

Hyde J.F, Ben-Jonathan N.(1988): Characterization of prolactin-releasing factor in the rat posterior pituitary. **Endocrinol.** 122:2533-2539

Hyde J.F, Ben-Jonathan N.(1989): The posterior pituitary contains a potent prolactin-releasing factor: in vivo studies. **Endocrinol.**, 125:736 \*

Kiefer K.A, Malarky B. (1978): Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: Experimental conditions that alter gel filtration patterns. **J. of clin. endocrinol. and metab.** 46:119-124

Laudon M, Grossman D.A, Ben-Jonathan N.(1990): Prolactin releasing factor: cellular origin in the intermediate lobe of the pituitary. **Endocrinol.** 126:3185-3192

Leong D.A., Frawley and J.D Neill (1983): Neuroendocrine control of prolactin secretion. **Ann Rev. Physiol.** 45:109-127

Lewis U.J, Singh R.N.P, and Sinha. (1984): Glycosylated ovine prolactin. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 81:385-389

Li C.H. (1974): Chemistry of ovine prolactin. in: Handbook of physiology. **Endocrinol.** part 2:103-110

Luque E.H, Muñoz de Toro, Smith P.F. and Neill J. (1986): Subpopulations of lactotropic cells detected with the reserve hemolytic plaque assay differential responsiveness to dopamine. **Endocrinol.**, 118:2120-2124.

Martinez de la Escalera G, Guthrie J, Weiner R.I.(1978): Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP: stimulation via Ca protein kinase C pathway. **Neuroendocrinol.**, 47:38-45

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

Mena F. (1978): Control neuroendocrino de la lactancia. *Gaceta Méd de Méx.*, **144**:2-63

Mena F, Martinez de la Escalera G, Clapp C, Aguayo D, Forray C, Grosvenor C.E. (1982): A solubility shift occurs during depletion-transformation of prolactin within the lactating rat pituitary. *Endocrinol.*, **11**:1086-1091

Mena F, Pacheco P, Aguayo D, Clapp C and Grosvenor C.E. (1978): A rise in intramammary pressure follows electrical stimulation of a mammary nerve in anesthetized rats. *Endocrinol.*, **103**: 1929

Mena F, Martinez de la Escalera G, Clapp C, Aguayo D, Forray C, Grosvenor C.E. (1985): A solubility shift occurs during depletion-transformation of prolactin within the lactating rat pituitary. *Endocrinol.*, **111**:1086-1091.

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

Mena F., Clapp C., Aguayo D., Lorenson M. y Martínez de la Escalera G. (1989). Regulation of prolactin secretion by dopamine and Thyrotropin-releasing hormone in lactating rat adenohypophyses: Influence of intracellular age of the hormone. *Endocrinol.*, **125**: 1814-1820

Mena F, Hummelt G, Aguayo D, Clapp C, Martinez de la Escalera G and Morales T. (1992): Changes in molecular variants during in vitro transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinol.*, **130**:3365-3377.

Mena F, Montiel J.L, Aguayo D, Morales Mt, Aramburo C. (1993): Recent findings on prolactin transformation by the lactating rat pituitary. *Endocrinol. regul.* **21**:101-109

Mena F, Aguayo D, Quintanar-Stephano A, Perera G, Viguera M, Morales M.T. (1995): Studies on the relative importance of the neurointermediate lobe (NIL) of the pituitary gland upon prolactin (PRL) secretion in the lactating rat. *77th Ann Meet Endoc Soc. Abst* P1-16.

Mitra J. (1980): A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I biosynthesis, characterization and regulation control. *Biochemical and biophysical research Communications* **95**:1750-1759

Moshe Laudon, Daniel A, Grossman. and Nira Ben-Jonathan. (1990): Prolactin-releasing factor: cellular origin in the intermediate lobe of the pituitary. *Endocrinol.*, **126**:3185-3192

