

03086

13

29



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

Unidad Académica de Ciclos Profesional y Posgrado del
Colegio de Ciencias y Humanidades
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA
UNAM

**PRODUCCION Y SECRECION DE PROLACTINAS
POR EL SISTEMA HIPOTALAMO
NEUROHIPOFISIARIO**

T E S I S

que para obtener el grado de
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS

Presenta la

M. en C. MARIA DE LA LUZ TORNER AGUILAR

Asesora: Dra. Carmen Clapp

Campus UNAM-Juriquilla

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

RESUMEN

El sistema hipotálamo neurohipofisiario (SHN) está constituido por las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) del hipotálamo y sus proyecciones axonales hacia la neurohipófisis. Este sistema produce principalmente vasopresina y oxitocina, las que son transportadas a las terminales nerviosas en la neurohipófisis de donde son secretadas hacia la circulación sistémica para controlar el balance corporal de líquidos y la contractilidad muscular, entre otras funciones. Además de estas hormonas, se ha demostrado que el SHN sintetiza otros péptidos neuroactivos como dinorfina, galanina, angiotensina II, factor liberador de corticotropina, péptido intestinal vasoactivo, encefalinas, etc. No es claro el significado funcional de estos péptidos en el SHN y se han propuesto interacciones locales sobre la secreción de las hormonas neurohipofisiarias a nivel de la neurohipófisis o bien, posibles efectos a distancia sobre tejidos periféricos.

Recientemente se ha observado que el SHN podría ser productor de las hormonas denominadas prolactinas (PRLs). La familia de las PRLs es considerada una de las más versátiles del organismo, ya que regula tanto funciones reproductivas, inmunológicas y osmorreguladoras, como procesos de crecimiento y diferenciación celular. Si bien esta familia hormonal se produce principalmente en la adenohipófisis, se ha documentado recientemente la síntesis y secreción de prolactinas por diversos tejidos periféricos así como por células del sistema inmune y del sistema nervioso central. Respecto a este último, recientemente se detectó la presencia del ARN mensajero de PRL así como la presencia de antígenos tipo PRL en el SHN. Estos hallazgos nos permitieron proponer como hipótesis que el SHN es un tejido productor y secretor de PRLs.

En este trabajo abordamos la hipótesis anterior mediante la caracterización del ARN mensajero de PRL y los antígenos tipo PRL presentes en el SHN. Encontramos que el ARN mensajero de PRL se expresa tanto en el SON como en el PVN y que dicha expresión muestra diferencias a lo largo del ciclo estral. Observamos que los antígenos tipo PRL se asocian con proteínas de 23, 25 y 14 kDa, las cuales son detectadas tanto por anticuerpos anti PRL policlonales como monoclonales.

Por otra parte, en apoyo a la producción local de PRLs por el SHN encontramos que la hipofisectomía no interfiere con la detección inmunocitoquímica de PRLs en dicho sistema y sugiere que la presencia de dichas PRLs es independiente de las PRLs producidas y secretadas por la hipófisis anterior.

En relación con la posible secreción de prolactinas por el SHN observamos la presencia de PRLs inmunorreactivas en el medio de incubación de neurohipófisis y de explantes hipotálamo-neurohipofisiarios *in vitro*. Encontramos que la secreción de dichas PRLs es dependiente de calcio en el medio de incubación y se incrementa en respuesta a concentraciones despolarizantes de potasio. Finalmente detectamos la presencia de PRLs similares a las neurohipofisiarias en el suero de la rata. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el sistema hipotálamo neurohipofisiario puede constituir una fuente fisiológica de producción y secreción de PRLs.

SUMMARY

Magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei are the main components of the hypothalamo neurohypophyseal system (HNS). These neurons send their axonal projections down to the neurohypophysis to secrete their main products, vasopressin and oxytocin. These two hormones are secreted into the systemic circulation to exert different functions, such as the control of water and electrolyte balance and muscle contractility, respectively. In addition, the HNS synthesizes other neuroactive peptides like dynorphin, galanin, angiotensin II, corticotrophin releasing hormone (CRH), vasoactive intestinal peptide (VIP), enkephalins, etc. Although their physiological role in the HNS is unclear, they are proposed to locally interact as modulators of the secretion of the main neurohypophyseal hormones at the neurohypophyseal level, or to exert distant actions on peripheral tissues.

It has been suggested recently that the HNS could be a new source of production of prolactin hormones (PRLs). This versatile family exerts a great array of biological functions, including reproductive, immunologic and osmotic regulative actions as well as promoting cellular growth and differentiation. The main production site of this hormone family is the adenohypophysis, but several extrahypophyseal sites have been documented, including the central nervous system. Moreover, the PRL messenger RNA and the occurrence of prolactin antigens have been recently detected in magnocellular neurones of the HNS and the neurohypophysis. These findings led us to hypothesize that the HNS could produce and secrete PRLs, constituting a novel production site.

In this study we tested the former hypothesis through the characterization of the production of PRL messenger RNA and PRL antigens present in the HNS. We found that PRL messenger RNA is expressed both in the SON and PVN, and that this expression shows differences through the estrous cycle. We also showed that PRL antigens in the HNS are associated with proteins of 25, 23 and 14 kDa, which were detected by several polyclonal and monoclonal PRL antibodies.

In support to the local production of PRLs by the HNS we showed that hypophysectomy does not interfere with the immunocytochemical detection of PRLs in this system and suggests that hypothalamic neurohypophyseal production of prolactins is independent from the ones produced and secreted by the adenohypophysis.

In concordance with the possible secretion of prolactins by the HNS we found the presence of immunoreactive prolactins in the incubation media of isolated neurohypophyses and of hypothalamo neurohypophyseal explants. Secretion of neurohypophyseal prolactins to the incubation media is calcium dependent, and is increased in response to depolarizing potassium concentrations. Finally, we detected in rat serum the occurrence of a 14 kDa PRL-like protein similar in size to that found in the HNS. These results are consistent with our hypothesis that proposes the HNS as a novel source of synthesis and secretion of prolactins.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp Jiménez en las instalaciones del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Fisiología, durante los años 1994-1996. La conclusión del mismo y realización de la tesis (1997) se llevaron a cabo en el Centro de Neurobiología de la UNAM, Campus UNAM-UAQ-Juriquilla.

Este estudio constituye la parte experimental requerida por el Programa de Doctorado en Ciencias Fisiológicas de la Unidad de Ciclos Profesional y de Posgrado del Colegio de Ciencias y Humanidades de la U.N.A.M.

El jurado calificador quedó integrado por las siguientes personas:

*Dra. Magda Giordano
Dr. Alfonso Cárabez
Dra. Carmen Clapp
Dr. Mauricio Díaz Muñoz
Dr. Alejandro Zentella
Dra. Carmen Aceves
Dr. Ed Heimer*

AGRADECIMIENTOS:

Deseo expresar mi agradecimiento y profunda admiración a la Dra. Carmen Clapp, por su invaluable dirección y apoyo durante la realización de este y otros trabajos. Su espíritu de dedicación y pasión por la ciencia es un claro ejemplo a seguir por quienes compartimos con ella las labores diarias en su laboratorio.

Deseo agradecer también al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera, quien en cierta medida ha constituido para mí un segundo tutor, por su enseñanza, así como sus críticas y sugerencias durante las diferentes fases del presente trabajo.

Mi gratitud y reconocimiento al Dr. Andrés Quintanar, por su valiosísima participación experimental y crítica en algunas de las etapas del presente estudio. En particular, la donación de animales hipofisectomizados y la realización de las disecciones de los explantes hipotálamo neurohipofisarios.

Agradezco también a los doctores Alejandro Zentella y Carlos Arámburo, cotutores del proyecto, por sus comentarios, críticas y sugerencias para la mejor realización y desarrollo del mismo.

Deseo hacer patente mi agradecimiento también al apreciable jurado que tuvo a bien revisar el presente trabajo de tesis y sugerir las modificaciones pertinentes para su mejor comprensión y presentación: Dra. Magda Giordano, Dra. Carmen Aceves, Dr. Mauricio Díaz Muñoz, Dr. Ed Heimer, y Dr. Alfonso Cárabez. A todos ellos, gracias por sus valiosos comentarios y sugerencias.

DEDICATORIAS:

A toda mi familia, especialmente a mi madre y a la memoria de mi padre.

A todos mis amigos, compañeros del laboratorio o de la vida extramuros que de una forma u otra me apoyaron en los tiempos difíciles y también compartieron conmigo los tiempos felices y la excitación y alegría por los resultados positivos de la investigación. Larga es la lista y diverso su país de procedencia. Para todos ellos, GRACIAS.

A todos aquellos que luchan por conseguir sus metas.

INDICE

<i>Resumen</i>	1
<i>Summary</i>	2
1. INTRODUCCION	3
2. ANTECEDENTES GENERALES	6
I. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PROLACTINA	6
II. ESTRUCTURA DE LA PROLACTINA	8
1. <i>Gen</i>	8
2. <i>Estructura química de la proteína</i>	9
3. <i>Variantes proteolíticamente modificadas de la PRL con actividad biológica</i>	12
3.1. <i>Prolactina cortada</i>	12
3.1.1. <i>Actividad biológica</i>	13
3.2. <i>Prolactina 16K</i>	14
3.2.1. <i>Actividad antiangiogénica</i>	16
3. ANTECEDENTES INMEDIATOS	18
I. PRODUCCION DE PROLACTINA POR EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	18
1. <i>Detección de prolactinas centrales</i>	18
2. <i>Detección de ARN mensajero de PRL en el SNC</i>	19
3. <i>El sistema nervioso central como órgano blanco de PRL</i>	20
II. PRODUCCION DE PROLACTINAS POR EL SISTEMA HIPOTALAMO NEUROHIPOFISIARIO	21
1. <i>El sistema Hipotálamo Neurohipofisario</i>	21
2. <i>Prolactinas Neurohipofisarias</i>	24

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
1. <i>Hipótesis</i>	27
2. <i>Objetivo</i>	27
4. METODOLOGIA	29
I. <i>MATERIAL BIOLÓGICO</i>	29
II. <i>MÉTODOS</i>	30
5. RESULTADOS Y DISCUSION	36
6. DISCUSION GENERAL	61
7. BIBLIOGRAFIA	71
8. PUBLICACIONES	83

RESUMEN

El sistema hipotálamo neurohipofisiario (SHN) está constituido por las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON) del hipotálamo y sus proyecciones axonales hacia la neurohipófisis. Este sistema produce principalmente vasopresina y oxitocina, las que son transportadas a las terminales nerviosas en la neurohipófisis de donde son secretadas hacia la circulación sistémica para controlar el balance corporal de líquidos y la contractilidad muscular, entre otras funciones. Además de estas hormonas, se ha demostrado que el SHN sintetiza otros péptidos neuroactivos como dinorfina, galanina, angiotensina II, factor liberador de corticotropina, péptido intestinal vasoactivo, encefalinas, etc. No es claro el significado funcional de estos péptidos en el SHN y se han propuesto interacciones locales sobre la secreción de las hormonas neurohipofisiarias a nivel de la neurohipófisis o bien, posibles efectos a distancia sobre tejidos periféricos.

Recientemente se ha observado que el SHN podría ser productor de las hormonas denominadas prolactinas (PRLs). La familia de las PRLs es considerada una de las más versátiles del organismo, ya que regula tanto funciones reproductivas, inmunológicas y osmorreguladoras, como procesos de crecimiento y diferenciación celular. Si bien esta familia hormonal se produce principalmente en la adenohipófisis, se ha documentado recientemente la síntesis y secreción de prolactinas por diversos tejidos periféricos así como por células del sistema inmune y del sistema nervioso central. Respecto a este último, recientemente se detectó la presencia del ARN mensajero de PRL así como la presencia de antígenos tipo PRL en el SHN. Estos hallazgos nos permitieron proponer como hipótesis que el SHN es un tejido productor y secretor de PRLs.

En este trabajo abordamos la hipótesis anterior mediante la caracterización del ARN mensajero de PRL y los antígenos tipo PRL presentes en el SHN. Encontramos que el ARN mensajero de PRL se expresa tanto en el SON como en el PVN y que dicha expresión muestra diferencias a lo largo del ciclo estral. Observamos que los antígenos tipo PRL se asocian con proteínas de 23, 25 y 14 kDa, las cuales son detectadas tanto por anticuerpos anti PRL policlonales como monoclonales.

Por otra parte, en apoyo a la producción local de PRLs por el SHN encontramos que la hipofisectomía no interfiere con la detección inmunocitoquímica de PRLs en dicho sistema y sugiere que la presencia de dichas PRLs es independiente de las PRLs producidas y secretadas por la hipófisis anterior.

En relación con la posible secreción de prolactinas por el SHN observamos la presencia de PRLs inmunorreactivas en el medio de incubación de neurohipófisis y de explantes hipotálamo-neurohipofisiarios *in vitro*. Encontramos que la secreción de dichas PRLs es dependiente de calcio en el medio de incubación y se incrementa en respuesta a concentraciones despolarizantes de potasio. Finalmente detectamos la presencia de PRLs similares a las neurohipofisiarias en el suero de la rata. Estos resultados apoyan la hipótesis de que el sistema hipotálamo neurohipofisiario puede constituir una fuente fisiológica de producción y secreción de PRLs.

SUMMARY

Magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei are the main components of the hypothalamo neurohypophyseal system (HNS). These neurons send their axonal projections down to the neurohypophysis to secrete their main products, vasopressin and oxytocin. These two hormones are secreted into the systemic circulation to exert different functions, such as the control of water and electrolyte balance and muscle contractility, respectively. In addition, the HNS synthesizes other neuroactive peptides like dynorphin, galanin, angiotensin II, corticotrophin releasing hormone (CRH), vasoactive intestinal peptide (VIP), enkephalins, etc. Although their physiological role in the HNS is unclear, they are proposed to locally interact as modulators of the secretion of the main neurohypophyseal hormones at the neurohypophyseal level, or to exert distant actions on peripheral tissues.

It has been suggested recently that the HNS could be a new source of production of prolactin hormones (PRLs). This versatile family exerts a great array of biological functions, including reproductive, immunologic and osmotic regulative actions as well as promoting cellular growth and differentiation. The main production site of this hormone family is the adenohypophysis, but several extrahypophyseal sites have been documented, including the central nervous system. Moreover, the PRL messenger RNA and the occurrence of prolactin antigens have been recently detected in magnocellular neurones of the HNS and the neurohypophysis. These findings led us to hypothesize that the HNS could produce and secrete PRLs, constituting a novel production site.

In this study we tested the former hypothesis through the characterization of the production of PRL messenger RNA and PRL antigens present in the HNS. We found that PRL messenger RNA is expressed both in the SON and PVN, and that this expression shows differences through the estrous cycle. We also showed that PRL antigens in the HNS are associated with proteins of 25, 23 and 14 kDa, which were detected by several polyclonal and monoclonal PRL antibodies.

In support to the local production of PRLs by the HNS we showed that hypophysectomy does not interfere with the immunocytochemical detection of PRLs in this system and suggests that hypothalamic neurohypophyseal production of prolactins is independent from the ones produced and secreted by the adenohypophysis.

In concordance with the possible secretion of prolactins by the HNS we found the presence of immunoreactive prolactins in the incubation media of isolated neurohypophyses and of hypothalamo neurohypophyseal explants. Secretion of neurohypophyseal prolactins to the incubation media is calcium dependent, and is increased in response to depolarizing potassium concentrations. Finally, we detected in rat serum the occurrence of a 14 kDa PRL-like protein similar in size to that found in the HNS. These results are consistent with our hypothesis that proposes the HNS as a novel source of synthesis and secretion of prolactins.

SUMMARY

Magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular (PVN) and supraoptic (SON) nuclei are the main components of the hypothalamo neurohypophyseal system (HNS). These neurons send their axonal projections down to the neurohypophysis to secrete their main products, vasopressin and oxytocin. These two hormones are secreted into the systemic circulation to exert different functions, such as the control of water and electrolyte balance and muscle contractility, respectively. In addition, the HNS synthesizes other neuroactive peptides like dynorphin, galanin, angiotensin II, corticotrophin releasing hormone (CRH), vasoactive intestinal peptide (VIP), enkephalins, etc. Although their physiological role in the HNS is unclear, they are proposed to locally interact as modulators of the secretion of the main neurohypophyseal hormones at the neurohypophyseal level, or to exert distant actions on peripheral tissues.

It has been suggested recently that the HNS could be a new source of production of prolactin hormones (PRLs). This versatile family exerts a great array of biological functions, including reproductive, immunologic and osmotic regulative actions as well as promoting cellular growth and differentiation. The main production site of this hormone family is the adenohypophysis, but several extrahypophyseal sites have been documented, including the central nervous system. Moreover, the PRL messenger RNA and the occurrence of prolactin antigens have been recently detected in magnocellular neurones of the HNS and the neurohypophysis. These findings led us to hypothesize that the HNS could produce and secrete PRLs, constituting a novel production site.

In this study we tested the former hypothesis through the characterization of the production of PRL messenger RNA and PRL antigens present in the HNS. We found that PRL messenger RNA is expressed both in the SON and PVN, and that this expression shows differences through the estrous cycle. We also showed that PRL antigens in the HNS are associated with proteins of 25, 23 and 14 kDa, which were detected by several polyclonal and monoclonal PRL antibodies.

In support to the local production of PRLs by the HNS we showed that hypophysectomy does not interfere with the immunocytochemical detection of PRLs in this system and suggests that hypothalamic neurohypophyseal production of prolactins is independent from the ones produced and secreted by the adenohypophysis.

In concordance with the possible secretion of prolactins by the HNS we found the presence of immunoreactive prolactins in the incubation media of isolated neurohypophyses and of hypothalamo neurohypophyseal explants. Secretion of neurohypophyseal prolactins to the incubation media is calcium dependent, and is increased in response to depolarizing potassium concentrations. Finally, we detected in rat serum the occurrence of a 14 kDa PRL-like protein similar in size to that found in the HNS. These results are consistent with our hypothesis that proposes the HNS as a novel source of synthesis and secretion of prolactins.

1. INTRODUCCION

Los organismos vivos han desarrollado la capacidad de mantener un medio interno relativamente constante conteniendo con los cambios derivados de los requerimientos de su metabolismo, y las alteraciones del medio ambiente. Esta estabilidad está determinada por una serie de mecanismos de integración funcional en los que interaccionan activamente diferentes tipos de mensajeros químicos, entre ellos las hormonas.

Hasta hace algunos años, se postulaba que las hormonas eran producidas como entidades químicas únicas, las cuales eran sintetizadas en forma exclusiva por glándulas endócrinas y vertidas al torrente sanguíneo para ejercer sus acciones biológicas sobre órganos blanco distantes. Actualmente estos conceptos se han visto modificados al conocerse que en su mayoría las hormonas constituyen familias de variantes moleculares estructuralmente relacionadas, que se producen tanto por células endócrinas como por otros tipos celulares. De tal forma que estos mensajeros químicos pueden ejercer efectos a distancia vía la circulación sistémica (efectos endócrinos) pero también efectos locales ya sea sobre la misma célula que las produce (efectos autócrinos), como sobre otros tipos celulares (efectos parácrinos).

Así, es común que un mensajero químico ejerza una gran diversidad de efectos al ser producido por y afectar la función de diversas células blanco. Incluso la diversidad de los efectos hormonales parece estar influida por diferencias estructurales entre los miembros de una familia hormonal, y se ha propuesto que estas diferencias podrían determinar la activación de receptores específicos encargados de mediar ciertas funciones y no otras, por dichas variantes hormonales.

Un ejemplo representativo de lo anterior lo constituye la familia de las prolactinas (PRLs). Esta es una familia de proteínas estructuralmente relacionadas generadas a partir de un mismo gen y producidas por diversos tipos celulares que conllevan una gran versatilidad funcional. Las PRLs existen en todos los vertebrados

estudiados, y se conoce que ejercen más de 100 funciones biológicas distintas (Nicoll, 1974 y Bern et al., 1968). Sus acciones incluyen efectos osmorreguladores, regulación de la reproducción y de la respuesta inmune, de la proliferación y la diferenciación celular. Si bien inicialmente se asociaban todos estos efectos a una sola entidad química, hoy es sabido que existe una amplia gama de proteínas derivadas del gen de la prolactina que podrían participar en la mediación de su diversidad funcional. El principal sitio de producción de las PRLs descrito inicialmente es la adenohipófisis, sin embargo a la fecha se han identificado diversas fuentes extrahipofisarias de producción de PRLs, tales como la decidua uterina, el sistema inmune y el sistema nervioso central. Estas fuentes producen y secretan diversos miembros de esta familia hormonal.

Las evidencias en torno a la producción de PRL por el sistema nervioso central son numerosas. Diversos estudios indican la presencia de proteínas con propiedades químicas, biológicas e inmunológicas de PRL, así como la presencia del ARN mensajero de PRL en tejido cerebral. Por otra parte es claro que el sistema nervioso central (SNC) constituye un órgano blanco de la PRL. Entre los efectos centrales de esta hormona sobresalen la facilitación de la conducta reproductiva y la conducta maternal, así como el control de la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). Si bien la heterogeneidad molecular de la PRL se encuentra ampliamente representada en el SNC, se desconoce la naturaleza exacta de las PRLs cerebrales que ejercen estos efectos centrales.

Estudios recientes han permitido proponer al sistema hipotálamo neurohipofisario (SHN) como una nueva región cerebral capaz de producir prolactinas. El SHN comprende a las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular (PV) y supraóptico (SO), las cuales proyectan sus axones a través de la zona interna de la eminencia media para terminar en una interfase neurohemal en la neurohipófisis. Este es un sistema neuroendócrino cuyas principales hormonas, vasopresina y oxitocina, se vierten a la circulación sistémica y ejercen un control sobre el equilibrio hídrico y la contractilidad muscular, respectivamente. Asimismo, el

SHN es productor y secretor, si bien en menor proporción, de otros péptidos neuroactivos tales como dinorfina, galanina, angiotensina II, neuropéptido Y, sustancia P, etc.

Mediante el uso de anticuerpos dirigidos contra un fragmento amino-terminal de la PRL y técnicas de inmunocitoquímica se localizaron proteínas con inmunorreactividad del tipo de PRL en el sistema hipotálamo neurohipofisiario. Asimismo y en apoyo a estos hallazgos se detectó la presencia del ARN mensajero para PRL en núcleos paraventriculares aislados (Clapp et al. 1994). Estos estudios permitieron proponer la hipótesis de que las PRLs podrían formar parte de los péptidos bioactivos producidos y secretados por este sistema neuroendócrino.

En consecuencia, el motivo de este trabajo de tesis fue el de caracterizar la producción y secreción de prolactinas por el sistema hipotálamo neurohipofisiario y analizar la posibilidad de que este sistema pudiese constituir una fuente adicional de prolactinas vertidas a la circulación. A continuación, revisaremos algunos antecedentes generales pertinentes a este análisis que sustentan nuestra hipótesis de trabajo.

2. ANTECEDENTES GENERALES

I. FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA PROLACTINA

Las prolactinas afectan un gran número de procesos fisiológicos. Dentro de sus acciones sobre la esfera reproductiva destaca la estimulación del crecimiento, diferenciación y actividad secretora de leche de la glándula mamaria durante el embarazo y la lactancia. Asimismo la PRL estimula la función gonadal tanto en machos como en hembras. En el macho, la prolactina incrementa y mantiene el número de receptores a la hormona luteinizante (LH) en las células de Leydig, y en consecuencia sostiene la secreción de testosterona por el testículo (Aragona et al., 1977). En el ovario la PRL contribuye al mantenimiento del cuerpo lúteo estimulando su proliferación, y regulando la cantidad de receptores a LH y consecuentemente la secreción de progesterona (Richards et al., 1976 y Albarracin et al., 1991). Adicionalmente la PRL ejerce efectos conductuales que influyen sobre el proceso reproductivo. En general se considera que la PRL inhibe la conducta sexual (Drago, 1984) y estimula la conducta maternal en diversas especies de vertebrados (Bridges, 1985).

Quizá el papel mejor estudiado de la prolactina es el que ejerce sobre la glándula mamaria. La prolactina es parte del complejo hormonal que determina el inicio y mantenimiento de la lactancia. Esta actúa en conjunto con los estrógenos, la progesterona, y la hormona de crecimiento (GH) para estimular el crecimiento y diferenciación del tejido lóbulo alveolar mamario (Clapp et al., 1987). La PRL promueve la síntesis y secreción de los componentes específicos (caseína, lactosa, lípidos) y no específicos (agua, iones) de la leche, en el tejido epitelial mamario (Shiu et al. 1980). Asimismo, la PRL mantiene las diferencias entre la composición iónica de la leche y las del plasma mediante la regulación del transporte activo de iones en la membrana basal del epitelio mamario (Shiu et al., 1980).

Las acciones osmorreguladoras de la PRL se manifiestan también sobre el epitelio renal y resultan esenciales para la vida de ciertos vertebrados acuáticos

(Nicoll, 1974). Por ejemplo durante la migración de los peces del agua salada hacia el agua dulce, la PRL contribuye a mantener el balance hídrico y electrolítico estimulando la retención de Na^+ en los fluidos corporales y evitando consecuentemente la disolución del medio interno (Nicoll, 1980). En los humanos, existen evidencias sobre la presencia de receptores de alta afinidad a PRL en el riñón, principalmente en el epitelio tubular proximal (Mountjoy et al., 1980). Asimismo se ha sugerido que la PRL regula la composición del líquido amniótico fetal (Tyson, 1982), y la absorción de fluidos por el intestino delgado (Mainoya et al., 1974 y Dusanter-Fourt et al., 1992).

Otra de las esferas de acción de la PRL que ha recibido atención en los últimos años es su participación como una citocina capaz de mediar la comunicación funcional entre las células del sistema inmune. Los primeros estudios que apuntaron hacia efectos inmunorreguladores de la PRL mostraron que la hipofisectomía e inmunoneutralización de PRL resultan en anemia, reducción de la hipersensibilidad retardada y muerte (Nagy et al., 1991). Actualmente existen numerosas evidencias sobre la producción de PRL por diversas células del sistema inmune. Timocitos y linfocitos T, y en menor proporción los B, expresan el gen de la prolactina e incluso muchas de las variantes moleculares de esta hormona (Montgomery et al., 1990). La PRL interacciona con otras citocinas funcionando como un coactivador. En linfocitos T induce la expresión del factor activador de interferón-1 (IRF-1), la secreción de interleucina 2 (IL-2) y la expresión de sus receptores (Clevenger et al., 1991). Asimismo, la PRL potencia la proliferación de células NK (natural killer cells) (Matera et al., 1992), e incrementa la producción de interferón gama estimulada por mitógenos en células mononucleares humanas (Cesario et al., 1994). Por otra parte, la PRL estimula la producción de la hormona producida por el timo, la timulina, e interviene en el desarrollo y maduración de las células inmunes en el timo y órganos linfoides periféricos (Dardenne et al., 1989).

Si bien se han descrito un sinnúmero de acciones de las prolactinas, el espectro completo de sus acciones parece ser aún desconocido. Como ejemplo el

análisis y caracterización recientes de algunas variantes moleculares de prolactina que resultan de su procesamiento proteolítico han mostrado la participación de esta familia hormonal en efectos nuevos tales como la regulación del crecimiento en la adenohipófisis y la formación de vasos sanguíneos. Así, es posible que el estudio de las diversas variantes moleculares de la PRL, (muchas aún no purificadas) contribuya a ampliar aún más la gama de acciones de esta familia hormonal.

II. ESTRUCTURA DE LA PROLACTINA

1. Gen

El gen de la PRL existe como una copia única en las diversas especies estudiadas tales como la rata, el bovino y el humano (Gubbins et al., 1980). En general, la estructura del gen de la prolactina abarca aproximadamente 10 kilobases (kb), consistiendo de 5 exones separados por 4 grandes intrones (Gubbins et al., 1980). (Fig. 1). El ARN mensajero maduro de PRL posee 1 kb de longitud y codifica para una proteína de 227 aminoácidos (aa) que incluye un péptido señal de 28 aa, el cual es escindido posteriormente.

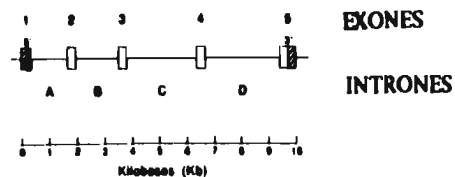


Fig. 1 . Estructura del gen de prolactina de rata.

Diagrama esquemático del gen de la prolactina, mostrando cuatro intrones y cinco exones (barras blancas). Las barras rayadas muestran el ADN que codifica para ARN que no es traducido.

Se ha propuesto que los exones pudieran codificar regiones peptídicas responsables de actividades biológicas discretas. Por ejemplo, estudios de mutagénesis dirigida mostraron que la eliminación del exón III conlleva a una disminución marcada de la capacidad de la prolactina de unirse a sus receptores (Nicoll et al., 1986). Asimismo se han localizado sitios antigénicos en el exón IV y el exón V que parecen conferir estabilidad conformacional a la hormona (Shull et al., 1986).

2. Estructura Química de la proteína

La forma molecular predominante de las prolactinas la constituye una proteína de 23,000 daltones, la que consiste en una cadena polipeptídica de 197-199 aminoácidos (aa) según la especie, denominada PRL 23K. En su forma nativa, la PRL 23K contiene 6 residuos de cisteína, los que se unen entre sí para formar 3 puentes disulfuro (-S-S-): uno localizado cerca del extremo amino-terminal, uno en el extremo carboxilo-terminal, y otro en la región intermedia, los cuales dan lugar a dos asas pequeñas: una amino y otra carboxilo terminal, y a un asa mayor intermedia. (Parlow et al., 1976, y Cooke et al., 1980), (Fig. 2).

Si bien la molécula de 23 kDa es la forma molecular predominante de la PRL, se ha documentado la presencia de formas moleculares estructuralmente relacionadas menos abundantes (Asawaroengchai et al., 1978, Shah et al., 1989). Dado que existe un solo gen para PRL, las variantes estructurales podrían originarse del procesamiento alternativo del ARNm y mediante modificaciones postraduccionales (Sinha, 1992). Si bien algunas evidencias indican la existencia de transcritos de menor tamaño que apoyan el procesamiento alternativo del ARNm de PRL (Emanuele et al., 1992 y Clapp et al., enviado a publicación), la gran mayoría de las formas moleculares de PRL son resultado de modificaciones postraduccionales (Sinha, 1995 y Oetting et al., 1989). Entre estas, se han documentado hasta ahora variantes proteolíticamente modificadas, glicosiladas, desamidadas, polímeros por puentes disulfuro, y formas

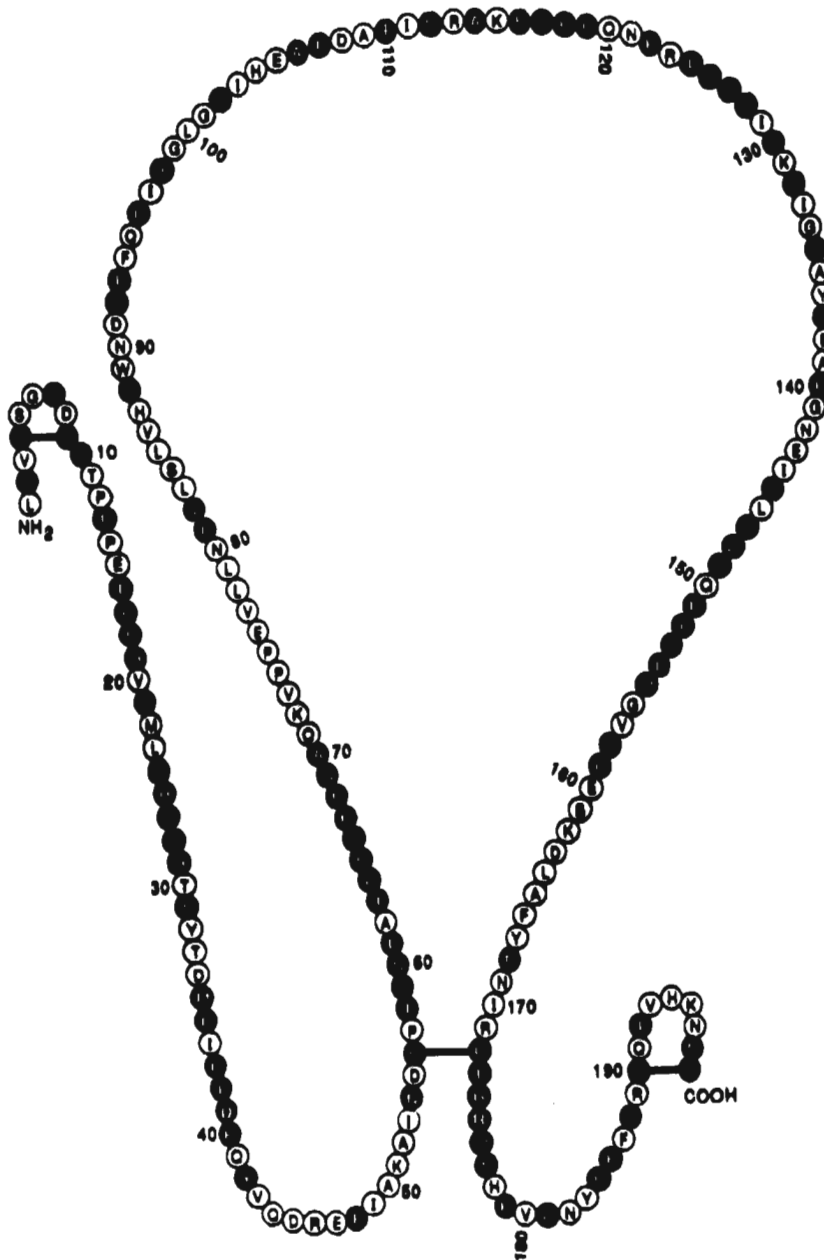


Fig. 2. Estructura de la prolactina de rata. Secuencia de aminoácidos (aa) de la prolactina adenohipofisiaria de rata. Los aa se abrevian de acuerdo al código alfabético: A, alanina; C, cisteína; D, ácido aspártico, E ácido glutámico; F, fenilalanina; G, glicina; H, histidina; I, isoleucina; K, lisina; L, leucina; M, metionina; N, asparagina; P, prolina; Q, glutamina; R, arginina; S, serina; T, treonina; V, valina; W, triptofano; Y, tirosina. Se muestran en círculos negros los aa conservados en las especies de rata, ratón, cerdo, bovino, y humano.

fosforiladas (Sinha, 1995). (Fig. 3). La heterogeneidad molecular de la PRL se ha documentado en varios de sus tejidos productores y en la circulación (Wallis et al., 1980; Meuris et al., 1983; Sinha et al., 1985; Shah et al., 1989; Smith et al., 1990 y Sinha, 1995). Muchas de estas variantes no han sido purificadas, y se desconoce su significado fisiológico, sin embargo existen algunos ejemplos que apoyan su relevancia funcional. Entre estos, algunos de los productos de la proteólisis de la prolactina parecen tener relevancia funcional.

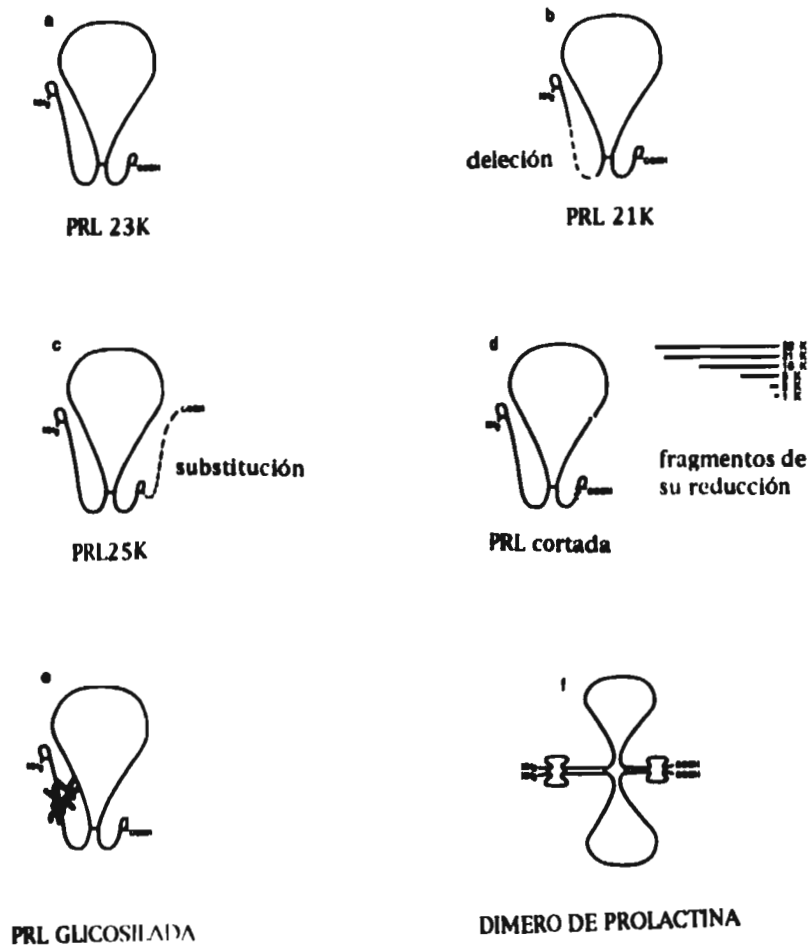


Fig. 3. Variantes moleculares de prolactina. Diagrama esquemático mostrando algunas de las modificaciones estructurales observadas o propuestas en la molécula de la prolactina.

3. Variantes proteolíticamente modificadas de Prolactina con actividad biológica

3.1. Prolactina Cortada.

Uno de los procesamientos postraduccionales que han mostrado tener consecuencias sobre la actividad biológica de la PRL es la proteólisis. El corte del asa mayor de la PRL entre los aminoácidos 145 y 146 mediante enzimas proteolíticas ácidas ocasiona que la molécula se transforme en dos cadenas polipeptídicas de 16 y 7 kDa unidas entre sí mediante un enlace disulfuro (Fig. 4). Esta variante molecular ha sido denominada como PRL cortada (PRLc) y fue descrita inicialmente por Mitra hacia 1980 (Mitra, 1980a) mediante el análisis triptico de las prolactinas marcadas metabólicamente con aminoácidos radiactivos en adenohipófisis (AH) en cultivo.

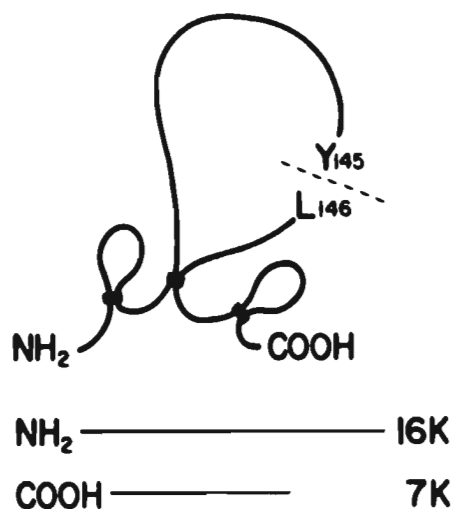


Fig. 4. Prolactina cortada. Esquema mostrando la estructura de la prolactina cortada. El sitio de corte se representa con una línea punteada y ocurre entre la tirosina (Y) 145 y la leucina (L) 146 presentes en el asa mayor. En la porción inferior de la figura se esquematizan los fragmentos de 16 y 7 kDa de peso molecular (16K y 7K) que resultan de la reducción de la PRL cortada.

Posteriormente se demostró que el corte proteolítico de la PRL ocurre no sólo en la adenohipófisis, sino también en diferentes órganos blanco, tales como la próstata, el hígado y la glándula mamaria, entre otros (Compton et al., 1984 y Wong et al., 1986). En este último tejido la actividad de corte varía de acuerdo al estado fisiológico: es mayor en ratas embarazadas que en ratas ciclantes y menor aún en ratas lactantes, lo que sugiere que la generación de formas cortadas de PRL podría asociarse diferencialmente a las diferentes fases del ciclo reproductor (Clapp, 1987).

Por otra parte, se ha propuesto que el corte de la PRL pudiera ocurrir durante el proceso de secreción de la hormona por la adenohipófisis y demás tejidos productores como durante su internalización por sus órganos blanco. Por ejemplo, se ha observado que la proteólisis que genera a la PRL cortada es máxima a pH ácido (3.4 - 5.5) coincidente con el rango de pH contenido en vesículas y lisosomas (Clapp 1987). Un candidato para efectuar el corte proteolítico de la PRL pudiera ser la Catepsina-D (Baldocchi et al. 1992), una proteasa de aspartato, dado que se observó que esta enzima es capaz de escindir a la prolactina generando un fragmento de 16 kDa, y asimismo es activa a un pH ácido (Baldocchi et al. 1992). Sin embargo otros estudios sugieren la participación de proteasas de serina y metalo-proteasas (Wong et al., 1986).

Diversas evidencias han confirmado la presencia de la PRL cortada en la adenohipófisis y en la circulación de la rata (Mittra I, 1980a, Torner et al., 1991), el ratón (Sinha et al., 1984) y el humano (Sinha et al., 1985). La PRL cortada proveniente de cultivos de células adenohipofisiarias, representa cerca del 0.6 -1% de la PRL total secretada por los lactotopos (Andries et al., 1992).

3. 1.1 Actividad biológica

La PRL cortada posee la misma potencia mitogénica que la PRL integra de 23 kDa sobre el epitelio mamario, las células derivadas del linfoma Nb2 y el epitelio del buche del pichón (Clapp et al., 1988). Esta potencia biológica se correlaciona con una afinidad de unión a los receptores de PRL similar a la de la PRL 23K intacta

(Clapp, 1987). Por otra parte, la actividad inmunológica de la PRL cortada se reduce en un 55% (Clapp et al., 1988) lo que indica que el corte de la molécula altera su reconocimiento por los anticuerpos anti-PRL. Sin embargo, lo más interesante es el hecho de que el corte proteolítico parece conferirle a la PRL cortada características funcionales únicas, ausentes en la molécula hormonal intacta. La PRL cortada estimula la proliferación de gonadotropos y tirotropos en cultivo. Estos efectos no fueron evocados por la prolactina intacta y permitieron proponer que la PRL cortada pudiera actuar como un factor local regulador del crecimiento adenohipofisario (Andries et al., 1992). Adicionalmente el significado funcional de la PRL cortada parece residir en su carácter de precursor de fragmentos de PRL con propiedades funcionales únicas, en particular el fragmento amino terminal de 16 kDa de la prolactina, o PRL 16K.

3.2. Prolactina 16K.

Mittra, hacia 1980, describió por primera vez la forma de PRL cortada y uno de los fragmentos producto de su reducción, la PRL 16K. En sus estudios, la administración en las glándulas mamarias de una preparación semi pura del fragmento de 16 kDa estimuló de forma significativa su proliferación celular. En contraposición, la PRL intacta no tuvo efecto. Mittra postuló que la PRL 16K podría ser la forma molecular de PRL responsable de estimular la división celular en el tejido mamario (Mittra, 1980a,b).

Evidencias posteriores confirmaron la presencia de la PRL 16K en adenohipófisis de ratas en diferentes estados fisiológicos y su secreción al medio de cultivo de células adenohipofisarias. Sus niveles detectados fueron menores (~1%) a los de la PRL 23K (Torner et al., Abstract 1993). Sin embargo la mayor potencia biológica sustentada por los estudios de Mittra no fue corroborada. Tanto la PRL 16K generada *in vitro* mediante la proteólisis y reducción de la PRL como la producida por ADN recombinante, han mostrado una potencia biológica similar o menor a la de la PRL 23K en diversos bioensayos para PRL. Así, la potencia

mitogénica de la PRL 16K es menor a la de la PRL íntegra (o PRL 23K) en el bioensayo *in vivo* del buche del pichón y sobre células de linfoma murino Nb2, mientras que se observa una potencia mitogénica similar entre la PRL 16K y la PRL 23K sobre la proliferación de células epiteliales mamarias (Clapp et al., 1988). Por otra parte, la potencia lactogénica de la PRL 16K, evaluada mediante ensayos sobre la producción de caseína por células mamarias, es menor respecto a la de la PRL 23K íntacta (Clapp et al., 1988).

En forma similar a la potencia biológica observada, la afinidad de unión de la PRL 16K a los receptores de la PRL varía en función del órgano blanco involucrado. En el hígado, la PRL 16K posee un 6% de la afinidad de la PRL 23K por su receptor, mientras que en el cerebro su afinidad es similar y en el riñón es marcadamente mayor (30 veces) a la de la PRL 23K (Clapp et al., 1989). La afinidad variable de la PRL 16K para unirse a los receptores de la PRL podría sugerir el que su posible participación en la mediación de los efectos de la PRL varía de acuerdo al órgano blanco en cuestión. Es decir, que la contribución funcional de la PRL 16K podría ser de mayor relevancia en el riñón y en el sistema nervioso central y de menor impacto en el hígado (Clapp et al., 1989).

Sin embargo el hallazgo más significativo fue el descubrimiento de la existencia de receptores para la PRL 16K, diferentes a los receptores conocidos para la PRL 23K (Clapp et al., 1992). Así, se observó que membranas aisladas de riñón, cerebro e hígado contienen sitios de unión a la PRL 16K de alta afinidad, saturables y específicos. La PRL 23K fue incapaz de competir con la PRL 16K por dicha unión, por lo que se implicó a estos sitios de unión como posibles receptores capaces de mediar efectos específicos de la PRL 16K (Clapp et al., 1989). En apoyo a esta implicación, estudios posteriores revelaron uno de estos efectos específicos. Se encontró que la PRL 16K inhibe la formación de nuevos vasos sanguíneos, proceso conocido como angiogénesis, y no así la PRL 23K (Ferrara et al., 1991).

3.2.1 Actividad antiangiogénica

La angiogénesis es un proceso fundamental para el crecimiento y diferenciación de los tejidos en las etapas embrionarias y fetales. En el adulto la angiogénesis participa en procesos fisiológicos tales como la ovulación y la regeneración y reparación tisular y es determinante en algunos procesos patológicos que se acompañan de una producción anormal de vasos capilares tal como ocurre en neoplasias, la artritis reumatoide y las retinopatías (Schwartz et al., 1990). La angiogénesis ocurre merced a una serie de fases secuenciales que incluyen la migración, proliferación y asociación de las células endoteliales para conformar capilares, por lo que cada una de dichas fases sientan las bases de bioensayos específicos de angiogénesis.

Inicialmente se observó que la PRL 16K era capaz de inhibir la proliferación de células endoteliales en cultivo, efecto inhibitorio que se manifiesta tanto sobre la proliferación basal como sobre la proliferación estimulada por un conocido factor angiogénico, el factor de crecimiento de fibroblastos básico o bFGF (Weiner et al., 1988; y Ferrara et al., 1991).

Posteriormente se encontró que además de su proliferación, la capacidad de asociación de las células endoteliales para conformar vasos capilares también es afectada por la PRL 16K. Las células endoteliales cultivadas en una matriz de colágeno forman estructuras tubulares que semejan capilares (Clapp et al., 1992). La adición de PRL 16K provocó la disociación de dichas estructuras capilares (Ferrara et al., 1992, y Clapp et al., 1993). Más aun, la inhibición directa de la PRL 16K sobre el endotelio *in vitro* se corresponde con una inhibición sobre el proceso integral de la angiogénesis observado *in vivo*. Mediante el uso del modelo de angiogénesis de la membrana corioalantoidea del embrión de pollo se observó que la PRL 16K provoca una disminución en el número de capilares en la zona de administración (Clapp et al., 1993). Tanto las PRLs integras como las PRLs cortadas de diversas especies fueron incapaces de ejercer este efecto sobre la angiogénesis *in vitro* o *in vivo*.

Dado que la inhibición de la función endotelial ocurre en respuesta a la PRL 16K y no a la PRL 23K, este efecto podría requerir la activación de receptores específicos a dicho fragmento hormonal. Esta posibilidad fue apoyada al detectar la presencia de sitios de unión saturables, de alta afinidad y específicos en membranas de células endoteliales (Clapp et al., 1992). Estos sitios de unión se asociaron con proteínas que difieren estructural y funcionalmente de los receptores de PRL. Así, efectos específicos de la PRL 16K mediados por receptores propios le confieren a la PRL 16K un posible papel de nuevo factor de regulación. Estos hallazgos en conjunto apoyan la heterogeneidad molecular de esta hormona como fuente directa de su diversidad funcional al tiempo que permiten inscribir a la angiogénesis dentro del marco de acción de las prolactinas. Esta posibilidad se apoya en la detección de la presencia endógena de la PRL 16K y de PRLs con acciones sobre la angiogénesis.

Así, la búsqueda de posibles fuentes de producción de la PRL 16K endógena motivó el descubrimiento de la expresión de PRLs por el sistema hipotálamo neurohipofisario (SHN), antecedente inmediato y objetivo de análisis del presente trabajo de tesis.

3. ANTECEDENTES INMEDIATOS

Como se mencionó en las secciones precedentes, tanto la PRL cortada como la PRL 16K se han detectado en la adenohipófisis (AH), principal tejido productor de prolactinas. Sin embargo, el gen de la prolactina se expresa en diversos tejidos extrahipofisarios que incluyen el endometrio, la glándula mamaria, la decidua uterina, el sistema inmune y el sistema nervioso central (SNC) (Ben-Jonathan et al., 1996). Más aun, en el SNC se ha documentado la heterogeneidad estructural de la PRL y en particular la presencia de las PRLs proteolíticamente modificadas.