- Murai I, Ben Jonathan.(1986):Posterior lobectomy:prolonged elevation of plasma prolactin and interruption of ciclicity.Neuroendocrinol. 43:453-458**
- Murai I,Nira Ben Jonhatan. ( 1987): Posterior Pituitary lobectomy abolishes the suckling induced rise in prolactin (PRL) : Evidence for a PRL-releasing factor in the posterior pituitary. Endocrinol., 121:205-211.**
- Murai I, Seymour Reichlin and Nira Ben-Jonathan. (1989): The peak phase of the proestrous prolactin surge is blocked by either posterior pituitary lobectomy or antisera to vasoactive intestinal peptide.Endocrinol., 124:1050-1055**
- Murai I., Nira Ben Jonathan. (1990): Acute stimulation of prolactin release by estradiol:mediation by the posterior pituitary. Endocrinol., 126:3179-3184**
- Nagy G.M, Frawley L.S.(1990):Suckling increases the proportion of mamotropes responsive to various prolactin-releasing stimuli. Endocrinol., 127:2079-2984.**
- Nagy G.M, Boockfor F.R, Frawley L.S.(1991): The suckling stimulus increases the responsiveness of mamotropes lacated exclusively within the central region of the adenohipophysis. Endocrinol.,128:761-764**
- Neill J.D. (1974): Prolactin:Its secretion and control.En Handbook of phisiology.Eds.E.Knobil,W.H. Sawyer. Physiology . Soc. Whashington. Vol 4 Part 2 American physiological society. Washington D:C. 469-488.**
- Neill J.D.(1980):Neuroendocrine regulation of prolactin secretion En: frontiers in neuroendocrinol.Vol 6:129-141**
- Neill J:D:(1994): Prolactin secretion and it's control. The physiology of reproduction. second edition Raven Press. ltd. New York**
- Nicoll C.S, Parson J.A,Fiorindo RP, Nichols C.W. (1969): Estimation of prolactin and growth hormone levels by polyacrilamide disc electrophoresis. J.End ocrinol. 45:183-196**
- Nicoll,C.S. and Bern H.A. ( 1971): On the actions of prolactin among the vertebrates is there a common denomitador en Ciba Foundation symposium on lactogenic hormones (Wolstenholme, G.E.W. y A.Knight, eds.) Churchill Livingstone. london, p.p. 299-324.**
- Nicoll C.S. (1974): Physiological actions of prolactin. En:Handbook of phisiology . Vol IV Part 2. American Physiological Society. Washington p.p253-292**
- NicollC.S, White B.A and F.C Leung. (1980): Evolution of prolactin. Its functions, and Its receptors. En Central and Peripheral regulation of prolactin Function(MacLeod,R.M. y Scapagnini, U, Eds) Raven Press. New york, p.p. 11-25.**

Oliver C, Mical RS, Porter J.C. (1982 ):Hypotalamic pituitary vasculature:Evidence of retrograde blood flow in the pituitary stalk. **Endocrinol.** **101**:598-604

Oetting W.S, Tuazon P.T, Traugh J.A., Walker A.M. (1986): Phosphorilation of prolactin. **J.Biol.Chem.**,**261**:1649-1652

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. (1980) Reporte técnico citado por:Cowie A.T.,Forsyth,I.A. y HART I.C. Introduction. En: F.Gross, A.Labhart I.Mann y J Zander (Eds). hormonal control of lactation Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York Car 1 p.1

Perkins N.A,Westfall TC,PaulV.V,MacLeod R,Rogol AD.(1979): Effect of prolactin on dopamine synthesis in medial basal hypothalamus: Evidence for a short loop feedback. **Brain Res.** **160**:431-444

Papka R.F, Yu S.M, and Nikitovitch-Winer M.B. (1986): Use of immunoperoxidase and immunogold methods in studing prolactin secretion and application of immunogold labelling for pituitary hormones and neuropeptides. **Am. J Anat.**, **175**:289-306

Parlow A.F. and Shome B. (1976): Rat prolactin the entire linear aminoacid sequence. **Fed. Proc.** **35**:219

Porter T.E, Frawley L.S. (1992): neurointermediate lobe peptides recruit prolactin secreting cells exclusively within the central region of the adenohypophysis.**Endocrinol.****131**:2649-2652

Powers C.A. Hatala M.A. (1990): Prolactin proteolisis by glandular Kallikrein: in vitro reaction requeriments and cleavage sites, and detection of processed prolactin *in vivo*. **Endocrinol.** **127**:1916-1927

Rotchild. (1965):**Vitamins Hormones.** **23**: 209

Saavedra Jm,Palkovits M, Kizer J.S,Brownstein M,Zivin J.A.(1975):Distribution of biogenic amines and related enzymes in the rat pituitary gland. **J.Neurochem.** **25**:257-260

Salas A. (1982): Aspectos bioquimicos y coorrelación estructura-función de la hGh,HPRL y hACTH. En nuevos conceptos sobre Fisiología y patología hipotálamo hipofisiaria. **Conacyt. México.** **39**-57.

Samson WK, Mccann S.M.(1979): Radioimmunologic localization of vasoactive intestinal polypeptide in hypothalamic and extrahypothalamic sites inthe rat brain. **Neurosci. Lett.** **12**:265-269

Samson W.K,Lumpin M.D,Mc Cann S.M. (1986): Evidence for a a physiological

role for oxytocin in the control of prolactin secretion. **Endocrinol.**, **119**:554-559

Sinha N. (1986): Structural variants of prolactin. **Biomedical division.**, 399-412

Sinha N. (1992): Prolactin variants. **Trends. Endocrinol. metab.**, **3**:100-106

Smith M.S.A, Mclean B.K. and JD Neill. (1976): termination at midpregnancy of two daily surges of plasma prolactin initiated by mating in the rat. **Endocrinol.** **98**:696-701

Swearingen K.C, Martinez de la Escalera G, Weiner R.I. (1990): Episodic prolactin release after removal of dopamine inhibition *in vitro*. **Biol. Estud. Med. Biol.**, **38**:43-48

Taleisnik S, Orias R. (1966): Pituitary hormone ( $\alpha$ MSH) after suckling stimulus. **Endocrinol.** **78**:522-526

Tweedle C.D, Hatton G.I. (1980): Glial cell enclosure of neurosecretory ending in the in the neurohypophysis of the rat. **Brain Res.**, **192**:555

Urban J.L. (1984): Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. **Ann. Rev. Physiol.**, **46**:33-42.

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