1. PRODUCCION DE PROLACTINA POR EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL.

1. Detección de Prolactinas centrales.

Los primeros reportes sobre la expresión de PRLs a nivel cerebral fueron realizados mediante técnicas de inmunocitoquímica con anticuerpos específicos anti-PRL (Fuxe et al., 1977, y Toubeau et al., 1979). Así, se observó que los antígenos tipo PRL se localizan en su mayoría en neuronas del hipotálamo, a saber en los núcleos arqueado, dorsomedial y ventromedial, así como también en la región periventricular y el área preóptica (Fuxe et al., 1977, y Toubeau et al., 1979). Fuera del hipotálamo se han descrito procesos neuronales con inmunorreactividad a PRL en el cerebelo, el tálamo, el tallo cerebral (puente y médula), el hipocampo, la corteza cerebral y el núcleo caudado (Harlan et al., 1989 y Emanuelle et al., 1987). Asimismo, diversos estudios han mostrado la presencia de la PRL en el líquido cefalorraquídeo (Baranel et al., 1986; Login et al., 1977; DeVito, 1989), y se ha propuesto que ésta parece derivarse tanto de la PRL producida por el SNC como de la PRL sistémica.

Esta última parece ingresar al líquido cefalorraquídeo por transporte activo vía receptores en los plexos coroides (Mangurian et al., 1992).

La presencia de prolactinas en el hipotálamo ha sido documentada mediante diversos estudios que analizan la naturaleza de los antígenos tipo PRL en base a la caracterización de sus propiedades químicas y biológicas. A este respecto, Emanuele y cols. (1987, 1989, 1992) reportaron, mediante el análisis cromatográfico de extractos hipotalámicos, la presencia de tres fracciones con inmunorreactividad del tipo de PRL y que corresponden a proteínas con pesos moleculares de 44, 23 kDa y fragmentos de menor tamaño. Estas variantes moleculares fueron detectadas también en extractos de médula espinal, tallo cerebral y diencefalo de rata. En correspondencia con estos hallazgos DeVito mostró, además de la presencia de PRL de 23 kDa en homogenados de hipotálamo, a la forma de PRL cortada, y a posibles fragmentos de PRL con pesos moleculares aproximados de 16 y 12 kDa (DeVito, 1988).

2. Detección de ARN mensajero de PRL en el SNC.

En apoyo a la producción de PRLs por el SNC, el grupo de Pfaff (Schachter et al., 1984) fue el primero en demostrar que el gen de prolactina se expresa en el hipotálamo. La hibridización tipo Northern del ARN hipotalámico con una sonda para PRL mostró la presencia del ARN que codifica para PRL 23K. La confirmación adicional de la producción de PRL por el hipotálamo fue realizada por el grupo de Emanuele (1992), mediante la retrotranscripción del ARN total hacia ADN complementario, y su posterior amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). La comparación entre el ADNc amplificado utilizando como cebadores diversas secuencias de oligonucleótidos del ADN de PRL y el ADN hipofisiario reveló que ambos mensajes son similares. Sin embargo, se observó adicionalmente la presencia de un ARN mensajero de menor tamaño, el cual parece carecer del exón 4 por lo que podría provenir de un procesamiento alternativo del

mensaje original. La traducción de dicho transcrito teóricamente generaría una PRL de 16 kDa, si bien con una secuencia primaria distinta a la del fragmento derivado de la proteólisis de la PRL (PRL 16K). Así, este último comprende el extremo amino terminal de la prolactina hasta el aminoácido 146, mientras que el producto del ARN pequeño amplificado parece carecer de la región codificada por el exón 4 de la PRL (Emanuele et al., 1992).

3. El sistema nervioso central como órgano blanco de PRL.

Las demostraciones de los efectos de PRL sobre el sistema nervioso central son abundantes, y entre ellas sobresale la facilitación de diversas respuestas conductuales. En las aves, particularmente el pichón (*Streptopelia risoria*), la administración de PRL en los ventrículos cerebrales induce la conducta materna, reduce la concentración de hormona luteinizante (LH) en plasma y consecuentemente induce la regresión gonadal (Buntin et al., 1988 y Foreman et al., 1990). Asimismo, la PRL intracerebroventricular incrementa la ingesta de alimentos en varias especies y es capaz de alterar conductas relacionadas con el balance de agua y el estrés (Buntin et al., 1985). En los mamíferos la PRL juega diversos papeles sobre la conducta reproductiva: su aplicación directa intracerebral incrementa la conducta de lordosis en ratas (Bridges et al., 1990). También, la PRL estimula la conducta materna en mamíferos (Bridges, 1985). La administración de bromocriptina, un inhibidor de la secreción de PRL a hamsters hembras lactantes inhibe la conducta materna y esta conducta es restaurada mediante la aplicación de implantes de tejido hipofisiario (McCarthy et al., 1994).

Las acciones centrales de la PRL sobre la conducta reproductiva se han atribuido a su efecto modulador sobre la GnRH (hormona liberadora de gonadotropinas). Es conocido que la hiperprolactinemia provoca una disminución de los niveles de GnRH en la sangre portal hipofisiaria (Sarkar et al., 1985), así como

una reducción de la frecuencia de los pulsos secretorios de LH (Cohen-Becker et al., 1986). Estos efectos aparentemente son ejercidos mediante la interacción de la PRL con la forma corta de su receptor presente en las neuronas GnRHérgicas (Milenkovic et al., 1994).

Otras de las células cerebrales blanco de la PRL son las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares en el núcleo arqueado (Ben-Jonathan, 1985). La prolactina estimula la síntesis de dopamina por el sistema tuberoinfundibular y su secreción a la sangre portal hipofisiaria (Arbogast et al., 1991). Esta acción de la PRL regula su propia secreción ya que la dopamina es el principal factor inhibidor de la producción y secreción de la PRL adenohipofisiaria (Selmanoff, 1985). Por otra parte, la prolactina provoca también alteraciones en la secreción de ocitocina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), los cuales se han considerado como factores secretores de PRL (Sarkar, 1989).

Recientemente se ha reportado que la PRL es capaz de inducir la proliferación de astrocitos, si bien en forma de coactivador junto con otros factores de crecimiento (DeVito et al., 1992b). Se ha propuesto que la PRL podría participar en la respuesta inflamatoria del cerebro, ya que tanto la concentración local de PRL como su ARN mensajero se incrementan en respuesta a la lesión cerebral (DeVito et al., 1995).

II. PRODUCCION DE PROLACTINAS POR EL SISTEMA HIPOTALAMO NEUROHIPOFISIARIO

1. El Sistema Hipotálamo neurohipofisiario.

Las neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos paraventricular (PV) y supraóptico (SO) son los principales componentes del sistema hipotálamo-neurohipofisiario (SHN) (Swanson et al., 1983). Estas neuronas proyectan sus axones hacia la neurohipófisis, desde donde vierten sus productos hormonales, principalmente vasopresina y ocitocina, a la circulación (Fig. 5). Numerosos estudios

han mostrado que la vasopresina y la oxitocina son sintetizadas por poblaciones neuronales independientes (Sawchenko et al., 1992), si bien durante algunos estadios fisiológicos como la lactancia y bajo alteraciones en la presión osmótica, ciertas neuronas del SO y PVN son capaces de sintetizar ambas hormonas a la vez (Mezey et al., 1991; y Kiyama et al., 1990).

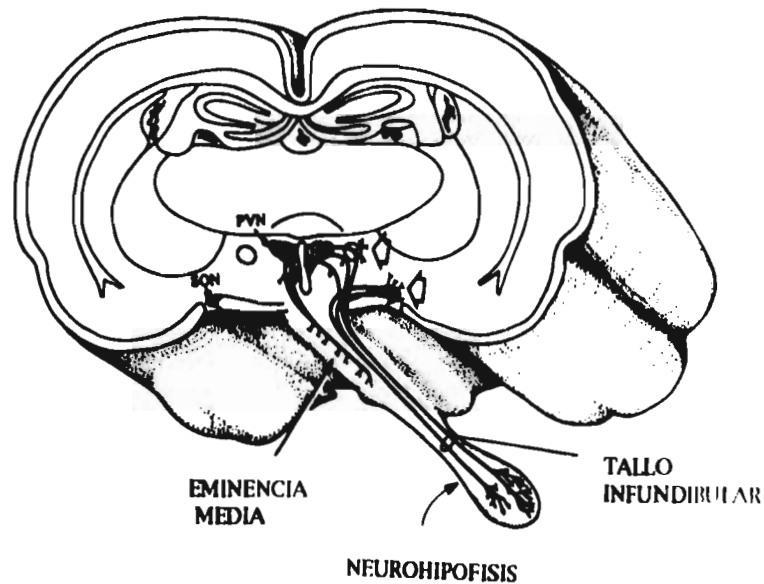


Fig. 5. Diagrama del Sistema Hipotálamo Neurohipofisiario. Se muestra el corte coronal a nivel de los núcleos paraventricular (PVN) y supraóptico (SON), y se esquematizan las proyecciones principales de las neuronas magnocelulares hacia la neurohipofisis.

La vasopresina circulante es la responsable de mantener el volumen del fluido extracelular ejerciendo sus acciones tanto sobre el riñón, estimulando la retención de agua y la excreción de Na^+ y Cl^- , como sobre las arteriolas donde es uno de los más potentes vasoconstrictores identificados a la fecha (Van Wimersma Greidanus et al., 1991). Uno de los estímulos más efectivos para evocar la secreción de vasopresina es la elevación en la concentración de los solutos extracelulares. Tan sólo una elevación del 2% en la osmolaridad del plasma provoca un incremento de dos a tres veces en los niveles circulantes de esta hormona (Windle et al., 1990). Otros indicadores de la depleción del fluido extracelular que también estimulan la secreción de vasopresina son el descenso en el volumen plasmático, la disminución de la presión sanguínea, el aumento en los niveles circulantes de angiotensina II, y la hipoxia periférica (Van Wimersma Greidanus et al., 1991). En contraste, las acciones de la oxitocina circulante son conocidas por su papel en la reproducción donde esta hormona está íntimamente involucrada en el desencadenamiento y conclusión del trabajo de parto y la iniciación de la lactancia (Higuchi et al., 1986). La oxitocina actúa sobre el músculo liso del endometrio durante el trabajo de parto, incrementando la frecuencia e intensidad de las contracciones uterinas (Fuchs et al., 1982). También estimula la contracción de las células mioepiteliales que rodean a los alveolos mamarios para provocar la evacuación de la leche en respuesta a la succión.

Se ha demostrado que las neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas sintetizan otros neuropéptidos. Como ejemplo, las neuronas vasopresinérgicas sintetizan dinorfina, angiotensina II, leucina-encefalina, galanina, péptido intestinal vasoactivo (VIP) y tiroxina hidroxilasa (Brownstein et al., 1986; Meister et al., 1990; Gaymann et al., 1987). A su vez, las neuronas productoras de oxitocina también producen colecistocinina (CCK), hormona liberadora de corticotropina (CRF), dinorfina, metionina-encefalina y hormona liberadora de tiotropinas (TRH) (Brownstein et al., 1986; Gaymann et al., 1987; Hatton, 1990, y Meister et al., 1990). La expresión de los múltiples mensajeros químicos en las neuronas magnocelulares muestra variaciones dependiendo de los estímulos que inciden sobre el sistema

(Hatton, 1990 y Villar et al., 1990), sin embargo se desconoce el papel exacto que juegan los neuropéptidos colocalizados con las hormonas neurohipotalámicas. Se ha propuesto que estos pudieran interactuar con las hormonas neurohipofisarias ejerciendo efectos autócrinos y/o parácrinos para modular su secreción (Hatton, 1990 y Meister, 1993).

2. PRLs Neurohipofisarias.

El descubrimiento de prolactinas en el sistema hipotálamo neurohipofisario se derivó de estudios encaminados a analizar la localización celular de la PRL 16K en la adenohipófisis. Dado que dicho fragmento es reconocido pobremente por anticuerpos dirigidos contra la PRL 23K (Clapp et al., 1988) se generó un antisuero anti PRL 16K. Con este antisuero y técnicas de inmunocitoquímica, se marcó positivamente la hipófisis anterior, principal tejido productor de PRLs. Sin embargo, y en forma inesperada el antisuero anti-PRL 16K también marcó positivamente la neurohipófisis (Fig. 6). Este resultado fue sorpresivo, ya que si bien se había descrito la presencia de PRL en el hipotálamo, el consenso general no incluía al sistema hipotálamo-neurohipofisario (Harlan et al., 1989; Nishizuka et al., 1990; Dutt et al., 1994).

En concordancia con la inmunotinción de la neurohipófisis, el anti PRL 16K fue capaz de teñir otros componentes del SHN. Así, se observó también una inmunotinción positiva en los somas de las neuronas magnocelulares de los núcleos hipotalámicos paraventricular (PV) y supraóptico (SO), lo mismo que en sus proyecciones nerviosas en la lámina interna de la eminencia media (Fig. 6). Esta tinción fue específica para la neurohipófisis, dado que la hipófisis intermedia no resultó teñida. Su especificidad para PRLs se verificó mediante el bloqueo de la inmunotinción al preadsorber al anti PRL 16K con PRLs.

El hallazgo de PRLs en el sistema hipotálamo-neurohipofisario contrasta con resultados de la literatura, ya que si bien algunas evidencias indicaban la

presencia de antígenos tipo PRL en el núcleo supraóptico (Harlan et al., 1989), se requería de la inhibición del transporte axonal mediante colchicina para hacer evidente su presencia. Empero, si consideramos el hecho de que las variantes de PRL, tales como la PRL 16K, presentan una menor inmunorreactividad a los anticuerpos dirigidos contra la PRL 23K (Clapp et al., 1988) es posible concebir el que la dificultad de los estudios previos para detectar PRL en el SHN pudiera tener su origen en la estructura molecular de las prolactinas neurohipofisarias. Estas podrían presentar diferencias con la PRL 23K y similitudes con la PRL 16K por lo cual serían reconocidas selectivamente por uno y no otro de los antisueros.

En apoyo a la expresión de PRLs por el SHN se detectó el ARN mensajero de PRL en núcleos paraventriculares aislados, utilizando técnicas de retrotranscripción del ARN total hacia su ADN complementario y su posterior amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Estas observaciones en su conjunto permitieron concebir la posibilidad de que en el sistema hipotálamo-neurohipofisario se expresa el gen de la prolactina generando proteínas distintas a la PRL 23K.

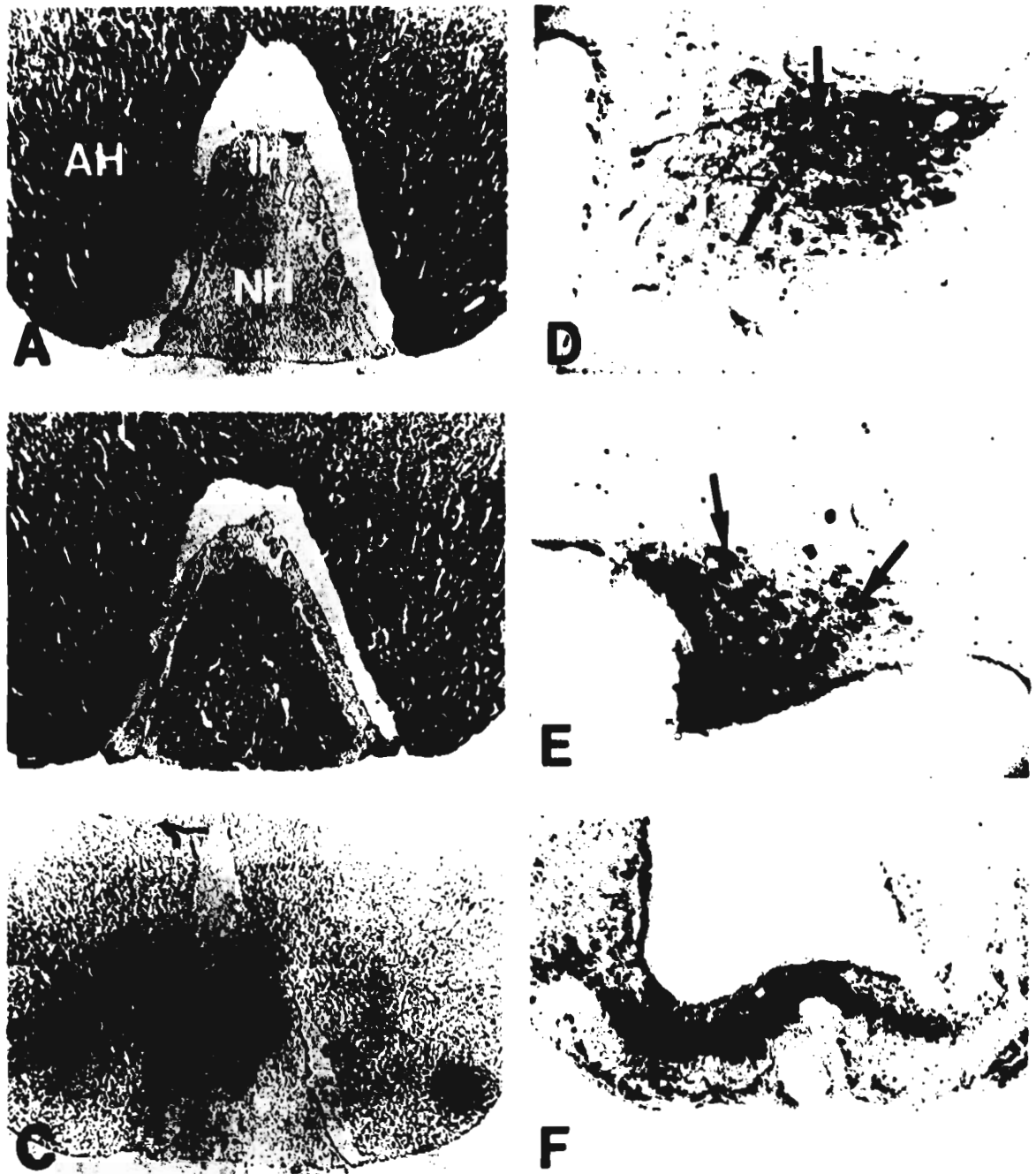


Fig. 6. Detección inmunocitoquímica de antígenos tipo PRL en la hipófisis y en el sistema hipotálamo neurohipofisiario. (A - C) Secciones horizontales de la hipófisis mostrando la adenohipófisis (AH), hipófisis intermedia (IH) y neurohipófisis (NH). Inmunorreacciones con los antiseros anti PRL 23K (A) y anti 16K (B y C) en diluciones 1:500. En C el anti PRL 16K se preadsorbió con PRL 16K (1 μ M). (D-F) Inmunorreacciones con el anti PRL 16K en el núcleo hipotalámico paraventricular (D), núcleo supraóptico (E) y en la lámina interna de la eminencia media (F). Las neuronas magnocelulares marcadas se indican con flechas. Los resultados son representativos de 10 experimentos independientes (x10).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En el presente trabajo se analizó la producción local de prolactina(s) por el HNS mediante la determinación de la expresión del ARN mensajero de PRL en los SO y PV aislados y la caracterización de los antígenos tipo PRL presentes en extractos neurohipofisarios. Asimismo, analizamos la posible producción independiente de las prolactinas en el SHN de aquellas sintetizadas por la adenohipófisis. Finalmente determinamos si las PRLs neurohipofisarias son secretadas y, dado que el SHN es un sistema neuroendócrino, analizamos la posible presencia de PRLs similares a las neurohipofisarias en la circulación.

1. HIPOTESIS

El sistema hipotálamo-neurohipofisario es una fuente de producción y secreción de prolactina(s).

2. OBJETIVOS

a) Caracterización de las prolactinas del SHN en base a su peso molecular e inmunorreactividad mediante su detección en geles de poliacrilamida bajo condiciones desnaturalizantes, transferencia e inmunotinción empleando anticuerpos anti-prolactina, poli y monoclonales.

b) Análisis de la producción local de prolactina por el HNS:

- 1) Síntesis independiente de las PRLs del SHN respecto de las PRLs producidas en la adenohipófisis.
- 2) Determinación inmunocitoquímica de las PRLs inmunorreactivas en los núcleos hipotalámicos SO y PV de ratas hipofisectomizadas.
- 3) Detección del ARN mensajero de PRL en núcleos hipotalámicos PVN y SON mediante la retrotranscripción y amplificación por la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) de su ARN total.

c) Análisis de la secreción de prolactinas al medio de incubación de neurohipófisis aisladas y de explantes hipotálamo-neurohipofisarios.

d) Detección en la circulación de PRLs con inmunorreactividad y peso molecular similar al de las PRLs neurohipofisarias.

4. METODOLOGIA

I. MATERIAL BIOLÓGICO

1. Animales

Se emplearon ratas Wistar macho y hembras (200 - 250 g) en los diferentes estadios del ciclo reproductor, a saber: proestro, estro y diestro. A las hembras vírgenes se les determinó su etapa del ciclo estral mediante el examen de la citología de frotis vaginales durante al menos 3 ciclos consecutivos. Todos los animales fueron mantenidos bajo condiciones controladas en sus ciclos diurno - nocturno y temperatura constante, con agua y comida *ad libitum*.

Un grupo de ratas hembras fue hipofisectomizado mediante cirugía parafaríngea como se ha descrito (Quintanar et al., 1994). Este grupo se mantuvo con agua para tomar suplementada con glucosa al 5%. Tres semanas después de la cirugía, las ratas fueron sacrificadas y sus cerebros se procesaron para inmunocitoquímica. La eficacia de la hipofisectomía se determinó mediante la inspección visual de la silla turca y las concentraciones no detectables de PRL en suero mediante RIA.

2. PRLs

Se utilizó PRL de rata (B-6) obtenida del Programa de pituitaria y hormonas nacionales (NHPP) de los E. U., como estándar de la forma monomérica de la PRL (PRL 23K). El estándar de PRL 16K utilizada se generó mediante la proteólisis enzimática de la PRL 23K (B-6) al incubarse en condiciones ácidas con una fracción subcelular de extractos de glándula mamaria de ratas lactantes. Enseguida se realizó la reducción de los puentes disulfuro y el aislamiento de la PRL 16K por filtración en gel. Posteriormente la PRL 16K fue carbamidometilada como se ha descrito (Clapp et al., 1988), para bloquear los grupos sulfhidrilo reactivos.

3. Antisueros

Se utilizó un antisuero contra la PRL 16K generado en conejo. La especificidad de este antisuero fue evaluada mediante el análisis de su reactividad cruzada por RIA contra PRL 23K (B-6) y diversas hormonas hipofisarias e hipotalámicas como se describirá mas adelante.

Otros anticuerpos utilizados fueron uno policlonal, el antisuero anti PRL 23K (S-9) del NHPP y un anticuerpo monoclonal en líquido de ascitis, generado contra la PRL de rata y proporcionado gentilmente por el Dr. Peter Berger (Institut für Biomedizinische Alternforschung, Innsbruck, Austria).

II. METODOS

1. Preparación de los tejidos

Las ratas macho fueron sacrificadas por decapitación y se les extrajo la hipófisis. Inmediatamente después se separó el lóbulo neurointermedio del lóbulo anterior con ayuda de un microscopio de disección. Adicionalmente se colectó la sangre proveniente del tronco en hielo y se centrifugó para obtener el suero, el cual se almacenó posteriormente a -70 C hasta ser analizado.

En otro grupo de ratas macho, se extrajo el sistema hipotálamo neurohipofisario de acuerdo al procedimiento descrito por Sladek y Knigge (1977). Brevemente, el cerebro fue cuidadosamente disecado del cráneo mediante una aproximación caudal, conteniendo la hipófisis unida por el tallo hipofisario. La adenohipófisis fue removida bajo el microscopio. Se seccionó el tejido para obtener un tetraedro mediante un corte rostral en el quiasma óptico, cortes laterales a cada lado de la eminencia media, un corte caudal a los cuerpos mamilares y un corte final a una profundidad de 1-2 mm.

2. Incubación de los tejidos.

Los lóbulos neurohipofisarios fueron enjuagados y sumergidos cada uno en 20 μ l de amortiguador Krebs Ringer deficiente en calcio (KRB) (127 mM NaCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 3.73 mM KCl, 1.18 mM MgSO_4 , 20 mM NaHCO_3 , 200 mM EGTA, 11.2 mM dextrosa), y se incubaron a 37 C bajo una mezcla de 95% O_2 y 5% CO_2 . Las neurohipófisis fueron incubadas por tres periodos consecutivos de 15 min en el amortiguador antes descrito y un periodo adicional de 15 min, ya sea en amortiguador Krebs Ringer (KR) deficiente en calcio o en amortiguador (KR) con calcio (1.8 mM CaCl_2). Los medios fueron colectados al término de cada periodo de incubación y se sometieron a su análisis por Western blots y densitometría. Las incubaciones de los explantes del sistema hipotálamo neurohipofisario fueron realizadas enjuagando previamente los explantes y sumergiéndolos en forma individual en 1 ml de amortiguador Krebs Ringer completo. Dichas incubaciones se realizaron a 37 C bajo una atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2 . Después de un periodo de equilibración de 20 min, los explantes fueron expuestos a medio fresco KR por 15 min, se incubaron por otro periodo de 15 min en medio KB conteniendo 56 mM de K^+ , y finalmente se incubaron otros 15 min en medio fresco KB normal. (Los medios con concentraciones altas de potasio se prepararon con una disminución proporcional en la concentración de sodio). Los medios fueron colectados al término de cada periodo de incubación y se almacenaron a -70 C hasta la realización de las determinaciones de sus concentraciones de PRL y vasopresina mediante radioinmunoensayo.

3. Western blots.

Las adenohipófisis (5 mg) o neurohipófisis (2.5 mg) fueron sonicadas en 100 μ l de amortiguador de lisis (0.01M de Tris.HCl, 0.14 M NaCl, 1% Tritón X-100, pH 8) conteniendo los inhibidores de proteasas aprotinina a 0.2 U/ml y fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) en concentración de 1 mM. Los extractos de tejido (5 μ l) o las muestras de suero (2.5 μ l) fueron fraccionados por electroforesis en geles

de acrilamida y SDS (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras o no reductoras, i. e., presencia o ausencia de β -mercaptoetanol, de acuerdo con Laemmli (1970). Los Western de proteínas se realizaron sobre papel de nitrocelulosa y fueron teñidos con una dilución 1:500 del suero anti-PRL 16K, o de los anticuerpos dirigidos contra PRL 23K. El color se desarrolló mediante el uso del estuche para detectar anticuerpos secundarios de los laboratorios Bio-Rad (Hercules, California).

4. Radioinmunoensayo (RIA).

Se desarrolló un radioinmunoensayo específico para la PRL 16K como ya se ha reportado (Clapp et al., 1994). Brevemente, la PRL 16 estándar fue yodada isotópicamente mediante el método de la cloramina T (Greenwood et al., 1963). Se añadieron 200 μ l de suero anti PRL 16K (a una dilución de 1:4000) a tubos conteniendo diferentes concentraciones de la PRL 16K estándar o muestras (200 μ l). Se agregaron 100 μ l de PRL 16K marcada con 125 I (20,000 cpm) y buffer de ensayo (0.1% BSA, 0.01M PO_4 , 0.15 M NaCl, pH 7.6) hasta un volumen final de 800 μ l. Se incubaron durante toda la noche a temperatura ambiente y los complejos antígeno anticuerpo se separaron mediante la adición de 15 μ l/tubo de pansorbina (Calbiochem-Novabiochem Corp. La Jolla, CA). La sensibilidad del ensayo fue de 0.2 ng / tubo, y los C.V. intra e inter ensayo fueron de 3% y 9,7% respectivamente.

La especificidad del RIA para PRL 16K fue evaluada contra PRL 23K (B-6) y diversas hormonas hipofisarias e hipotalámicas (Clapp et al., 1994). No se observó reactividad cruzada con hormona de crecimiento de rata (GH, NHPP), vasopresina, oxitocina, angiotensina II, y neurofisinas I y II (Sigma), β -lipotropina (NHPP), β -endorfina (Pierce), Met-enkefalina (Peninsula) y adrenocorticotropina (residuos 1 - 39; Bachem). El ensayo tiene una afinidad para la PRL 16K 100 veces superior a la afinidad para la PRL 23K. Inicialmente se estableció el paralelismo entre diluciones seriadas del medio de incubación de los explantes hipotálamo neurohipofisarios y la curva estándar de PRL 16K.

La concentración de vasopresina fue evaluada también mediante RIA como se ha descrito previamente (Samson, 1985). La vasopresina (Sigma) fue yodada mediante el método de la cloramina T (Glick y Kagan, 1979) y fue purificada mediante el uso de una columna sep-pack (Millipore). El suero anti vasopresina fue amablemente donado por el Dr. Willis K. Samson (Universidad de Dakota del Norte, Grandforks, ND). El ensayo tiene una sensibilidad de 2 pg/tubo.

Las concentraciones de PRL en el suero de ratas hipofisectomizadas fueron evaluadas mediante un RIA específico para la PRL 23K utilizando los procedimientos y reactivos proporcionados por los institutos de salud norteamericanos NHPP. Se empleó un estándar de PRL 23K denominado RP-3 como referencia.

5. Inmunocitoquímica.

Las ratas hipofisectomizadas se anestesiaron con pentobarbital sódico y se perfundieron con PBS (0.01M NaH_2PO_4 , 0.14M NaCl, pH 7.4) seguido de paraformaldehído al 4%. Los cerebros fueron fijados durante 24 h. a 4 C y posteriormente se colocaron hasta hundirse. en buffer de fosfatos conteniendo sacarosa al 30% (p/v). Los tejidos fueron cortados en un criostato y se sometieron a inmunocitoquímica usando el estuche ABC de los laboratorios Vector. La inmunotinción con el anti PRL 16K fue realizada con el antisuero diluido 1:500.

6. Aislamiento de RNA.

Se aislaron los núcleos hipotalámicos paraventricular (PV) y supraóptico (SO) de ratas macho y ratas hembra (proestro, estro y diestro) a partir de rebanadas de cerebro mediante la técnica de micropunch (Palkovits, 1983). Se procesaron 40 núcleos PV, SO y cortezas cerebrales a la vez para evaluar cada estadio fisiológico. Se extrajo el ARN total de cada conjunto de tejidos de acuerdo al procedimiento de tiocianato de guanidina /fenol (Chomsinzky et al., 1987).

7. Cebadores para PCR.

Se utilizaron dos cebadores específicos para el ADN complementario de la PRL 23K de rata. El cebador del extremo 5' empleado contenía una secuencia del exón 3, y se denominó rPRL-B (5'ACTTCTTCCCTAGCTACTCCTGAAGAC-3'). El cebador del extremo 3', denominado rPRL-D, contenía una secuencia del exón 5 (5'-CGACATCACGGCTGATGGCGAGCCC-3'). La combinación de estos cebadores generó un producto de 220 pares de bases (pb). Los cebadores para la amplificación del gen constitutivo ciclofilina fueron rCyc-1 (5'-CGACATCACGGCTGAT GGCGAGCCC-3') y rCyc-2 (5'-TTACAGGGTATTGCGAGCAGATGGGG-3'). El producto esperado amplificado por estos cebadores es de 310 pb.

8. Transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

El ARN total (5 µg) proveniente de los núcleos PV y SO o de corteza cerebral fue retrotranscrito por 1 h a 37 C en 30 µl conteniendo Tris 20 mM (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM de cada dNTP, 1 µg de cada cebador oligo(dT), 1 µg de un cebador inespecífico (random primer), 25 unidades de inhibidor de RNasa (Promega) y 200 unidades de Transcriptasa reversa (RT) (proveniente del virus de leucemia murino Moloney). Después de la incubación, la mezcla de reacción fue calentada a 96 C por 5 min. y se enfrió en hielo. Seis µl de la reacción RT fueron amplificados en un volumen de mezcla de amplificación de 50 µl conteniendo 20 mM Tris.HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 50 pmol de cada cebador, y una unidad de Taq ADN polimerasa. Después de su desnaturalización a 95 C por 1 min y 30 seg, la amplificación fue llevada a cabo por 30 ciclos (94 C por 30 seg, 65 C por 1 min, y 72 C por 1 min y 30 seg) seguido de una incubación a 72 C por 10 min. al final de la amplificación.

9. Análisis por Southern blot.

Cinco de los 10 μ l de las mezclas de reacción amplificadas por PCR fueron cargadas en geles de agarosa al 1.8% y transferidos hacia membranas Zeta-Probe GT (Bio-Rad). Las membranas fueron hibridizadas con el cebador de rPRL-B a 42 C durante 16 h en una solución conteniendo 5 X SSC (1 X = 150 mM NaCl, 15 mM citrato de sodio, pH 7.0), 0.02 M NaH_2PO_4 , 7% SDS, 10 X solución Denhart, y ADN de esperma de salmón a 100 μ g/ml. Posteriormente se lavaron a 50 C, y se expusieron para autorradiografía con placas Kodak XAR-5 a -80 C.

5. RESULTADOS Y DISCUSION

I. CARACTERIZACION DE LAS PROLACTINAS NEUROHIPOFISIARIAS

1. Peso Molecular

Las PRLs presentes en extractos neurohipofisarios se caracterizaron en función de su peso molecular mediante inmunoelctrotransferencias ("Western blots") utilizando el antisuero anti-PRL 16K. Se observaron tres proteínas inmunorreactivas con pesos moleculares aparentes de 14, 23 y 25 kDa. Las proteínas inmunorreactivas de 14 y 23 kDa se observaron tanto bajo condiciones no reductoras como reductoras, i.e., en ausencia y presencia de 2-mercaptoetanol. Estos resultados indicaron que estas proteínas no son consecuencia del rompimiento de agregados moleculares por puentes disulfuro durante el procesamiento de la muestra. Sin embargo bajo condiciones reductoras la proteína de 25 kDa deja de ser aparente, lo que sugiere que esta pudiera dar lugar al fragmento de 14 kDa y/o a otros fragmentos no aparentes.

Los "western blots" de medios condicionados por la incubación de neurohipófisis aisladas (MCNH) mostraron también la presencia de proteínas inmunorreactivas de 23 y 14 kDa bajo condiciones reductoras y no reductoras (Fig. 7 y Fig. 8). Se determinó la abundancia relativa de ambas proteínas inmunorreactivas mediante el análisis densitométrico de los "Western blots". Así, en los medios condicionados la proteína de 14 kDa resultó ser 5 veces más abundante que la proteína de 23 kDa. Por otra parte, la proteína inmunorreactiva de 25 kDa no fue detectada bajo condiciones no reductoras, por lo que al parecer no se secreta.

Con objeto de aclarar si la diferencia migratoria entre la proteína inmunorreactiva de 14 kDa y la de la PRL 16K era real y por tanto que esta proteína no correspondía a la PRL 16K, se adicionó un estándar de PRL 16K (100 μ M) tanto a los extractos de NH como a los MCNH. Esto derivó en la presencia de una banda

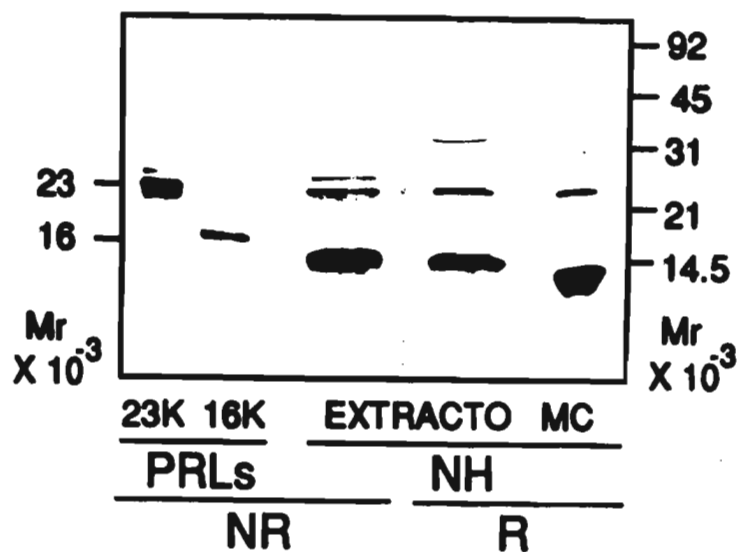


Fig. 7. Identificación de proteínas inmunorreactivas tipo PRL en extractos neurohipofisiarios y medios condicionados de neurohipófisis. "Western blot" de extractos neurohipofisiarios (NH) y medios condicionados por la incubación de neurohipófisis aisladas (C Med) teñidos con el anti PRL 16K. Los medios se generaron incubando neurohipófisis por 1 h en solución Krebs-Ringer a 37°C. Las proteínas se separaron por electroforesis desnaturalizante con SDS (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras (NR) o reductoras (R). Las posiciones de los estándares de PRL 23K y 16K se indican a la izquierda y las de los marcadores de pesos moleculares a la derecha.

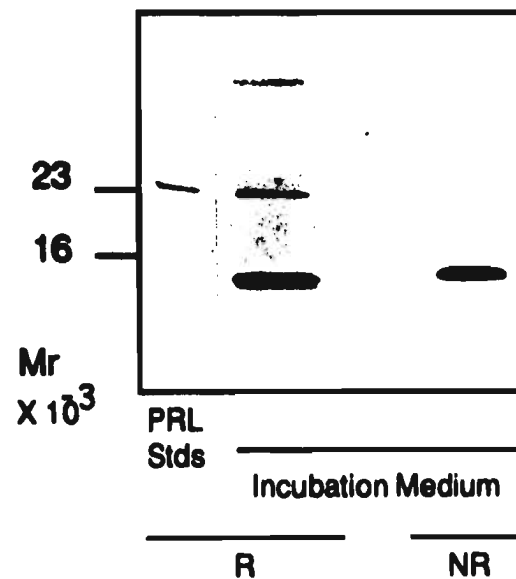


Fig. 8. La proteína tipo PRL de 14 kDa está presente en el medio condicionado de neurohipófisis. "Western blot" de medios condicionados por la incubación de neurohipófisis (C Med), teñidos con el anti PRL 16K. Una vez generados los medios condicionados, se fraccionaron las proteínas por electroforesis desnaturizante con SDS bajo condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR). Las posiciones de los estándares de PRL 23K y 16K se indican a la izquierda.

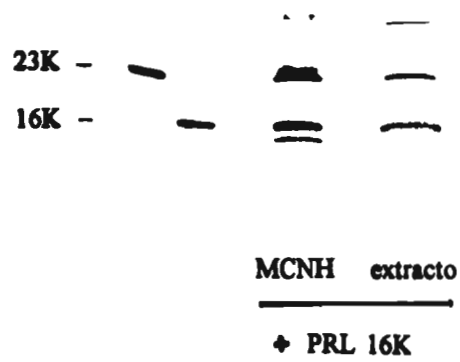


Fig. 9. Diferente migración de la proteína tipo PRL de 14 kDa respecto de la PRL 16K. "Western blot" de extractos de neurohipófisis y MCNH teñidos con el anti PRL 16K. Una vez generados los extractos y los medios condicionados, se les adicionaron 100 ng de PRL 16K estándar y se fraccionaron por electroforesis bajo condiciones reductoras. Las posiciones de los estándares de PRL 23K y 16K se indican a la izquierda.

adicional de proteína inmunorreactiva en las muestras analizadas la cual comigró con el estándar de PRL 16K, y se situó por encima de la banda inmunorreactiva de 14 kDa (Fig. 9). Así, fue claro que esta proteína inmunorreactiva posee un peso molecular menor al de la PRL 16K y por tanto que su migración asociada a un peso de 14 kDa no parece ser consecuencia de artefacto alguno.

2. Inmunorreactividad

La especificidad del anti-PRL 16K fue evaluada mediante su preadsorción con 1 μ M del estándar de PRL 16K (Fig. 10). Como se observa, la inmunotinción de las proteínas inmunorreactivas fue bloqueada por la adición del estándar de PRL 16K al antisuero anti-PRL 16K, confirmando que este antisuero es específico para detectar tanto a la PRL 23K como a la PRL 16K (Fig. 10).

Para confirmar la naturaleza tipo PRL de las proteínas inmunorreactivas presentes en los extractos neurohipofisarios y los medios condicionados (MCNH), analizamos su inmunorreactividad contra anticuerpos poli- y monoclonales generados contra la PRL 23K. Los anticuerpos utilizados reconocieron también al estándar de PRL 16K (Fig. 10). Las tres proteínas inmunorreactivas al anti-PRL 16K fueron detectadas también por los anticuerpos poli- y monoclonales anti PRL 23K. Estos resultados indican que las proteínas encontradas en el SHN comparten epítopes con la PRL y por tanto parecen pertenecer a la familia de las prolactinas.

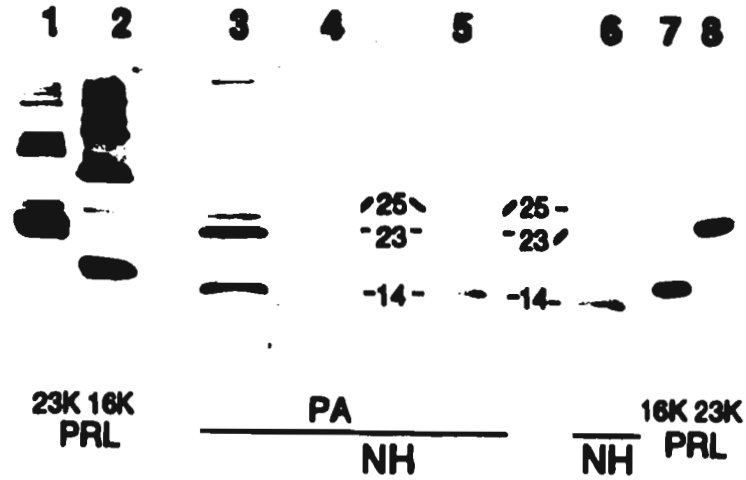


Fig. 10. Identificación de las proteínas tipo PRL en extractos neurohipofisarios por distintos anticuerpos anti-PRL. "Western blots" de extractos neurohipofisarios (carriles 3 - 6) y estándares de PRL 23K y 16K (carriles 1, 2, 7, y 8) fueron teñidos con antisueros (1:500) anti PRL 16K (carriles 1 - 4), anti PRL 23K (carril 5) o con un anticuerpo monoclonal dirigido contra PRL 23K (carriles 6 - 8). En el carril 4 se preadsorbió el antisuero anti PRL 16K con PRL 16K 1 μ M (PA). Se indican las posiciones de migración de las proteínas inmunorreactivas de 25, 23 y 14 kDa. La electroforesis se llevó a cabo bajo condiciones no reductoras. Los resultados son representativos de tres experimentos independientes.

II. ANALISIS DE LA PRODUCCION LOCAL DE PROLACTINAS POR EL SISTEMA HIPOTALAMO NEUROHIPOFISIARIO

1. Producción independiente de las prolactinas neurohipofisarias respecto a las secretadas por la adenohipófisis

Las proteínas inmunorreactivas tipo PRL de 23 y 14 kDa de los extractos neurohipofisarios corresponden aparentemente a prolactinas producidas por el SHN y no parecen provenir de la adenohipófisis (AH). Las disecciones se realizaron bajo el microscopio estereoscópico para guiar la extracción del tejido neurohipofisario y desprender íntegra y limpiamente la NH, ya que los lóbulos anterior y el neurointermedio pueden ser separados fácilmente entre sí. Sin embargo la posibilidad de evitar la contaminación por fragmentos microscópicos de tejido adenohipofisario durante el proceso de extracción no pudo ser completamente excluida.

Para analizar la posibilidad de que las PRLs en la NH pudieran originarse de la posible contaminación con tejidos adenohipofisarios, se comparó el patrón de proteínas inmunorreactivas al anti-PRL 16K en los extractos neurohipofisarios con el de las proteínas en extractos de adenohipófisis con inmunoreactividad similar. Como ya se ha reportado, los "Western blots" de extractos adenohipofisarios bajo condiciones reductoras (R) mostraron predominantemente una proteína inmunorreactiva de 23 kDa que se ha mostrado corresponde a la PRL 23K, así como también una proteína inmunorreactiva mucho menos abundante de 16 kDa, que pudiera corresponder a la PRL 16K endógena (Fig. 11A). Bajo condiciones no reductoras se observó además una banda de proteína inmunorreactiva de 25 kDa. Estos resultados confirman la existencia de una PRL de 16 kDa en la adenohipófisis, y de la PRL cortada precursora de dicho fragmento (Shah et al., 1989 y Torner et al., Abstract 1993). En el extracto de adenohipófisis no fue detectada ninguna proteína de 14 kDa con inmunoreactividad del tipo de PRL tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras.

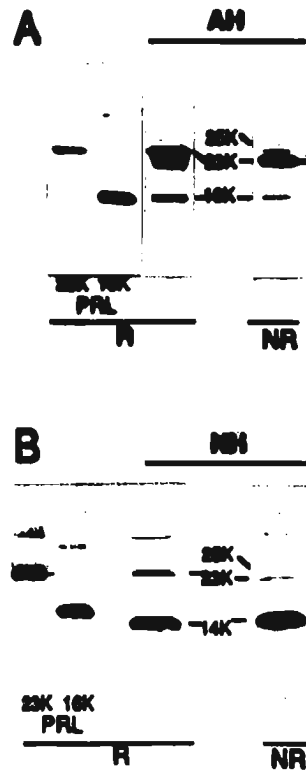


Fig. 11. Comparación del patrón de proteínas tipo PRL en extractos adenohipofisarios y neurohipofisarios. "Western blots" de extractos adenohipofisarios (AH) o neurohipofisarios (NH) inmunotefidos con el anti PRL 16K (1:500). Las proteínas fueron fraccionadas mediante electroforesis (SDS-PAGE) bajo condiciones reductoras (R) y no reductoras (NR). Se indican las posiciones de migración de las proteínas inmunorreactivas de 25, 23 y 14 kDa. Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

Estos resultados nos permiten descartar la procedencia adenohipofisiaria de la proteína de 14 kDa y favorece la hipótesis de su producción local por el SHN. Dada su asociación con la neurohipófisis es posible proponer que en este tejido parece tener lugar un procesamiento diferencial de la PRL hacia un fragmento de 14 kDa. La proteína inmunorreactiva de 25 kDa pudiera ser precursora del fragmento de 14 kDa, dado que si bien se la observa bajo condiciones no reductoras, desaparece en presencia de 2-mercaptoetanol. A este respecto se han reportado al menos dos formas de prolactina cortada en la adenohipófisis, las cuales generan fragmentos de 17 y 16 kDa (Andries et al., 1992). Es posible que esta proteína de 25 kDa constituya una nueva variante cortada, o bien que en la neurohipófisis ocurra un procesamiento proteolítico adicional al que ocurre en la adenohipófisis generando al fragmento de 14 kDa. Incluso, el procesamiento proteolítico parece ser favorecido en la neurohipófisis, ya que la proteína de 14 kDa parece pertenecer exclusivamente al SHN.

Otra alternativa sería el que en este tejido ocurriese un procesamiento alternativo del ARN mensajero de la PRL posterior a su transcripción que pudiera originar al fragmento de 14 kDa. Si bien existen evidencias a favor de dicho procesamiento postranscripcional en el cerebro (Emanuele et al., 1992), los análisis del ARNm de PRL en núcleos PV aislados no evidenciaron ningún transcrito para PRL de tamaño menor (Clapp et al, 1994). Asimismo los análisis sobre el ARNm de PRL en los PV y SO, como se mostrarán más adelante también descartan esta posibilidad.

2. Presencia de antígenos tipo PRL en núcleos paraventricular y supraóptico de ratas hipofisectomizadas.

Si bien los resultados anteriores apoyan el que las prolactinas neurohipofisarias no provienen de la adenohipófisis, el análisis descrito a continuación proporcionó otra evidencia a favor de la síntesis local de las PRLs por el SHN. Varios de los estudios fisiológicos iniciales confirmando la producción independiente de PRL por el sistema nervioso central descansaron en la detección inmunocitoquímica de los antígenos tipo PRL presentes en cerebros de ratas hipofisectomizadas. El razonamiento se basaba en que si se suprimía la fuente primaria de prolactinas, la adenohipófisis, se eliminaría el posible ingreso de las PRLs circulantes vía los plexos coroides al cerebro y con ello la captación de PRL adenohipofisaria por diversas neuronas. Así, la ocurrencia de antígenos cerebrales tipo PRL sería debida a su síntesis por el sistema nervioso y no a la internalización de PRL por sus posibles células blanco.

Aplicando este razonamiento, para confirmar la síntesis de prolactinas por el SHN identificamos antígenos tipo prolactina mediante técnicas de inmunocitoquímica en los núcleos supraóptico (SO) y paraventricular (PV) de ratas hipofisectomizadas. La hipofisectomía se realizó 3 semanas antes del sacrificio. La eficacia de la cirugía fue confirmada mediante la inspección visual de la silla turca y la evaluación de los niveles de PRL en suero por radioinmunoensayo que fueron no detectables. Como se muestra, (Fig. 12A,B) las neuronas magnocelulares de los núcleos PV y SO son teñidas de forma intensa por el anti-PRL 16K, no obstante la hipofisectomía. La preadsorción del anti-PRL 16K con 1 μ M del estándar de PRL 16K eliminó la inmunotinción en ambos núcleos y confirmó la especificidad de la reacción (Fig. 12C,D). Dado que eliminamos a la fuente primaria de prolactina a la circulación, la adenohipófisis, estos resultados apoyan el que los antígenos tipo prolactina son producidos en forma local por el SHN y no provienen de las PRLs adenohipofisarias.

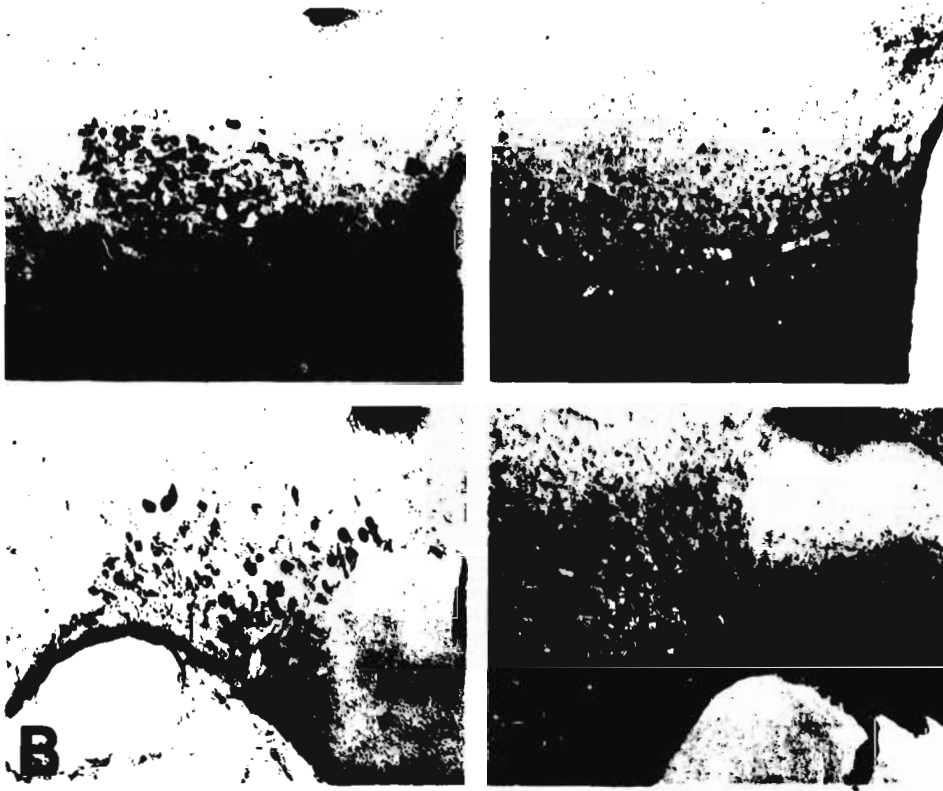


Fig. 12. *Detección inmunocitoquímica de antígenos tipo PRL en núcleos paraventricular y supraóptico de ratas hipofisectomizadas.* Secciones horizontales mostrando los PVN (A,C) o SON (B,D) de ratas hipofisectomizadas e inmunotefidas con el antisuero anti PRL 16K (dil. 1:500). En C y D el anti PRL 16K fue preabsorbido con PRL 16K (1 μ M). Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes. Aumento 10X.

3. Expresión de prolactina en núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico.

El apoyo definitivo a la producción local de prolactinas por el SHN se obtuvo mediante la confirmación de la presencia del ARNm de PRL en los núcleos paraventriculares y supraópticos. Para ello, el ARN total de los PVN y SON se retrotranscribió hacia su ADN complementario (ADNc) y posteriormente se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando como cebadores las secuencias de oligonucleótidos complementarios a los exones 3 y 5 del gen de PRL de rata. La hibridización tipo "Southern" de los productos del PCR amplificados después de 30 ciclos se muestra en la figura 13. Tanto en los PV como en los SO se obtuvo una banda intensa de 220 pares de bases (pb), en concordancia con lo esperado para los oligonucleótidos de PRL utilizados. La corteza cerebral no presentó señal positiva en concordancia con la ausencia de prolactinas inmunorreactivas observada por nosotros y reportada en la literatura (Toubeau et al., 1979; Fuxe et al., 1977; Harlan et al., 1989). En forma similar, no se detectaron productos de amplificación en ausencia de transcriptasa reversa (control negativo). El único producto de la amplificación por PCR del ARNm de PRL fue la banda de 220 pb en ambos núcleos, y no se observó ninguna banda de menor tamaño, por lo que no fue aparente el posible procesamiento alternativo del ARNm de PRL en estos tejidos. Estos resultados confirman la presencia del ARNm de prolactina en ambos núcleos hipotalámicos y apoyan la expresión de varios miembros de las prolactinas por el SHN.

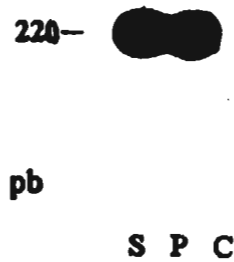


Fig. 13. Expresión del ARN mensajero de PRL en los núcleos paraventricular y supraóptica. Análisis tipo "Southern" de los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR de los núcleos paraventricular (P) y supraóptico (S), así como también de corteza cerebral (C). El tamaño del fragmento amplificado es de 220 pares de bases (pb), como se indica a la izquierda. Se utilizó el cebador de rPRL B marcado con fósforo radiactivo como sonda de hibridización. La autorradiografía fue expuesta por 16 h con una pantalla intensificadora.

III. SECRECIÓN DE PROLACTINAS POR EL SISTEMA HIPOTALAMO-NEUROHIPOFISIARIO

Las neuronas magnocelulares en el SO y el PV producen diversos mensajeros químicos como vasopresina u ocitocina, que son transportados a las terminales nerviosas localizadas en la neurohipófisis donde son secretados a la circulación sistémica. La presencia de PRLs en este sistema y particularmente en los medios condicionados por la incubación de NH nos permite suponer que, al igual que ocurre con los otros mensajeros químicos, las PRLs pudiesen ser incorporadas a la vía de secreción neuronal y secretarse por las terminales neurohipofisiarias al torrente sanguíneo. En forma general se asume que las terminales nerviosas son alteradas por la llegada de potenciales de acción los cuales provocan la despolarización de la membrana plasmática y la apertura de canales de calcio presentes en la membrana (Almers, 1990). Estos eventos disparan el mecanismo de exocitosis de la hormona o neurotransmisor por las terminales nerviosas vía la fusión de las vesículas conteniendo a la hormona con la membrana celular y su secreción al espacio extracelular. Así, el influjo de iones de calcio al espacio intracelular se ha propuesto como requisito indispensable para la secreción de las hormonas neurohipofisiarias, vasopresina y ocitocina, en forma regulada (Douglas et al., 1971, y Poulain et al., 1982).

Por lo anterior, decidimos evaluar si la secreción de las prolactinas neurohipofisiarias muestra un patrón dependiente de calcio y si ocurre en respuesta a un estímulo despolarizante como es la presencia de altas concentraciones de K^+ en el medio.

1. Secreción dependiente de calcio de prolactinas por neurohipófisis incubadas in vitro.

Para analizar la posible secreción fisiológica de PRLs por el SHN estudiamos si la liberación basal de las proteínas tipo PRL por neurohipófisis en cultivo se modifica por la presencia o ausencia de calcio en el medio de incubación.

Los lóbulos neurohipofisarios fueron incubados en medio deficiente en calcio por cuatro periodos consecutivos de 15 min cada uno, o en medio deficiente en calcio por tres periodos consecutivos de 15 min seguidos por un periodo adicional de 15 min con medio conteniendo una concentración fisiológica de calcio (1.8 mM). Como se muestra en la figura (Fig. 14A), la PRL de 14 kDa disminuyó a lo largo del tiempo, esto es, la banda inmunorreactiva asociada con dicha PRL fué menos intensa en el periodo inmediato posterior en comparación con el periodo previo. En contraste, la adición de calcio al medio en el último periodo de incubación incrementó la concentración relativa de la proteína inmunorreactiva de 14 kDa (Fig. 14A). Estas diferencias se cuantificaron mediante el análisis densitométrico de cinco experimentos independientes expresando la densidad de la banda de proteína inmunorreactiva en relación al valor respectivo del periodo anterior. De esta manera se observó una cantidad significativamente mayor de la proteína tipo PRL de 14 kDa en el medio en presencia de calcio que en el medio deficiente en calcio (Fig. 14B). Este resultado sugiere que la secreción de la PRL de 14 kDa pudiera ocurrir en forma dependiente de calcio. Por otra parte, no se observaron diferencias significativas para la proteína inmunorreactiva de 23 kDa (datos no mostrados). La presencia de prolactinas en el medio deficiente en calcio sugiere que una proporción importante de las PRLs pudiera ser artificial a consecuencia del corte del tallo del infundíbulo.

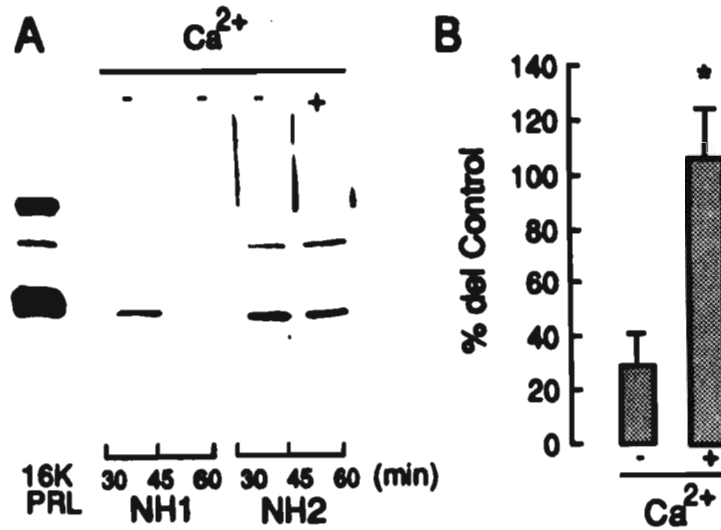


Fig. 14. Liberación de la proteína tipo PRL de 14 kDa en el medio condicionado de neurohipófisis incubado en presencia o ausencia de calcio. A. Western blot de medios condicionados por dos explantes de neurohipófisis (NH1 y NH2) inmunotefñidos con el anti PRL 16K. Se muestran los últimos dos periodos de 15 minutos, de un total de cuatro periodos consecutivos. La NH1 permaneció en medio deficiente en calcio durante todos los periodos de incubación. La NH2 se incubó en medio suplementado con Ca²⁺ (1.8 mM CaCl₂) durante el periodo de incubación de 45 a 60 min únicamente. B. Valores densitométricos de la banda de proteína de 14 kDa de cinco experimentos independientes. Los valores correspondientes al último periodo de incubación (45 - 60 min) fueron expresados en relación a los valores medidos durante el periodo previo de 30 - 45 min (media +/- SEM. *, P<0.05 vs. valores sin calcio (-Ca²⁺)).

2. Secreción de prolactinas neurohipofisarias por la incubación de explantes hipotálamo-neurohipofisarios.

Para evitar la posible contribución de PRLs por escurrimiento derivadas del corte del tallo infundibular y analizar si su secreción ocurre en forma regulada se determinó la secreción de las prolactinas neurohipofisarias por explantes completos del sistema hipotálamo-neurohipofisario en respuesta a un estímulo despolarizante. El uso de explantes íntegros conteniendo al SHN ha sido establecido por el grupo de Sladek para el estudio de la regulación de la secreción de las hormonas neurohipofisarias y constituye un modelo clásico (Sladek et al., 1977). La elevación de potasio en el medio extracelular constituye un estímulo secretorio, ya que la presencia de este ion en altas concentraciones induce la despolarización de la membrana plasmática, provocando la entrada de iones de calcio al medio intracelular a través de canales específicos y disparando el mecanismo de exocitosis. La relevancia de este procedimiento para evocar la secreción de péptidos y hormonas ha sido bien establecida para el análisis de los mecanismos de secreción.

El uso de los explantes incubados para el estudio de la liberación hormonal fue validado en nuestras manos mediante la determinación por RIA de vasopresina en el medio de incubación en respuesta a una concentración despolarizante de K^+ (56 mM). Así, la adición de K^+ 56 mM al medio durante un período de 15 minutos provocó un aumento en la concentración de vasopresina 18 veces mayor al valor de su concentración basal (Fig. 15A). La sustitución del medio conteniendo alto K^+ por medio con K^+ normal provocó la reducción substancial en la cantidad de vasopresina liberada al medio. A la vez, en las mismas muestras de medio se determinó la concentración de las proteínas tipo PRL mediante RIA con el anti-PRL 16K y se observó que esta concentración se incrementó en forma significativa hasta tres veces por encima del valor basal bajo el estímulo despolarizante de K^+ (Fig. 15B). La adición posterior de medio con K^+ normal provocó el retorno a concentraciones basales. De este modo, los resultados obtenidos en su conjunto muestran que la secreción de las prolactinas por el sistema hipotálamo neurohipofisario es facilitada

por la presencia de calcio en el medio y ocurre en respuesta a estímulos despolarizantes. Estos hallazgos sugieren fuertemente el que las PRLs neurohipofisarias ingresan a la vía de secreción neuronal y son secretadas mediante excitocitosis en respuesta a estímulos fisiológicos.

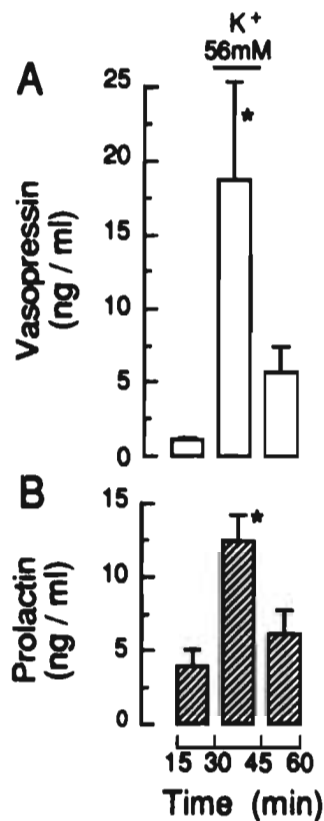


Fig. 15. Efecto de la despolarización por potasio sobre la liberación de las PRLs inmunorreactivas por explantes hipotálamo neurohipofisario. Efectos de concentraciones altas de K⁺ (56 nM) sobre la liberación de vasopresina (A) y de PRL (B) de explantes hipotálamo neurohipofisarios incubados individualmente en 1 ml de buffer Krebs Ringer. Cada barra representa el promedio +/- el error estándar (SEM) de seis replicados. *, P<0.05 vs. los valores basales previos.

3. Detección de la proteína tipo PRL de 14 kDa en el suero de rata.

Dadas las características neuroendócrinas del SHN existe la posibilidad de que las PRLs producidas sean secretadas y vertidas al torrente circulatorio y que este sistema contribuya a las prolactinas circulantes con efectos biológicos.

En apoyo a esta posibilidad, el análisis por Western blots del suero de ratas mostró la presencia de proteínas de 23 y 14 kDa con inmunorreactividad tipo PRL (Fig. 16). La especificidad del antisuero fue validada mediante la preadsorción (PA) del anti PRL 16K con estándar de PRL 16K, con lo cual desaparece la inmunorreacción (Fig. 16A). Asimismo el suero preinmune (SPre) no reveló la presencia de dichas proteínas (Fig. 16A). Por otra parte la proteína de 14 kDa se observó en el suero tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras (Fig. 16B). La proteína de 14 kDa con inmunorreactividad tipo PRL presente en la circulación es similar en inmunorreactividad y peso molecular a la detectada y secretada por el sistema hipotálamo neurohipofisiario. La similitud entre ambas prolactinas apoyan el que dicha proteína circulante corresponda a la secretada por la NH y por tanto el que el SHN produzca PRLs y las secrete a la circulación. A la vez, su presencia en la circulación permite concebir que la proteína de 14 kDa ejerza diferentes acciones fisiológicas a la manera clásica de las hormonas, i.e., viajando en la circulación para alcanzar sus diferentes órganos blanco.



Fig. 16. Detección de una proteína tipo PRL de 14 kDa en suero por Western blot.

A. "Western blots" realizados bajo condiciones reductoras de sueros de ratas hembras e inmunoteñidos con el anti PRL 16K (1:500) previos o posteriores a la preadsorción del antisuero con 1 μ M de PRL 16K (PA) e inmuntinción con suero normal de conejo (NRS). **B.** Western blots teñidos con el anti PRL 16K de sueros de ratas separados por electroforesis bajo condiciones reductoras (R) o no reductoras (NR). Los resultados son representativos de cinco experimentos independientes.

IV. DIFERENCIAS EN LA EXPRESION DE PRL EN EL SHN DURANTE EL CICLO ESTRAL

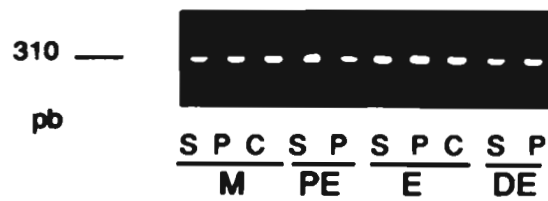
1. Variación de la expresión de PRL a lo largo del ciclo estral

Con el propósito de intentar dilucidar el significado fisiológico de las prolactinas neurohipofisiarias comparamos la expresión del gen de PRL en el SHN entre ratas macho y ratas hembra bajo distintos estadios del ciclo reproductor. Es bien sabido que los estrógenos estimulan directamente la expresión del gen de la PRL en la adenohipófisis (Amara et al., Dannies, 1987), y existen también evidencias sobre la estimulación de la producción del ARNm hipotalámico de PRL por estrógenos en ratas hipofisectomizadas (DeVito et al., 1992a).

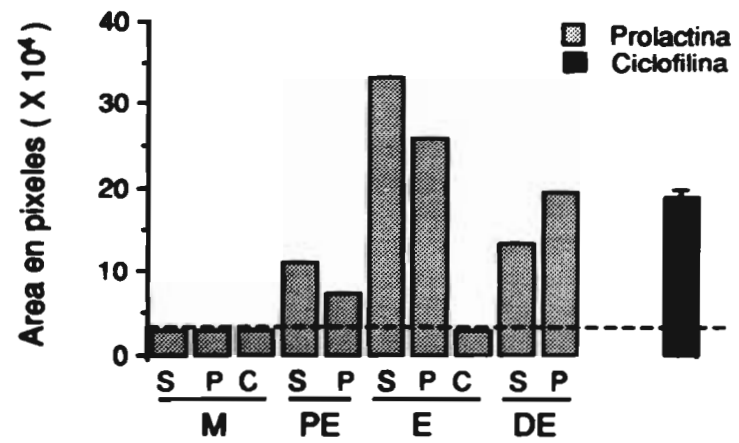
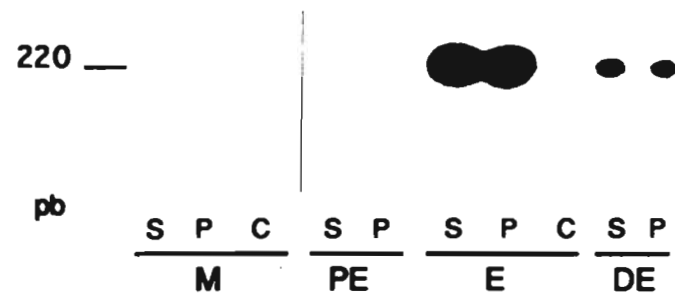
Así, analizamos la expresión del gen de PRL mediante la determinación de su ARN mensajero detectado por RT-PCR en núcleos PV y SO aislados de ratas macho (M) y hembras en proestro (PE), estro (E) y diestro (DE). El ARN total fue retrotranscrito hacia su ADN complementario (ADNc). Este producto fue amplificado mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando como cebadores las secuencias de oligonucleótidos B y D complementarios a los nucleótidos en los exones 3 y 5 del gen de PRL de la rata. Se amplificó también un gen constitutivo, la ciclofilina, como un control de homogeneidad que nos permitiera validar las diferencias encontradas en la expresión del gen de la PRL dependiendo del estado fisiológico. El tamaño de los productos obtenidos por PCR para los oligonucleótidos complementarios al gen de PRL fue consistente con el tamaño esperado de 220 pb, a la vez se obtuvieron fragmentos de 310 pb para ciclofilina (Fig. 17 A). El análisis densitométrico de geles de los transcritos amplificados teñidos con bromuro de etidio y el Southern correspondiente mostró una mayor expresión del gen de PRL en las ratas hembra con respecto a los machos, así como su mayor expresión durante el estro versus los otros estados fisiológicos (Fig. 17 B).

Fig. 17. (Siguiete Página) Cambios en la expresión del ARN mensajero de PRL en los núcleos paraventricular y supraóptico durante el ciclo estral. A: Geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio mostrando los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR para prolactina (gel superior) y ciclofilina (gel inferior) en núcleos supraóptico (S), paraventricular (P) o corteza cerebral (C) de ratas macho (M), y hembra en proestro (PE), estro (E) y diestro (DE). **B, parte superior:** Análisis tipo Southern de los fragmentos obtenidos mediante RT-PCR mostrados en A. El tamaño de los fragmentos amplificados se indica a la izquierda de las figuras. La autorradiografía fue expuesta por 16 h con una pantalla intensificadora. **B parte inferior:** Análisis densitométrico de los fragmentos amplificados para PRL (barras grises) y ciclofilina (barra en negro) de los núcleos S, P y corteza cerebral en los edos. fisiológicos ya mencionados. La línea punteada senala el límite de detección.

A



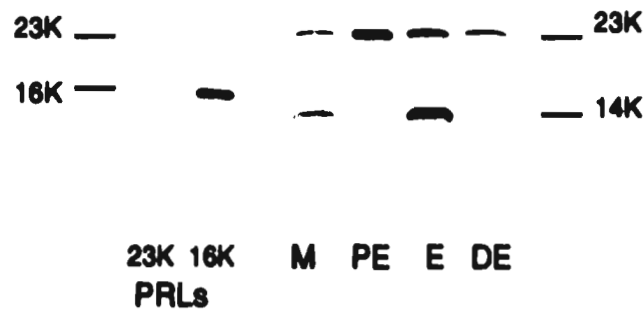
B



2. Diferencias en las concentraciones de las prolactinas neurohipofisarias en el ciclo estral.

Se analizaron los extractos neurohipofisarios de las ratas bajo los diferentes estados fisiológicos para documentar si la variación observada en el ARN mensajero de PRL se correlacionaba con diferencias en las concentraciones relativas de las prolactinas neurohipofisarias. Los "Western blots" de los diferentes extractos neurohipofisarios tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras mostraron un incremento en la concentración relativa de ambas proteínas tipo PRL de 23 y 14 kDa durante el estro (Fig. 18 A). El análisis densitométrico de 6 experimentos independientes mostraron que la concentración de la proteína inmunorreactiva de 23 kDa durante el proestro y el diestro es similar a la del macho, mientras que en el estro es 1.5 veces mayor. Asimismo, la proteína de 14 kDa se incrementa dos veces durante el estro, si bien en otros estadios fisiológicos no cambia en forma significativa (Fig. 18 B). Estos resultados asocian la expresión de las prolactinas neurohipofisarias a cambios en la concentración de estrógenos a lo largo del ciclo estral de la rata.

A



B

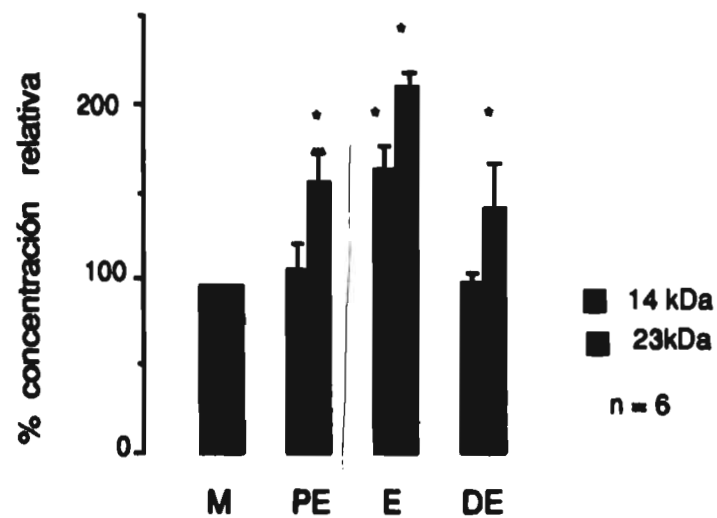


Fig. 18. Variación en las concentraciones de las prolactinas neurohipofisarias en diferentes estados fisiológicos. A. Análisis por "Western blot" utilizando el anti PRL 16K, de extractos neurohipofisarios de ratas macho (M), y hembra en proestro (PE), estro (E) y diestro (DE). Las proteínas se separaron por electroforesis en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) bajo condiciones no reductoras. Las posiciones de los estándares de PRL 23K y 16K se indican a la izquierda. B. análisis densitométrico de 6 casos independientes de las proteínas inmunoreactivas de 14 (barras negras) y 23 kDa (barras grises).

6. *DISCUSION GENERAL*

Los estudios aquí mostrados son consistentes con la hipótesis planteada de que el sistema hipotálamo neurohipofisario expresa al gen de la prolactina. Las evidencias mostradas sugieren que en este sistema tiene lugar un procesamiento proteolítico de la prolactina hacia una variante molecular de menor tamaño, 14 kDa, y proponen su posible secreción desde las terminales nerviosas en la neurohipófisis a la circulación.

La producción de PRL por el sistema nervioso central se ha documentado a través de múltiples estudios caracterizándola en base a sus propiedades inmunológicas, químicas y biológicas. Así, mediante técnicas de inmunocitoquímica, RIA y bioensayos en ratas intactas e hipofisectomizadas, se ha demostrado la presencia de PRL en diversas zonas cerebrales, especialmente el hipotálamo (Fuxe et al., 1977; Toubeau et al., 1979; Harlan et al., 1989; Nishizuka et al., 1990 y Dutt et al., 1994) y se ha documentado su heterogeneidad molecular y biológica (Emanuele, 1987; De Vito 1988). Sin embargo, aún cuando se ha demostrado la presencia del ARN mensajero de PRL en el hipotálamo (Schachter et al., 1984 y Emanuele et al., 1992) ningún estudio previo al nuestro ha establecido en forma precisa los núcleos hipotalámicos que expresan al gen de PRL, y las conclusiones sobre los núcleos productores han sido derivadas fundamentalmente de estudios histoquímicos.

Los estudios de nuestro grupo son los primeros en proponer al sistema hipotálamo-neurohipofisario como un sitio productor y secretor de prolactinas, con especial énfasis en la producción de un fragmento de menor tamaño al de la prolactina intacta. Las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventriculares y supraópticos son claramente inmunoteñidas con el anti-PRL 16K así como sus proyecciones hacia la neurohipófisis, vía la lámina interna de la eminencia media, y la misma neurohipófisis, lo que se denomina como eje hipotálamo neurohipofisario. El

antisuero anti PRL 23K resulta incapaz de inmunotear a los PVN, SON o a la neurohipófisis, si bien tñe a la adenohipófisis en forma específica (Fig. 6). Estos últimos resultados concuerdan con lo descrito en la literatura, ya que otros estudios realizados con técnicas de inmunocitoquímica han sido incapaces de detectar a antígenos tipo PRL en los PVN y en la neurohipófisis. Con respecto al SON existe un reporte que detecta células positivas al anti PRL pero sólo gracias a un tratamiento previo para inhibir el transporte axonal e incrementar la concentración de proteína inmunorreactiva en el soma (Harlan et al., 1989).

Se ha demostrado que las variantes moleculares de prolactina poseen una reactividad reducida a los anticuerpos anti PRL 23K. Dichos anticuerpos detectan a la prolactina cortada con una eficiencia cincuenta por ciento menor respecto a la prolactina 23K íntegra en el RIA, y detectan tan sólo cerca del 2% de la PRL 16K (Clapp et al., 1988). Por ello proponemos que la incapacidad de los estudios previos para detectar la inmunorreactividad tipo PRL del sistema hipotálamo neurohipofisiario se debe al empleo de anticuerpos poco eficaces para la detección de los fragmentos hormonales presentes en este sistema. En concordancia, el empleo de un antisuero dirigido principalmente contra el fragmento de 16 kDa de PRL nos permitió reconocer la presencia de prolactinas en el SHN y proponerlo como un nuevo sitio productor de esta familia hormonal.

Para documentar la naturaleza tipo prolactina de las proteínas de 23 y 14 kDa neurohipofisiarias encontradas mostramos su reconocimiento por distintos anticuerpos anti PRL mediante "Western blots". Si bien los anticuerpos anti-PRL parecen detectar con baja eficiencia a algunas PRLs bajo técnicas inmunocitoquímicas, han sido eficaces para la detección de muchas variantes moleculares de la hormona mediante "Western blots" (Shah et al., 1989; y Meuris et al., 1983), gracias a que la desnaturalización de las proteínas por esta técnica permite la exposición de epítopes de otra manera ocultos. Así, dos antisueros anti-PRL, policlonal y monoclonal fueron capaces de detectar la presencia de las proteínas tipo prolactina de 14 y 23 kDa en los extractos neurohipofisiarios (Fig. 10). Estos

resultados indican que la proteína neurohipofisiaria de 14 kDa comparte determinantes antigénicos presentes tanto en la PRL 23K como en la PRL 16K y por lo tanto parece pertenecer a la familia de las prolactinas. Debido a su reconocimiento por el anti PRL 16K, es concebible que tanto la PRL 16K como la proteína de 14 kDa compartan determinantes antigénicos correspondientes al extremo amino terminal de la PRL 23K.

Más aún, las proteínas inmunorreactivas tipo PRL neurohipofisiarias mostraron poseer efectos biológicos característicos de PRL. Los medios condicionados de neurohipófisis indujeron la proliferación de células de linfoma Nb2, las cuales dependen de PRL para duplicarse. Este efecto fue dependiente de la dosis y se neutralizó con anticuerpos anti PRL (López-Gómez, et al, 1995). Estos resultados refuerzan la naturaleza de PRLs de las proteínas inmunorreactivas detectadas en el SHN.

La proteína de 14 kDa podría corresponder a un producto procesado proteolíticamente de la PRL 16K o bien a un producto directo de la proteólisis de la PRL 23K. Diversos trabajos han mostrado que la PRL puede sufrir un corte hacia el aa 146 (tyr), generando un fragmento de 16 kDa (Andries et al., 1992 y Baldocchi et al., 1992), y se ha mostrado también la presencia de un sitio de corte hacia el aa 133 (Ile), cuya proteólisis genera un fragmento de 14 kDa aproximadamente (Cole et al., 1991). Por otra parte, datos de Emanuele (1992) han sugerido que el sistema nervioso pudiera generar variantes moleculares de PRL con una masa predicha de 16 kDa originadas por un procesamiento alternativo capaz de generar un transcrito de menor tamaño del gen.

Para evaluar la síntesis local de las prolactinas neurohipofisiarias en forma independiente a la adenohipófisis se compararon los patrones de proteínas con inmunoreactividad de PRL de extractos de adenohipófisis versus los de neurohipófisis (Fig. 11) muestra la presencia de un fragmento de 16 kDa pero no de la proteína tipo PRL de 14 kDa, lo que nos permite excluir la posibilidad de que esta proteína proviniera de los lactotrofos de la adenohipófisis debido a la posible

contaminación con los mismos durante el proceso de extracción del tejido. Si bien existen numerosos estudios que han detectado la presencia de proteínas de diversos pesos moleculares en extractos adenohipofisarios, incluyendo proteínas en un rango de 4 a 22 kDa (Wallis et al., 1980; Shah et al., 1989; Meuris et al., 1983; Sinha, 1995), estas se encuentran siempre en concentraciones mínimas con respecto a la prolactina predominante de 23 kDa, y su presencia es poco reproducible. En contraste, la proteína tipo PRL de 14 kDa se observa siempre presente en los extractos neurohipofisarios e incluso en los machos parece predominar en ocasiones por sobre la de 23 kDa (Figs 7, y 18). Estas observaciones descartan la posibilidad de que la PRL de 14 kDa proviniese de la adenohipófisis y apoyan la hipótesis de que el SHN produce prolactina y la procesa selectivamente hacia un fragmento de 14 kDa.

En apoyo a la hipótesis anterior, nuestros resultados permitieron excluir la posibilidad de que las prolactinas neurohipofisarias pudieran encontrarse en el SHN a consecuencia de su incorporación al sistema nervioso proveniente de la circulación. Si bien la prolactina circulante no atraviesa la barrera hematoencefálica, existen receptores a PRL en los plexos coroides los cuales pudieran internalizar a la hormona e incorporarla al tejido nervioso. Inclusive, se han localizado receptores tanto en el PVN como en el SON, los cuales pudieran internalizar e incorporar a la PRL al SHN (Roky et al., 1996). En el presente trabajo eliminamos la presencia en la circulación de la PRL hipofisaria mediante la hipofisectomía de los animales de experimentación. La inmunotinción con el anti PRL 16K de los núcleos PV y SO provenientes de animales hipofisectomizados mostró que, a pesar de no existir niveles detectables de PRL en sangre, persiste la presencia de los antígenos tipo PRL en los núcleos hipotalámicos del SHN en forma similar a como se observa en ratas intactas (Fig.12). Estos resultados apoyan la posibilidad de que las PRLs neurohipofisarias tengan un origen independiente respecto de las prolactinas de la adenohipófisis y la circulación y por lo tanto confirman su producción independiente.

El apoyo definitivo a la producción local de las prolactinas por el SHN provino de la determinación de la presencia del ARN mensajero de PRL en los PVN y

SON. Recientemente nuestro grupo mostró (Clapp et al., 1994) que los núcleos PV aislados expresan el gen completo de la PRL. Los análisis por Southern de transcritos provenientes de pares de oligonucleótidos correspondientes a diferentes zonas del gen de PRL revelaron la transcripción íntegra del gen de PRL y descartaron la presencia de transcritos de menor tamaño. En este estudio confirmamos la expresión del ARN mensajero de PRL en el PVN y demostramos su expresión en el SON. En estos últimos al igual que en los PVN, el ARN mensajero amplificado corresponde a la secuencia completa de la proteína de 23 kDa y no se encontró ningún fragmento de menor tamaño que pudiera originarse de un procesamiento alternativo del gen de prolactina y ser responsable de la presencia de PRLs de menor peso molecular. En concordancia con estas observaciones, proponemos que la proteína tipo PRL de 14 kDa no proviene de un procesamiento postranscripcional de la PRL, sino de un procesamiento proteolítico. Asimismo, enfatizamos la conclusión de que las prolactinas encontradas en el sistema hipotálamo neurohipofisiario son producidas localmente.

Las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular y supraóptico se distinguen por ser neurosecretoras y recientemente se ha reconocido que poseen la capacidad de expresar múltiples sustancias neuroactivas (Hatton, 1990, y Sawchenko et al., 1992). Sus productos hormonales ingresan a la vía de secreción transportándose hacia las terminales nerviosas en la neurohipófisis donde son vertidos al torrente sanguíneo. Al analizar la posibilidad de que las prolactinas producidas en este sistema pudieran ser secretadas como ocurre con otros neuropéptidos encontramos la presencia de las proteínas inmunorreactivas de 23 y 14 kDa en el medio de incubación de neurohipófisis aisladas (MCNH). No se observó la presencia de la proteína de 25 kDa en el MCNH, por lo que ésta no parece liberarse por las terminales nerviosas en la neurohipófisis y pudiera corresponder a un estado intermediario almacenado de la proteína semiprocesada. Si bien estos resultados eran sugerentes de que las prolactinas neurohipofisiarias podrían secretarse, la presencia de las proteínas inmunorreactivas en el medio de incubación podría también ser producto

de un artefacto, posiblemente a consecuencia del daño al tejido neurohipofisiario durante su procesamiento. Para descartar esta posibilidad y demostrar que las prolactinas neurohipofisiarias son secretadas se abordaron dos enfoques: uno de ellos fue evaluar la secreción de dichas proteínas en presencia de calcio externo en el medio de incubación y otro, evocar la secreción de las prolactinas neurohipofisiarias por medio de un estímulo despolarizante.

Desde los 70's se estableció la importancia de la presencia de calcio en el medio externo para evocar la secreción hormonal por estimulación eléctrica o iónica en la neurohipófisis (Douglas et al., 1971). La despolarización de las terminaciones neurosecretoras en el lóbulo neural provoca el influjo de iones de calcio y el movimiento eventual de los gránulos neurosecretores cerca de la membrana celular, cuya fusión permite la liberación final de los gránulos neurosecretores al espacio extracelular por exocitosis (Poulain et al., 1982). De hecho, el incremento en el calcio intracelular es un requisito indispensable para el proceso de secreción en general, y en particular para la secreción de las hormonas neurohipofisiarias (Nordmann et al., 1982).

Nuestros resultados muestran que la presencia de calcio en el medio se asocia con un aumento en la secreción de las prolactinas neurohipofisiarias. Así, la secreción de la proteína tipo PRL de 14 kDa es mayor cuando se incubó a las neurohipófisis en presencia de calcio que en su ausencia. Asimismo, las prolactinas neurohipofisiarias fueron secretadas en gran cantidad en respuesta a un estímulo despolarizante de 56 mM de K^+ . Los niveles de PRL determinados mediante RIA así como la magnitud de su secreción en respuesta a la despolarización con potasio concuerdan con los valores reportados previamente para la secreción de PRL inmunorreactiva por explantes de hipotálamo incubados *in vitro* (DeVito et al., 1987). Incluso, los niveles no estimulados de las prolactinas se encuentran en el mismo rango de concentración a los niveles no estimulados determinados para vasopresina. Estos resultados son sugerentes de que las prolactinas producidas por el sistema hipotálamo

neurohipofisario entran en la vía neurosecretora mediante un proceso regulado y dependiente de calcio.

En apoyo a la secreción de PRLs por el SHN y en franca concordancia con el carácter neuroendócrino de este sistema, determinamos si la proteína inmunorreactiva de 14 kDa pudiera encontrarse en el suero. Dado que esta proteína es la principal PRL secretada por los explantes hipotálamo - neurohipofisarios y por las neurohipófisis aisladas, sería concebible esperar encontrar una proteína de características similares en la circulación, a consecuencia de su secreción por el HNS. Así, mediante análisis de suero por "Western blots" observamos la presencia de una proteína inmunorreactiva tipo PRL de 14 kDa similar a la encontrada en el sistema hipotálamo neurohipofisario. Existen numerosos reportes que analizan la heterogeneidad molecular de la prolactina en el suero (Shu et al., 1974; Kiefer et al., 1978; Whitaker et al., 1984, Smith et al., 1990; Sinha 1995). En su mayoría se han descrito variantes de prolactina de alto peso molecular (50 -100 kDa) determinadas mediante columnas de filtración en gel y RIA. Análisis posteriores con "Western blots" mostraron la presencia de una proteína tipo PRL de 16 kDa en el suero atribuida a la presencia de PRL cortada en el suero y no a un fragmento hormonal independiente, debido a las condiciones de su análisis (Sinha et al., 1985). En nuestro caso, es claro que la proteína de 14 kDa se encuentra en muestras de suero como una entidad independiente de la prolactina cortada, ya que fue observada tanto bajo condiciones reductoras como no reductoras. Sin embargo, la identificación definitiva de las proteínas tipo PRL de 14 kDa, tanto la circulante como la neurohipofisaria, deberá evaluarse mediante la determinación de sus respectivas secuencias de aminoácidos para ver si resultan idénticas.

La transcripción del gen de PRL en la adenohipófisis es regulada por numerosos factores extracelulares entre los que destacan los estrógenos (Waterman et al., 1988). Es conocido que en la adenohipófisis los niveles del ARN mensajero de PRL varían durante el ciclo estral en la rata (Haisenleder et al., 1989) y aumentan en respuesta a estrógenos. Más recientemente se ha mostrado en la adenohipófisis que el

ARN mensajero para el factor de transcripción específico del gen de PRL denominado Pit-1, también se modifica a lo largo del ciclo estral (Lee et al., 1995) y que dicho factor actúa en conjunto con los estrógenos para estimular la transcripción del gen de PRL (Day et al., 1990). Por otra parte, los estrógenos parecen estimular la expresión de PRL en el hipotálamo (DeVito et al., 1992a). En función de estos hallazgos, es posible considerar que los estrógenos influyan sobre la expresión de las prolactinas neurohipofisarias. En este sentido, nuestros resultados mostraron que la síntesis de las prolactinas por el sistema hipotálamo neurohipofisario se asocia con variaciones en la concentración de estrógenos durante el ciclo estral. Mediante análisis por PCR determinamos que el ARN mensajero de prolactina se expresa marcadamente en el estro en contraste con los otros estados fisiológicos. Estos datos fueron correlacionados con las concentraciones relativas de las prolactinas en extractos neurohipofisarios, las PRLs de 23 y 14 kDa, las cuales se incrementaron durante el estro. Algunos estudios autorradiográficos han mostrado la presencia de receptores para estrógenos en las neuronas magnocelulares de los núcleos PVN y SON (Sar et al., 1980, y Rhodes et al., 1982), sin embargo, la presencia del factor de transcripción para PRL, Pit-1 en el hipotálamo es aún controversial (Emanuele et al., 1992). Dado que el efecto de los estrógenos sobre la transcripción del gen de PRL parece ser mediado exclusivamente por Pit-1, no es claro el mecanismo de acción de los estrógenos para estimular la transcripción del gen de PRL en el hipotálamo. Se requieren estudios más a fondo para determinar la presencia del factor de transcripción Pit-1 en los núcleos PV y SO.

Las implicaciones funcionales de la existencia de la prolactina de 14 kDa en el SHN se desconocen. Su incremento en la neurohipófisis durante el ciclo estral pudiera indicar posibles vínculos con acciones ligadas a la esfera de la reproducción. Por otra parte, esta proteína comparte efectos antiangiogénicos con la PRL 16K. Los medios condicionados de neurohipófisis enriquecidos con la proteína tipo PRL de 14 kDa inhibieron la proliferación de células endoteliales en cultivo y este efecto fue neutralizado por el anti PRL 16K (Clapp et al., 1994 y López-Gómez, et al., 1995).

Si bien no es claro cuales podrian ser las implicaciones de la producción de factores antiangiogénicos por el SHN, es claro que otros reguladores importantes de la angiogénesis se expresan en este sistema. Por ejemplo, se ha encontrado que las neuronas magnocelulares de los núcleos PVN y SON expresan el ARN mensajero de otro factor regulador de la angiogénesis, el factor de crecimiento vascular endotelial o VEGF (Ferrara et al., 1993). Es posible que parte de la regulación del endotelio se lleve a cabo a nivel central, además de la conocida autorregulación a nivel local por las propias células endoteliales (Auerbach et al., 1994).

Otra alternativa sería el que las PRLs neurohipofisarias podrian tener que ver con funciones conocidas del SHN. Estudios recientes en nuestro laboratorio demostraron la colocalización de las prolactinas neurohipofisarias con vasopresina en las mismas neuronas magnocelulares de los PVN y los SON. Más aún, dichas PRLs se encontraron presentes en estructuras semejantes a gránulos secretorios (Mejía et al., 1997). Estos hallazgos podrian vincular a las PRLs neurohipofisarias con mecanismos de regulación de la secreción de vasopresina y/o sus acciones. De esta forma, las PRLs coliberadas junto con vasopresina podrian ejercer efectos locales tanto sobre las terminales nerviosas en la neurohipófisis como a nivel de los núcleos PVN y SON modulando la secreción de vasopresina. A este respecto, se han localizado receptores para PRL tanto en el SON como en el PVN (Crumevolle-Arias et al., 1993 y Roky et al., 1996). Si bien no se ha identificado con precisión cuál de los tres tipos conocidos de receptores para PRL (largo, mediano y corto) está presente en estas neuronas, existe la posibilidad de que la PRL de 14 kDa pudiera interaccionar con ellos, actuando como un agonista parcial de la PRL 23K (López-Gómez et al., 1995). Por otra parte, también se han detectado sitios de unión para la PRL 16K en el cerebro (de la PRL 23K Clapp et al., 1989), diferentes a los receptores conocidos para la PRL 23K y que pudieran constituir receptores específicos para la PRL 16K y probablemente para la PRL 14K.

Por otra parte, las PRLs neurohipofisarias podrian ejercer efectos periféricos una vez secretadas a la circulación. Así, estas hormonas podrian actuar sobre diversos

órganos blanco, incluyendo los de vasopresina. Ya se ha demostrado la influencia de PRL para afectar la homeostasis de líquidos y electrolitos en el riñón (Nicoll, 1980) e incluso se han identificado receptores para PRL en los túbulos renales (Royster et al., 1995). Más aún, sitios de unión para la PRL 16K están presentes en membranas de riñón (Clapp et al., 1989) e incluso los fragmentos de PRL poseen una mayor afinidad de unión a los receptores renales de la PRL 23K que la propia PRL. Por lo tanto, sería concebible que las PRLs neurohipofisiarias contribuyeran a la regulación del balance de líquidos y electrolitos a nivel renal. El estudio de esta posibilidad abre nuevas avenidas para el espectro de acciones de los miembros de la familia de las prolactinas, en particular de aquellas producidas en el SHN.

7. BIBLIOGRAFIA

Albarracin C.T., Gibori G., (1991) prolactin action on luteal protein expression in the corpus luteum. *Endocrinology* 129:1821-1830.

Almers W. (1990) Exocytosis. *Annu. Rev. Physiol.* 52:607-624.

Amara J.F., Van Itallie C., Dannies P.S., (1987) Regulation of prolactin production and cell growth by estradiol: difference in sensitivity to estradiol occurs at level of messenger ribonucleic acid accumulation. *Endocrinology* 120:264-271.

Andries M., Tilemans D., Denef C. (1992) Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochem. J.* 281: 393-400.

Aragona C., Bohnet H.G., Friesen H.G.,(1977) Localization of prolactin binding in prostate and testis: the role of serum prolactin concentration on the testicular LH receptor. *Acta Endocrinol.* 84:402-409.

Aramburo C., Montiel J.L., Proudman J.A., Berghman L.R., Scanes C.G., (1992) Phosphorylation of mammalian and avian prolactin. *J. Mol. Endocrinol.* 8: 183-191.

Arbogast L.A., Voogt J.L. (1991) Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyroxine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* 128:997-1005.

Asawaroengchai H., Russell S.M., Nicoll S.C., (1978) Electrophoretically separable forms of rat prolactin with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Endocrinology* 102:407-414.

Auerbach W., y Auerbach R., (1994) Angiogenesis inhibition: a review. *Pharmac. Ther.* 63:265-311.

Azad N., Duffner L., Paloyan E.B., Reda D., Kirsteins L., Emanuele N.V., Lawrence A.M., (1990) Hypothalamic prolactin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from male rat hypothalamus. *Endocrinology* 127:1928-1933.

Baldocchi R.A., Tan L., Nicoll C.S. (1992) Processing of rat prolactin by rat tissue explants and serum in vitro. *Endocrinology* 130: 1653-1659.

Baranel G., Ixart G., Arancibia S., Assenmacher I., (1986) Probable extrapituitary source of the immunoreactive prolactin measured in the cerebrospinal fluid of unanesthetized rats by push-pull cannulation of the 3rd ventricle. *Neuroendocrinology* 43:476-482.

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

Ben-Jonathan N., Mershon J.L., Allen D.L., Steinmetz R.W., (1996) Extrapituitary prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and clinical aspects. *Endocr. Rev.* 17:639-669.

Bern H.A., Nicoll C.S. (1968) The comparative endocrinology of prolactin. *Recent. Prog. Horm. Res.* 24:681-720.

Brownstein M.J., Mezey E. (1986) Multiple chemical messengers in hypothalamic magnocellular neurons. *Prog. Brain Res.* 68:161-168.

Bridges R. (1985) Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 227:782-784.

Bridges R., Numan M., Ronsheim P.M., Mann P.E., Lupini C.E., (1990) Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid treated nulliparous female rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8003-8007.

Buntin J.D., Lea R.W., Figge G.R., (1988) Reductions in plasma LH concentration and testicular weight in ring dove following intracranial injection of prolactin or growth hormone. *J. Endocrinol.* 118:33-40.

Buntin J.D., Tesch D., (1985) Effects of intracranial prolactin administration on maintenance of incubation readiness, ingestive behavior, and gonadal condition in ring doves. *Horm. Behav.* 19:188-203.

Bridges R. (1985) Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science* 227:782-784.

Cesario T.C., Yousefi S., Carandang G. (1994) Enhanced yields of gamma interferon in prolactin treated human peripheral blood mononuclear cells. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 205:89-95.

Chomczynski P., Sacchi N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159.

Clapp C. (1987) Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121: 2055-2064.

Clapp C., Martinez de la Escalera G., Aguayo D., Mena F., (1987) Regulacion integrativa de la lactancia. *Bol. Estud. Med. Biol. Mex.* 35:63-107.

Clapp C., Sears P.S., Russell D.H., Richards J., Levay-Young B.K., Nicoll C.S., (1988) Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122: 2892-2898.

- Clapp C., Sears P.S., Nicoll C.S., (1989) Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* 125: 1054-1059.
- Clapp C., Weiner R.I. (1992) A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129: 896-900.
- Clapp C., Martial J., Guzman R.C., Rentier-Delrue F., Weiner R.I. (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299.
- Clapp C., Torner L., Gutierrez Ospina G., Alcantara E., Lopez-Gomez F.J., Nagano M., Kelly P.A., Mejia S., Morales M.A., Martinez de la Escalera G. (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:10384-10388.
- Clevenger C.V., Altmann S.W., Prystowsky M.B., (1991) Requirement of nuclear prolactin for interleukin-2 stimulated proliferation of T lymphocytes. *Science* 253:77-79.
- Cohen-Becker I.R., Selmanoff M., Wise P.M., (1986) Hyperprolactinemia alters the frequency and amplitude of pulsatile luteinizing hormone secretion in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology* 42:328-333.
- Cole E.S., Nichols E.H., Lauziere K., Edmunds T., McPherson J.M., (1991) Production of recombinant primate prolactin. *Endocrinology* 129:2639-2646.
- Compton M.M., Witorsch R.J., (1984) Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland. *Endocrinol.* 115:476-483.
- Cooke N.E., Coit D., Weiner R.I., Baxter J.D., Martial J.A. (1980) Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger. *J. Biol. Chem.* 255:6502-6510.
- Crumevolle-Arias M., Latouche J., Jammes H., Djane J., Kelly P.A., Reymond M.J., Haour F. (1993) Prolactin receptors in the rat hypothalamus: autoradiographic localization and characterization. *Neuroendocrinology* 57:457-466.
- Dardenne M., Savino W., Gagnerault M-C, Itoh T., Bach J-F. (1989) Neuroendocrine control of thymic hormonal production. I. Prolactin stimulates *in vivo* and *in vitro* the production of thymulin by human and murine epithelial cells. *Endocrinology* 125:3-12.
- Davis J.R.E. (1990) Tissue-specific regulation of prolactin gene expression. *J. Endocrinol.* 125: 171-173.

Day R.N., Koike S., Sakai M., Muramatsu M., Maurer R.A., (1990) Both Pit-1 and the estrogen receptor are required for estrogen responsiveness of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 4:1964-1971.

DeVito W.J., Connors J.M., Hedge G.A., (1987) Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: In vitro release and subcellular localization. *Neuroendocrinology* 46:155-161.

DeVito W.J. (1988) Heterogeneity of immunoreactive prolactin the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150 (2):599-604.

DeVito W.J. (1989) Immunoreactive prolactin in the hypothalamus and cerebrospinal fluid of male and female rats. *Neuroendocrinology* 50:182-186.

DeVito W.J., Avakian C., Stone S., Ace C.I., (1992) Estradiol increases prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid in selected brain regions in the hypophysectomized female rat. *Endocrinology* 131:2154-2159.

DeVito W.J., Okulicz W.C., Stone S. Avakian C. (1992) Prolactin stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130:2549-2556.

DeVito W.J., Stone S., Shamgochain M. (1995) Prolactin induced expression of glial fibrillary acidic protein and tumor necrosis factor-alpha at a wound site in the rat brain. *Mol. Cell. Endocrinol.* 108:125-130.

Douglas W.W., Poisner A.M. Stimulus-secretion coupling in a neurosecretory organ: the role of calcium in the release of vasopressin from the neurohypophysis. *J. Physiol.* 172:1-18.

Douglas W.W., Sorimachi M., (1971) Electrically evoked release of vasopressin from isolated neurohypophyses in sodium-free media. *Br. J. Pharmacol.* 42:647P.

Drago F., (1984) Prolactin and sexual behavior: A review. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 8:433-439.

Dreifuss J.J. (1975) A review on neurosecretory granules: their contents and mechanisms of release. *Ann. NY Acad. Sci.* 248:184-201.

Dusanter-Fourt I., Belair L., Gespach C., Djiane J., (1992) Expression of prolactin (PRL) receptor gene and PRL-binding sites in rabbit intestinal epithelial cells. *Endocrinology* 130:2877-2882.

Dutt A., Kaplitt M.G., Kow L.M., Pfaff D.W., (1994) Prolactin, Central Nervous System and Behavior: a critical review. *Neuroendocrinology* 59:413-419.

Emanuele N.V., Metcalf L., Wallock L., Tentler J., Hagen T.C., Beer C.T., Martinson D., Gout P.W., Kirteins L., Lawrence A.M. (1987) Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from prolactin. *Brain Res.* 421:255-262.

Emanuele N.V., Azad N., Luckey J.P., Engel J., Melon G., Metcalf L., Gout P.W., Beer C.T., Kirteins L., Lawrence A.M. (1989) Presence of prolactin-like immunoreactivity and bioactivity in rat and spinal cord. *Neuroendocrinol.* 49:331-337.

Emanuele N.V., Jurgens J.K., Halloran M.M., Tentler J.J., Lawrence A.M., Kelley M.R. (1992) The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol. Endocrinol.* 6:35-42.

Ferrara N., Clapp C., Weiner R.I. (1991) The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129: 896-900.

Ferrara N., Houck K., Jakeman L., Leung D.W. (1992) *Endocr. Rev.*, 13:18-32.

Foreman K.T., Lea R.W., Buntin J.D., (1990) Changes in feeding activity, plasma luteinizing hormone, and testes weight in ring doves following hypothalamic injections of prolactin. *J. Neuroendocrinol.* 2:667-673.

Fuchs A.R., Fuchs F., Husslein P., Solof M.S., Fernstrom M.J., (1982) Oxytocin receptors and human parturition: a dual role for oxytocin in the initiation of labor. *Science* 215:1396-1398.

Fuxe K., Hokfelt T., Eneroth P., Gustaffson J.A., Skett P. (1977) Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* 196:899-900.

Gaymann W. Martin R. (1987) A re-examination of the localization of immunoreactive dynorphin (1-8), (Leu) enkephalin and (Met) enkephalin in the rat neurohypophysis. *Neuroscience* 20:1069-1080.

Glick S.M., Kagan A., (1979) Vasopressin. In: Jaffe B.M., Behrman H.R. (eds) *Methods of hormone radioimmunoassay*, ed 2. Academic Press, New York, pp 341-351.

Greenan J.R., Balden E., Ho T.W.C., Walker A.M. (1989) Biosynthesis of the secreted 24K isoforms of prolactin. *Endocrinology* 125:2041-2048.

Gubbins E.J., Maurer R.A., Lagrimini M., Erwin C.R., Donelson J.E., (1980) Structure of the rat prolactin gene. *J. Biol. Chem.* 255: 8655-8662.

Gutierrez-Hartmann A., Siddiqui S., Loukin S. (1987) Selective transcription and DNase I protection of the rat prolactin gene by GH3 pituitary cell-free extracts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5211-5215.

Haisenleder D.J., Ortolano G.A., Landefeld T.F., Zmeili S.M., Marshall J.C.,(1989) Prolactin messenger ribonucleic acid concentrations in 4-day cycling rats and during the prolactin surge. *Endocrinology* 124:2023-2028.

Haller E.W., Sachs H., Sperelaks H., Share L. (1965) Release of vasopressin from isolated guinea-pig pituitaries. *Am. J. Physiol.* 209:79-83.

Harlan R.E., Shivers B.D., Fox S.R., Kaplove K.A., Schachters B.S., Pfaff D.W. (1989) Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology* 49:7-22.

Hatton G.I. (1990) Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophyseal system. *Prog. Neurobiol.* 34:437-504.

Higuchi T., Tadokoro Y., Honda K., Negoro H. (1986) Detailed analysis of blood oxytocin levels during suckling and parturition in the rat. *J. Endocrinol.* 110:251-256.

Ho T.W.C., Greenan J.R., Walker A.M., (1989) Mammoth autoregulation: the differential roles of the 24K isoforms of prolactin. *Endocrinology* 124: 1507-1514.

Hou-Yu A., Lamme A.T., Zimmerman E.A., Silverman A-J. (1986) Comparative distribution of vasopressin and oxytocin neurons in the rat brain using a double-label procedure. *Neuroendocrinology* 44:235-246.

Ingraham H.A., Albert V.R., Chen R., Crenshaw E.B. III, Elsholtz H.P., He X., Kapiloff M.S., Mangalam H.J., Swanson L.W., Treacy M.N., Rosenfeld M.G. (1990) A family of POU-domain and Pit-1 tissue-specific transcription factors in pituitary and neuroendocrine development. *Ann. Rev. Physiol.* 52: 773-791.

Ingraham H.A., Chen R., Mangalam H.J., Elsholtz H.P., Flynn S.E., Lin C.R., Simmons D.M., Swanson L., Rosenfeld M.G., (1988) A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell* 55:519-529.

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

Kiyama H., Emson P.C. (1990) Evidence of the coexpression of oxytocin and vasopressin messenger ribonucleic acids in magnocellular neurosecretory cells: simultaneous demonstration of two neurophysin messenger ribonucleic acids by hybridization histochemistry. *J. Neuroendocrinol.* 2:257-259.

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

Lee B.Y., Kim J.H., Lee C.K., Kang H.M., Kim H.C., Kang S.G. (1995) Changes in mRNA levels of a pituitary-specific trans-acting factor, Pit-1, and prolactin during the rat estrous cycle. *Euro. J. Endocrinol.* 132:771-776.

Login I.S., MacLeod R.M. (1977) Prolactin in human and rat serum and cerebrospinal fluid. *Brain Res.* 132:477-483.

- López Gómez F.J., Torner L., Mejía S., Martínez de la Escalera G., Clapp C. (1995) Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin. *Endocrine* 3:573-578.
- McCarthy M.M., Curran G.H., Siegal H.I. (1994) Evidence for the involvement of prolactin in the maternal behavior of the hamster. *Physiol. Behav.*
- Mangurian L.P., Walsh R.J., Posner B.I., (1992) Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* 131: 698-702.
- Mainoya J.R., Bern H.A., Regan J.W., (1974) Influence of ovine prolactin on transport of fluid and sodium chloride by the mammalian intestine and gallbladder. *J. Endocrinol.* 63:311-317.
- Matera L., Cesano A., Bellone G., Oberholtzer E., (1992) Modulatory effect of prolactin in the resting and mitogen-induced activity of T, K, and NK lymphocytes. *Brain Behav. Immun.* 6:409-417.
- Meister B., Villar M.J., Ceccatelli S., and Hokfelt T. (1990) Localization of chemical messengers in magnocellular neurons of the hypothalamic supraoptic and paraventricular nuclei: an immunohistochemical study using experimental manipulations. *Neuroscience* 37:603-633.
- Meister B. (1993) Gene expression and chemical diversity in hypothalamic neurosecretory neurons. *Molec. Neurobiol.* 7:87-110.
- Mejía S., Morales M.A., Zetina M.E., Martínez de la Escalera G., Clapp C., (1997) Immunoreactive prolactins co-localize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *J. Neuroendocrinol.* (En prensa)
- Mena F., Hummelt G., Aguayo D., Clapp C., Martínez de la Escalera G., Morales M.T. (1992) Changes in molecular variants during in vitro transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology* 130 (6): 3365-3377.
- Mezey E., Kiss J.Z. (1991) Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology* 129:1814-1820.
- Meuris S., Svoboda M., Vilamala M., Christophe J., and Robyn C. (1983) Monomeric pituitary growth hormone and prolactin variants in man characterized by immunoperoxidase electrophoresis. *FEBS letters* 154:111-115.
- Milenkovic L., D'angelo G., Kelly P.A., Weiner R.I. (1994) Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:1244-1247.
- Miller W.L., Eberhardt N.L., (1983) Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocrine Reviews* 4(2): 97-130.

- Mitra I. (1980a) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95(4): 1750-1759.
- Mitra I. (1980b) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary. II. In vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95:1760-1765.
- Montgomery D.W., LeFevre J.A., Ulrich E.D., Adamson C.R., Zukoski C.F. (1990) Identification of prolactin-like proteins synthesized by normal murine lymphocytes. *Endocrinology* 127:2601-2603.
- Mountjoy K., Cowden E.A., Dobbie J.W., Ratcliffe J.G., (1980) Prolactin receptors in kidney. *J. Endocrinol.* 87:47-54.
- Nagy E., Berczi I., (1991) Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology* 128:2776-2784.
- Nelson C., Crenshaw E. B. III, Franco R., Lira S.A., Albert V.R., Evans R.M., Rosenfeld M.G. (1986) Discrete cis-acting genomic sequences dictate the pituitary cell type-specific expression in rat prolactin and growth hormone genes. *Nature* 322: 557-562.
- Nelson C., Albert V.R., Elsholtz H. P., Lu L.E.W., Rosenfeld M.G. (1988) Activation of cell-specific expression of rat growth hormone and prolactin genes by a common transcription factor. *Science* 239:1400.
- Nicoll C.S. (1974) Physiological actions of prolactin. In: *Handbook of physiology. Sect. 7, Vol. IV part 2. Endocrinology.* Ed. Knobil E., Sawyer W.H., pp. 253-393. Washington D.C. Am. Physiol. Soc.
- Nicoll C.S. (1980) Ontogeny and evolution of prolactin's functions. *FASEB J.* 39:2563-2566.
- Nicoll C.S., Mayer G.L., Russell S.M. (1986) Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocr. Rev.* 7:169-203.
- Nishizuka M., Shivers B.D., Leranth C., Pfaff D.W., (1990) Ultrastructural characterization of prolactin-like immunoreactivity in medial basal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 51:249-254.
- Nordmann J.J., Desmazes J.P., Georgescu D. (1982) The relationship between the membrane potential of neurosecretory nerve endings, as measured by voltage-sensitive dye, and the release of neurohypophysial hormones. *Neuroscience* 7:731-737.
- Nordmann J.J., Dreifuss J.J. (1972) Hormone release evoked by electrical stimulation of rat neurohypophyses in the absence of action potentials. *Brain Res.* 45:604-607.

Oetting W.S., Ho T.W.C., Greenan J.R., Walker A.M., (1989) Production and secretion of 21-23.5 kDa prolactin like molecules. *Mol. Cel. Endocrinol.* 61:189-199.

Owerbach D., Rutter W.J., Cooke N.E., Martial J.A., Shows T.B., (1981) The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* 212: 815-816.

Palkovits M. (1983) *Methods Enzymol.* 103:368-376.

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

Poulain D.A., Wakerley J.B., (1982) Electrophysiology of hypothalamic magnocellular neurones secreting oxytocin and vasopressin. *Neuroscience* 7:773-808.

Quintanar A., Quintanar J.L. (1994) Hipofisectomia transfarinea en la rata (Descripcion de la tecnica). *Vet. Mex.* 25:13-17.

Rhodes C.H., Morrell J.I., Pfaff D.W., (1982) Estrogen-concentrating neurophysin-containing hypothalamic magnocellular neurons in the vasopressin-deficient (Brattleboro) rat: a study combining steroid autoradiography and immunocytochemistry. *J. Neuroscience* 2:1718-1724.

Richards J.S., Williams J.L., (1976) Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH). Regulation by LH and PRL. *Endocrinology* 99:1571-1581.

Roky R., Paut-Pagano L., Goffin V., Kitahama K., Valatx J-L., Kelly P.A., Jovet M., (1996) Distribution of prolactin receptors in the rat forebrain. *Neuroendocrinology* 63: 422-429.

Royster M., Driscoll P., Kelly P.A., Freemark M. (1995) The prolactin receptor in the fetal rat: cellular localization of messenger ribonucleic acid, immunoreactive protein, and ligand-binding activity and induction of expression in late gestation. *Endocrinology* 136:3892-3900.

Samson W.K. (1985) Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and hemorrhage-induced vasopressin release. *Neuroendocrinology* 40:277-279.

Sar M., Stumpf W.E., (1980) Simultaneous localization of [3H] estradiol and neurophysin I or arginine vasopressin in hypothalamic neurons demonstrated by a combined technique of dry-mount autoradiography and immunohistochemistry. *Neuroscience letters*, 17:179-184.

Sarkar D.K., Yen S.S.C., (1985) Hyperprolactinemia decreases the luteinizing hormone-releasing hormone concentration in pituitary portal plasma: a possible role for beta-endorphin as a mediator. *Endocrinology* 116: 2080-2084.

- Sarkar D.K. (1989) Evidence for prolactin feedback actions on hypothalamic oxytocin, vasoactive intestinal peptide and dopamine secretion. *Neuroendocrinology* 49:520-524.
- Sawchenko P.E., Imaki T., Vale W. (1992) Colocalization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Found. Symp.* 168:16-42.
- Schachter B.S., Durgerian S., Harlan R.E., Pfaff D.W., Shivers B.D., (1984) Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology* 114:1947-1949.
- Schwartz S.M., Heimark R.L., Majesky M.W., (1990) Developmental mechanisms underlying pathology of arteries. *Physiological reviews* 70 (4): 1177-1209.
- Selmanoff M. (1985) Rapid effects of hyperprolactinemia on basal prolactin secretion and dopamine turnover in the medial and lateral median eminence. *Endocrinology* 116:1943-1952.
- Shah G.N., Hymer W.C. (1989) Prolactin variants in the rat adenohypophysis. *Mol. Cell. Endocrinol.* 61:97-106.
- Shiu R.P.C., Friesen H.G., (1980) Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Annu. Rev. Physiol.* 42:83-96.
- Shu H.K., Frantz A.G. (1974) Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 39:928-935.
- Shull J.D., Gorski J. (1986) The hormonal regulation of prolactin gene expression: an examination of mechanisms controlling prolactin synthesis and the possible relationship of estrogen to these mechanisms. In: *Vitamins and Hormones*, Academic Press Vol. 43, pp.197-247.
- Sinha Y.N., Gilligan T.A., Lee D.W., Hollingsworth D., Markoff E. (1985) Cleaved prolactin; evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 60: 239-243.
- Sinha Y.N., Gilligan T.A. (1984) A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology* 114: 2046-2053.
- Sinha Y.N. (1992) Prolactin variants. *Trends Endocrinol. Metab.* 3:100-106.
- Sinha Y.N. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine rev.* 16:354-369.
- Sladek C.D., y Knigge K.M., (1977) Cholinergic stimulation of vasopressin release from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system in organ culture. *Endocrinology* 101:411-420.

Smith C.R., Norman M.R. (1990) Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann. Clin. Biochem.* 27:542-550.

Swanson L.W., Sawchenko P.E., (1983) Hypothalamic integration: organization of the paraventricular and supraoptic nuclei. *Annu. Rev. Neurosci.* 6:269-324.

Torner L. (1993) Deteccion de la prolactina 16K en la circulacion e hipofisis de la rata. Tesis de Maestria. UNAM, Mexico D.F.

Toubeau G., Desclin J., Parmentier M., Pasteels J.L. (1979) Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J. Endocrinol.* 83:261-266.

Torner M.L., Nicoll C.S., Clapp C. (1991) Identification of 16K prolactin in the serum of rats and mice. 73rd Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington D.C. p 214 (abstract).

Van Wimersma Greidanus T.B., Hellebrekers L.J., (1991) Neurohypophysial hormones and the brain: in Motta M (ed): *Brain endocrinology*. Raven Press, pp. 377-401.

Villar M.J., Meister B., Cortes R., Schalling M., Morris M., Hokfelt T., (1990) Neuropeptide gene expression in hypothalamic magnocellular neurons of normal and hypophysectomized rats: a combined immunohistochemical and *in situ* hybridization study. *Neuroscience* 36:181-199.

Wallis M., Daniels M., Ellis S.A. (1980) Size heterogeneity of rat pituitary prolactin. *Biochem. J.* 189:605-614.

Wallis M. (1981) The molecular evolution of pituitary growth hormone, prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J. Mol. Evol.* 17:10-18.

Wang Y.F., Walker A.M. (1993) Dephosphorylation of standard PRL produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated PRL in the stimulation of Nb2 cell proliferation. *Endocrinology* 133:2156-2160.

Waterman M., Adler S., Nelson C., Green G.L., Evan R.M., Rosenfeld M.G., (1988) A single domain of the estrogen receptor confers DNA binding and transcriptional activation of the rat prolactin gene. *Mol. Endocrinol.* 2:14-21.

Weiner R., Findell P., Ferrara N., Clapp C., Schechter J. (1988) Arteriogenesis and the etiology of prolactinomas. In: *Progress in Endocrinology*. H. Imura et al. editors. pp. 559-566. Elsevier-Science publishers.

Whitaker M.D., Klee G.G., Kao P.C., Randall R.V., Hesser D.W. (1984) Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 58:826-830.

White B.A., Bancroft F.C., (1983) Epidermal growth factor and thyrotropin-releasing hormone interact synergistically with calcium to regulate prolactin mRNA levels. *J. Biol. Chem.* 258:4618-4622.

Windle R.J., Forsling M.L., Smith C.P., (1990) Plasma hormone concentrations accompanying altered sodium excretion in the dehydrated rat. *J. Physiol.* 430:85P.

Wong V.L.Y., Compton M.M., Witorsch R.J. (1986) Proteolytic modification of rat prolactin by subcellular fractions of the lactating rat mammary gland. *Biochim. biophys. Acta* 881:167-172.

8. PUBLICACIONES

The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin

CARMEN CLAPP^{*†}, LUZ TORNER^{*}, GABRIEL GUTIÉRREZ-OSPINA^{*}, EVA ALCÁNTARA^{*}, FRANCISCO J. LÓPEZ-GÓMEZ^{*}, MAKOTO NAGANO[‡], PAUL A. KELLY[‡], SALVADOR MEJÍA^{*}, MIGUEL A. MORALES^{*}, AND GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA^{*}

^{*}Centro de Neurobiología e Instituto de Investigaciones Biológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México DF, México; and [†]Unité 344, Endocrinologie Moléculaire, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, Faculté de Médecine Necker, 75730 Paris Cedex 13, France

Communicated by Howard A. Bern, June 27, 1994

ABSTRACT The 23-kDa form of prolactin (PRL) has been proposed to function as both a mature hormone and a prohormone precursor for different uniquely bioactive forms of the molecule. We have shown that the 16-kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL) inhibits angiogenesis via a specific receptor. In addition, 16K PRL stimulates natriuresis and diuresis in the rat, and kidney membranes contain high-affinity specific binding sites for this PRL fragment. 16K PRL can be derived from an enzymatically cleaved form of PRL (cleaved PRL). With the use of a specific 16K PRL antiserum, we have localized a 14-kDa immunoreactive protein in the paraventricular and supraoptic nuclei of the hypothalamus and in the neurohypophysis. Reverse transcription-polymerase chain reaction of RNA from isolated paraventricular nuclei showed the expression of the full-length PRL mRNA. The neurohypophysis was found to contain the enzymes that produce cleaved PRL, small amounts of PRL, and cleaved PRL. Medium conditioned by neurohypophyseal cultures, enriched with the 14-kDa immunoreactive protein, has antiangiogenic effects that are blocked by the 16K PRL antiserum. These results are consistent with the expression of PRL in the hypothalamic-neurohypophyseal system, and the preferential processing of the protein into a 14-kDa fragment with biological and immunological properties of 16K PRL.

Prolactin (PRL) is a multifunctional protein hormone involved in the control of a wide variety of physiological processes in vertebrates, including osmoregulation, reproduction, immune responses, growth, and development (1, 2). PRL exists in several molecular forms that result from posttranslational modifications of the predominant form, which is a single polypeptide chain with three disulfide loops and a molecular mass of 23 kDa (23K PRL; ref. 3). Molecular heterogeneity of PRL occurs not only in the anterior hypophysis (3) but also in the immune system (4) and the brain (5). These findings have led to the suggestion that PRL can be a prohormone that becomes processed to biologically active peptides capable of mediating unique functions (3).

We have shown that the 16-kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL), while retaining some PRL-like bioactivities (6), has specific effects not shared with the parent PRL molecule. 16K PRL, obtained after the proteolysis of rat PRL with mammary gland enzymes, and recombinant human 16K PRL, but not rat or human PRL, inhibit angiogenesis—i.e., the formation of new capillary blood vessels (7, 8). Furthermore, this antiangiogenic effect appears to be mediated by a unique 16K PRL receptor (9). Besides angiogenesis, other functions appear to be affected by 16K PRL. We have

recently found that 16K PRL, but not PRL, stimulates natriuresis and diuresis in the anesthetized rat (C.C. and W. K. Samson, unpublished observations). Moreover, kidney membranes contain high-affinity specific binding sites for 16K PRL (10). Therefore PRL-derived molecules may be specifically involved in the regulation of angiogenesis, natriuresis, and possibly other functions.

16K PRL can be derived from the reduction of the intermediate disulfide bond that holds together a form of PRL with a cleavage in the large disulfide loop (11). In the rat, the known site of cleavage occurs at Tyr-145, leaving an N-terminal polypeptide with a molecular mass of 16,364 Da (12, 13). Cleaved PRL, the immediate precursor of 16K PRL, has been identified in the anterior pituitary gland and in the circulation (3, 12), and the cleaving enzymes have been found in several target tissues of PRL (3, 5, 11, 14). Detection of endogenous 16K PRL has been limited by its low cross-reactivity with the PRL antibody (6).

Here we report findings consistent with the expression of PRL in the hypothalamic-neurohypophyseal system and its posttranslational processing into a 14-kDa fragment with biological and immunological properties of 16K PRL.

MATERIALS AND METHODS

16K PRL. 16K PRL was isolated after the enzymatic proteolysis of 23K PRL [rat B-6; National Hormone and Pituitary Program (NHPP)] by a particulate fraction from rat mammary gland homogenates, disulfide-bond reduction, and gel filtration as reported (11).

16K PRL RIA. An RIA was established, using an antiserum raised in rabbits against the 16K PRL preparation, at a final dilution of 1:20,000. The specificity of the 16K PRL antiserum was tested by competition with 16K PRL and 23K PRL (rat B-6; NHPP). No crossreactivity was observed with rat growth hormone (NHPP), vasopressin, oxytocin, angiotensin II, and neurophysins I and II (Sigma), β -lipotropin (NHPP), β -endorphin (Pierce), [Met]enkephalin (Peninsula Laboratories), and adrenocorticotropin (residues 1-39; Bachem).

Animals. Female Wistar rats (200–250 g) were used in the day of estrus, as determined by daily examination of vaginal smears for two or three consecutive cycles.

Immunocytochemistry. Rats were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused with phosphate-buffered

Abbreviations: PRL, prolactin; 23K and 16K PRL, 23- and 16-kDa PRL; NHPP, National Hormone and Pituitary Program; bFGF, basic fibroblast growth factor; PVN, paraventricular nucleus; SON, supraoptic nucleus; RT, reverse transcriptase.

To whom reprint requests should be addressed at: Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México DF, México.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

saline (PBS; pH 7.4) for 5 min followed by neutral buffered 4% paraformaldehyde for 45 min. Brain and hypophyses were fixed for 24 h at 4°C, then transferred to 30% (wt/vol) sucrose until they sank. Tissues were sectioned in a cryostat and subjected to immunocytochemistry using the ABC kit from Vector Laboratories. Positive staining with the 16K PRL antiserum was visible in the anterior and neurohypophyses, starting at 1:10,000 and 1:1,000 dilutions, respectively. Most results were obtained with a 1:500 dilution of either anti-16K PRL or anti-PRL (rat S-9; NHPP) antisera.

Western Blot Analysis. Neurohypophyseal lobes were sonicated [1 mg/50 μ l of 0.01 M Tris-HCl/0.14 M NaCl/1% Triton X-100 (pH 8) with aprotinin at 0.2 unit/ml and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride] and subjected to SDS/PAGE (11). Proteins were blotted onto nitrocellulose membranes, probed with the 16K PRL antiserum (1:500), and developed by using the alkaline phosphatase second antibody kit (Bio-Rad).

Incubation of Neurohypophyses. Neurohypophyseal lobes were washed in Ca²⁺-deficient Krebs-Ringer solution for 10 min at 37°C and cultured in 20 μ l of Krebs-Ringer solution for 1 h at 37°C. The resulting conditioned media were pooled and stored at -70°C.

Endothelial Cell Growth Bioassay. Bovine brain capillary endothelial (BBCE) cells were isolated and grown and the proliferation assay was performed as previously reported (8). The effect of 4 days of incubation with 16K PRL, 23K PRL, or neurohypophyseal-conditioned medium was compared with the stimulation induced by basic fibroblast growth factor (bFGF) (50 pM; GIBCO/BRL) in the presence or absence of the 16K PRL antiserum (1:1,000 dilution).

RNA Isolation. Hypothalamic paraventricular nuclei (PVNs) were isolated from frozen brain slices by the micro-punching technique (15). Total RNA was extracted from the PVN, cerebral cortex, and anterior hypophysis according to the guanidinium thiocyanate/phenol procedure (16).

Primers for PCR and Southern Blot Analysis. Four different primers specific for rat (r) PRL cDNA were synthesized. Two of them were forward primers: rPRL-A (5'-TGTCTGGTGCACCTGCCAGACACCT-3') from exon 2 and rPRL-B (5'-ACTTCTCCCTAGCTACTCCTGAAGAC-3') from exon 3. The two downstream primers were rPRL-C (5'-TATCTTTCGATCCCTTCGAGAAGCCG-3') from exon 4 and rPRL-D (5'-GCAGTTGTTTTATGGACAATTTGGCA-3') from exon 5. For the full-length PRL mRNA, the combinations rPRL-A and -C and rPRL-A and -D should generate products of 388 and 586 bp, respectively, whereas rPRL-B and -C and rPRL-B and -D generate products of 220 and 418 bp, respectively. Primers for the amplification of rat cyclophilin were rCyc-1 (5'-CGACATCACGGCTGATGGCGAGCCC-3') and rCyc-2 (5'-TTACAGGGTATTGCGAGCAGATGGGG-3').

Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR). Five micrograms of total RNA was reverse transcribed for 1 h at 37°C in 30 μ l containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM each dNTP, 1 μ g of oligo(dT) primer, 1 μ g of random primer, 25 units of RNasin (Promega), and 200 units of RT (Moloney murine leukemia virus). After incubation, the RT mixture was heated at 96°C for 5 min and chilled on ice. Six microliters of the RT reaction mixture was added to the PCR mixture in 50 μ l containing 20 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 200 μ M each dNTP, 50 pmol of each primer, and 1 unit of Taq DNA polymerase. After denaturation at 95°C for 1 min and 30 sec, amplification was performed for 30 cycles (94°C for 30 sec, 65°C for 1 min, and 72°C for 1 min and 30 sec), followed by 72°C for 10 min at the end of the amplification.

Southern Blot Analysis. Five to 10 μ l of the RT-PCR reaction mixture was loaded on a 1.8% agarose gel and blotted onto Zeta-Probe GT membranes (Bio-Rad). Membranes were hybridized with primer rPRL-B at 42°C for 16 h

in a solution containing 5 \times SSC (1 \times = 150 mM NaCl/15 mM sodium citrate, pH 7.0), 0.02 M NaH₂PO₄, 7% SDS, 10 \times Denhardt's solution, and salmon sperm DNA at 100 μ g/ml, washed at 50°C, and exposed to Kodak XAR-5 film at -80°C.

Analysis of PRL-Cleaving Activity. A 14,000 \times g particulate fraction from isolated PVN or neurohypophyseal lobe homogenates was prepared and incubated with rat PRL (B-6; NHPP) as described (11). The PRL cleavage products were analyzed by Western blots probed with the 16K PRL antiserum.

RESULTS

Specificity of the 16K PRL Antiserum. The 16K PRL antiserum was characterized in a 16K PRL RIA (Fig. 1A). Increasing concentrations of 16K PRL displaced radioiodinated 16K PRL from the 16K PRL antiserum with an EC₅₀ 1/100 that of 23K PRL (0.2 vs. 20 nM, respectively). Western blots probed with the 16K PRL antiserum stained the 23K and 16K PRL standards with similar intensities (Fig. 1B).

Immunocytochemical Detection of a 16K PRL-Like Antigen in the Hypothalamic-Neurohypophyseal System. Immunocytochemistry performed with the 16K PRL antiserum showed a positive signal throughout the anterior hypophysis (Fig. 2B), indistinguishable from that obtained with the 23K PRL antiserum (Fig. 2A). In the neurohypophysis the 16K PRL antiserum showed positive staining homogeneously distributed throughout the section (Fig. 2B), whereas no positive immunoreaction was observed when the 23K PRL antiserum was used (Fig. 2A). Neither antiserum stained the intermediate hypophyseal lobe (Fig. 2A and B). 16K PRL immunostaining was eliminated from both the anterior and neurohypophyses by preabsorption with 16K PRL (1 μ M; Fig. 2C) and 23K PRL (10 μ M; not shown). However, the immunoreaction was not modified by preabsorption with vasopressin (200 μ M), oxytocin (200 μ M), neurophysins I or II (20 μ M; not shown). Cells that corresponded in size to magnocellular neurons were heavily stained with the 16K PRL antiserum in both the hypothalamic PVN and the SON (Fig. 2D and E). Consistent with the location of the immunoreactive perikarya in the above nuclei, nerve fibers were labeled in the internal lamina of the median eminence (Fig. 2F), the pathway of magnocellular neuronal projections from both nuclei towards the neurohypophysis (17).

Western Blot Detection of 16K PRL-Like Antigens in the Hypothalamic-Neurohypophyseal System. Neurohypophyseal extracts and the medium from incubated neurohypophyses were analyzed by Western blots probed with the 16K PRL antiserum (Fig. 3). In neurohypophyseal extracts, the immunoreactivity was associated with a predominant protein band with a migration rate corresponding to an apparent molecular mass of 14 kDa and with less-abundant proteins with appar-

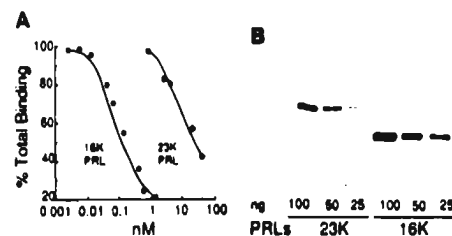


FIG. 1. (A) Displacement of ¹²⁵I-16K PRL from the 16K PRL antiserum (1:20,000) with increasing concentrations of 16K and 23K PRL standards. Values are means of triplicate determinations. (B) Different concentrations of the 23K and 16K PRL standards separated by SDS/PAGE, blotted into a nitrocellulose membrane, and probed with the 16K PRL antiserum (1:500).

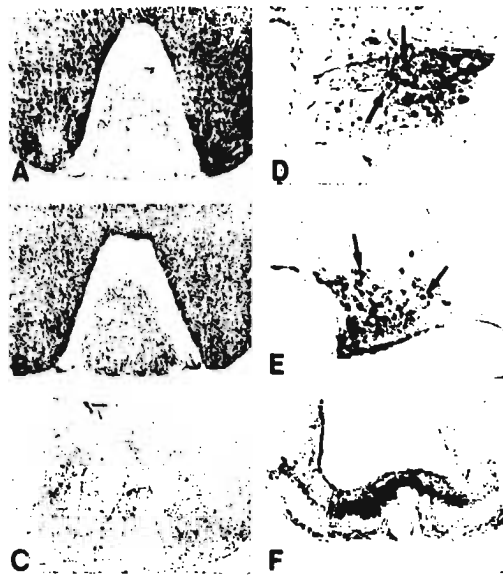


FIG. 2. (A-C) Hypophyseal horizontal sections showing the anterior (AH), intermediate (IH), and neural (NH) lobes: immunoreaction with 23K PRL (A) or 16K PRL (B and C) antisera (1:500). In C, the 16K PRL antiserum was preabsorbed with 16K PRL (1 μ M). (D-F) Immunoreaction with 16K PRL antiserum (1:500) in the hypothalamic PVN (D) and supraoptic nucleus (SON) (E) and in the internal lamina of the median eminence (F). Labeled magnocellular neurons (arrows) are indicated. Results are representative of 10 independent experiments. ($\times 10$.)

ent molecular masses of 23 and 25 kDa. The 14- and 23-kDa immunoreactive proteins were present both under nonreducing conditions and after reduction of the proteins with 5% (vol/vol) 2-mercaptoethanol, whereas the 25-kDa protein disappeared under reducing conditions. Medium conditioned by neurohypophyseal cultures, while being devoid of many of the proteins in the neurohypophyseal extract, consistently showed the presence of the 14- and the 23-kDa immunoreactive proteins. A 5-fold higher concentration of the 14-kDa over the 23-kDa immunoreactive protein was found (15 and 3 ng/ μ l, respectively) in the conditioned medium by densitometric analysis calibrated with different concentrations of the 23K PRL standard. No 25-kDa immunoreactive protein was detected in the conditioned medium by nonreducing

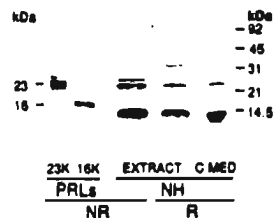


FIG. 3. Blots probed with the antiserum to 16K PRL (1:500) from a neurohypophyseal (NH) extract and medium conditioned (C Med) by incubated neurohypophyses (1 h in Krebs-Ringer solution at 37°C). Proteins were separated by SDS/PAGE under nonreducing (NR) or reducing (R) conditions. The migration positions of 23K and 16K PRL standards and molecular mass markers are indicated at left and right, respectively.

Western blots (not shown). When an equal amount of the 16K PRL standard was added to either the neurohypophyseal extract or the conditioned medium before Western blot analysis, two bands that comigrated with the 16K PRL standard and the 14-kDa immunoreactive protein were observed in both mixtures (not shown).

Inhibition of Endothelial Cell Proliferation by the Conditioned Medium of Incubated Neurohypophyses. At 12.5 nM, 16K PRL inhibited the bFGF-stimulated proliferation of BBCE cells, while the same concentration of 23K PRL had no effect (Fig. 4A). The neurohypophyseal conditioned medium (1:75) inhibited the endothelial cell proliferation stimulated by bFGF, whereas the nonconditioned medium was inactive (Fig. 4B). The inhibition of bFGF-stimulated BBCE cell proliferation by the above concentrations of 16K PRL and the neurohypophyseal conditioned medium was blocked by coincubation with the 16K PRL antiserum (1:1000) (Fig. 4).

Detection of PRL mRNA in the PVN. Total RNA prepared from isolated PVNs was reverse transcribed and amplified by using primers A, B, C, and D complementary to nucleotides in exons 2, 3, 4, and 5 of the rat PRL gene, respectively. Southern blot analysis of the PCR products after an amplification of 30 cycles is shown in Fig. 5. Amplification of the PVN samples with the PRL primer combinations A/C, A/D, B/C, and B/D yielded fragments of 388, 586, 220, and 418 bp, respectively. The sizes of the amplified products were con-

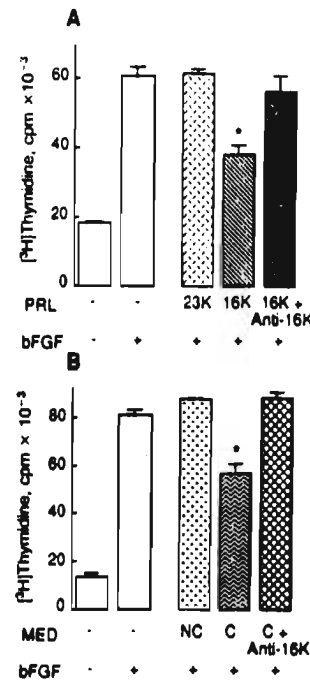


FIG. 4. [3 H]Thymidine incorporation into BBCE cells was measured in response to the following conditions: (A) bFGF (50 pM) alone or in combination with 12.5 nM 23K PRL, 16K PRL, or 16K PRL together with the 16K PRL antiserum (1:1000 dilution). (B) bFGF (50 pM) alone or in combination with nonconditioned (NC) or conditioned (C) media (1:75) or conditioned medium together with the 16K PRL antiserum (1:1000 dilution). Conditioned medium contained the 14-kDa immunoreactive protein at 12.5 nM in the final concentration tested. Values are means of triplicate determinations. \ast , $P < 0.05$ vs. corresponding controls.

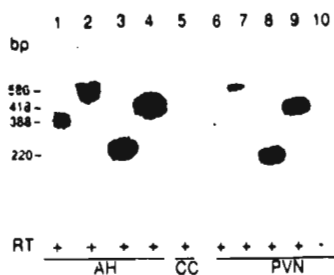


FIG. 5. Southern blot analysis of PCR fragments from reverse-transcribed total RNA from the anterior hypophysis (AH), cerebral cortex (CC), and PVN, amplified (30 cycles) with different rat PRL cDNA primer combinations. Lanes 1 and 6, amplified fragment with primer A and C (388 bp); lanes 2 and 7, primers A and D (586 bp); lanes 3 and 8, primers B and C (220 bp); lanes 4, 5, 9, and 10, primers B and D (412 bp); lane 10, without RT (negative control with RNA). Hybridization was with primer B. The size of the fragments is indicated. Autoradiographs for PVN and CC were exposed for 16 h with an enhancing screen and the autoradiograph for AH, 1 h without screen.

sistent with the predicted sizes for the full-length 23K PRL mRNA and identical to those amplified by the same primer combinations in the anterior hypophysis-positive control. No positive signal was observed in cerebral cortex, where no immunostaining was detected (not shown). Similarly, no signal was detected in the absence of RT (negative controls). The cyclophilin gene was amplified in the PVN and anterior hypophysis (not shown). No smaller products were detected that could relate to an alternative spliced transcript even after a 60-cycle amplification (not shown).

PRL-Cleaving Enzymes in the Hypothalamic-Neurohypophyseal System. The incubation of 23K PRL with acidified membrane extracts from the PVN or neurohypophysis resulted in the proteolysis of added PRL to yield cleaved PRL, as evidenced by Western blots probed with the 16K PRL antiserum carried out under nonreducing and reducing conditions. A 25-kDa immunoreactive protein was generated (not shown), which upon reduction dissociated into 16K PRL (Fig. 6). The PRL-cleaving enzymatic activity of the PVN was less potent than that of the neurohypophysis, since some 23K PRL remained after incubation with the PVN extract but not after the incubation with the neurohypophyseal extract.

DISCUSSION

This report demonstrates the presence of PRL mRNA in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat and indicates at this site not only the synthesis of PRL but also its preferential posttranslational processing into a lower molecular weight form. In addition, we have found a case in which a small molecular weight form of PRL, a 14-kDa fragment, predominates over the full-length 23K PRL. We also show that this 14-kDa molecular form shares immunological and biological properties with 16K PRL, a fragment of PRL with

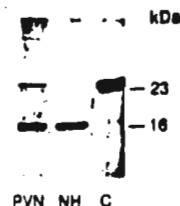


FIG. 6. Reducing Western blot probed with the 16K PRL antiserum showing the proteolysis of PRL (2 µg) after incubation with membranes (3 µg of protein) from the PVN, the neurohypophysis (NH), or in the control incubated without tissue (C). Results are representative of three independent experiments.

well-characterized antiangiogenic properties and recently discovered natriuretic effects.

PRL synthesis has been reported in several extrahypophyseal tissues, including the brain. Production of brain PRL has been supported by immunocytochemical, RIA, and bioassay data from normal and hypophysectomized animals (18–20). Using RT-PCR, Emanuele and colleagues (21) demonstrated the presence of PRL mRNA in whole hypothalamus and in several brain extrahypothalamic regions, indicating the expression of PRL in the brain. Evidence for the molecular heterogeneity of brain PRL has been provided. Different antigenic determinants have been proposed to exist in brain and pituitary PRLs (22), and Western blot analysis has indicated the presence of cleaved PRL in homogenates of whole hypothalamus (5). Moreover, the brain was shown to contain not only the 23K PRL mRNA but also a deletion mutant that encodes a protein with a predicted molecular mass of 16 kDa (21).

In this study we have used polyclonal antibodies directed against the 16-kDa N-terminal fragment of PRL coupled with immunocytochemical techniques to investigate the endogenous localization of 16K PRL-like proteins. The antiserum is specific for 16K PRL with low potency to react with 23K PRL in solution and has no crossreactivity with several major peptides from the hypothalamic-neurohypophyseal system. Immunocytochemical images are consistent with the localization of 16K PRL-like antigens in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat. The immunoreaction was found in magnocellular neurons within the PVN and SON, in their neuronal projections towards the neurohypophysis (internal lamina of the median eminence), and in the neurohypophysis itself.

The finding of PRL in the hypothalamic-neurohypophyseal system is somehow surprising. Using antisera raised against 23K PRL, most reports failed to detect immunoreactive PRL in the PVN and in the neurohypophysis, although they did indicate PRL-immunopositive cells in the SON, but only after the inhibition of axonal transport by colchicine treatment (19). Considering that PRL fragments such as 16K PRL have low immunoreactivity with 23K PRL antibodies (6), we propose that the failure to detect PRL immunoreactivity in this system by prior studies was due to the predominance of small fragments of the protein.

To further characterize the 16K PRL-like antigens found in the hypothalamic-neurohypophyseal system, we analyzed neurohypophyseal extracts by Western blots probed with the 16K PRL antiserum. The immunoreactivity found in the neurohypophysis was associated with a protein of an apparent molecular mass of 14 kDa, and with less abundant 23- and 25-kDa proteins, indicating that the 14-kDa molecule is the main protein recognized by the 16K PRL antiserum in the immunocytochemical studies. In support of the 14-kDa protein as a PRL fragment, we have observed that the discrepancy of ~2 kDa between this protein and 16K PRL does not appear to involve an artefactual protein mobility due to interference with material from the neurohypophyseal samples. 16K PRL standard added to neurohypophyseal extracts or conditioned media migrates to a 16-kDa position as a band distinct from that of the 14-kDa immunoreactive protein. The 14-kDa protein could correspond to a proteolytically processed product of 16K PRL or to an independent product of PRL proteolysis. During recombinant synthesis of primate PRL, Cole and colleagues (23) observed a cleavage site at Ile-133 that could generate a PRL fragment of approximately 14 kDa. Two other immunoreactive proteins were detected in the neurohypophysis that comigrated with 23K PRL and cleaved PRL, respectively. The fact that the 25-kDa protein disappeared under reducing conditions favors its nature as cleaved PRL. However, the 25-kDa protein did not resolve into a 16-kDa band under reducing conditions as would have

been expected for cleaved PRL, albeit a slight contribution of the 25-kDa protein to the 14-kDa band cannot be ruled out. The relatively low amounts of 23K PRL found are in agreement with its lack of detection by immunocytochemical studies.

We found an additional 16K PRL-like property of the 14-kDa immunoreactive protein by analyzing the antiangiogenic bioactivity of the conditioned media of neurohypophyseal cultures. The *in vitro* inhibition of endothelial cell proliferation is a specific effect of 16K PRL not shared with 23K PRL (7, 8). The conditioned medium inhibited BBCE cell proliferation, and this inhibition was blocked by the 16K PRL antiserum. Accordingly, inhibition of endothelial cell proliferation by the conditioned medium involves immunoreactive 16K PRL-like molecules. We have shown that this medium contains two such molecules, a 14-kDa and a 23-kDa protein. The inhibition is not likely to involve the 23-kDa protein, since, as previously reported, and confirmed in this study, 23K PRL is incapable of inhibiting growth of endothelial cells. On the other hand, the 14-kDa immunoreactive protein is present in conditioned medium in a higher concentration (5-fold) than 23K PRL. In fact, the tested dose of the conditioned medium contained the 14-kDa protein at 12.5 nM and displayed an inhibition of magnitude (40%) similar to that produced by 12.5 nM 16K PRL. These results support the idea that the 14-kDa protein could correspond to an endogenous form of PRL with 16K PRL-like actions. Definitive identification of the 14-kDa protein awaits determination of its primary amino acid sequence.

We have investigated whether these members of the PRL family are synthesized locally and whether the 14-kDa form could result from an alternatively spliced PRL message or the posttranslational modification of 23K PRL. In isolated PVNs, RT-PCR amplification and Southern analysis revealed products with the same size of those predicted for the full-length 23K PRL mRNA, and thus, identical to those amplified in the anterior hypophysis. Emanuele and colleagues (21) detected a deletion mutant mRNA in the rat hypothalamus, which lacks exon 4. We failed to detect such a fragment, even when a probe specific to exon 3 was used. These results indicate that the full-length PRL mRNA is expressed in the PVN, and thus support the conclusion that PRLs found in the hypothalamic-neurohypophyseal system are produced locally. Furthermore, the results show that the 14-kDa immunoreactive protein is generated not by an alternative splicing but by the proteolysis and reduction of the 23K PRL molecule. These conclusions are substantiated by the finding of small amounts of 23K PRL and cleaved PRL, together with the PRL-cleaving enzymes in the PVN and the neurohypophysis.

The functional implication of an antiangiogenic factor produced in the hypothalamic-neurohypophyseal system is not clear. Of interest is the fact that magnocellular neurons in both the PVN and SON express high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA (24). A more direct implication for the localization of a 16K PRL-like bioactive molecule at this site is derived from the observation that systemically administered 16K PRL, but not 23K PRL, stimulates sodium and water excretion in the anesthetized rat (C. C. and W. K. Samson, unpublished observations). This finding is consistent with the well-known role of the hypothalamic-neurohypophyseal system in the regulation of fluid and electrolyte homeostasis (25). In this regard it has long been claimed that the neurohypophysis secretes a natriuretic peptide that acts as a Na^+/K^+ -ATPase inhibitor (26). Recently the 2.5-kDa joining peptide of the proopiomelanocor-

tin molecule was purified from neurohypophysis as a Na^+ pump inhibitor, although it has lower activity than expected (27). The presence of the biologically active 14-kDa PRL-like molecule found in the hypothalamic-neurohypophyseal system could contribute to the natriuretic activity found at this site.

We acknowledge the support and critical review of the manuscript by Dr. Willis K. Samson. We thank the National Hormone and Pituitary Program-National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases for their generous gifts of rat PRL and anti-rat PRL antiserum. This work was supported by Grant IN201992 from the National University of Mexico and Grant 1893-N9212 from the National Council of Science and Technology of Mexico.

- Nicoll, C. S. (1980) *Fed. Proc. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 39, 2563-2566.
- Russell, D. H. (1989) *Trends Pharmacol. Sci.* 10, 40-44.
- Sinha, Y. N. (1992) *Trends Endocrinol. Metab.* 3, 100-106.
- Montgomery, D. W., Shen, G. K., Ulrich, E. D., Steiner, L. L., Parrish, P. R., & Zukoski, C. F. (1992) *Endocrinology* 131, 3019-3026.
- DeVito, W. J. (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150, 599-604.
- Clapp, C., Sears, P., Russell, D., Richards, J., Levay-Young, B., & Nicoll, C. S. (1988) *Endocrinology* 122, 2892-2898.
- Ferrara, N., Clapp, C., & Weiner, R. I. (1991) *Endocrinology* 129, 896-900.
- Clapp, C., Martial, J. A., Guzman, R. C., Rentier-Delrie, F., & Weiner, R. I. (1993) *Endocrinology* 133, 1292-1299.
- Clapp, C., & Weiner, R. I. (1992) *Endocrinology* 130, 1380-1386.
- Clapp, C., Sears, P. S., & Nicoll, C. S. (1989) *Endocrinology* 125, 1054-1059.
- Clapp, C. (1987) *Endocrinology* 121, 2055-2064.
- Andries, M., Tilemans, D., & Denef, C. (1992) *Biochem. J.* 281, 393-400.
- Baldocchi, R. A., Tan, L., King, D. S., & Nicoll, C. S. (1993) *Endocrinology* 133, 935-938.
- Compton, M. M., & Witorsch, R. J. (1984) *Endocrinology* 115, 476-484.
- Palkovits, M. (1983) *Methods Enzymol.* 103, 368-376.
- Chomczynski, P., & Sacchi, N. (1987) *Anal. Biochem.* 162, 156-159.
- Swanson, L. W., & Sawchenko, P. E. (1983) *Annu. Rev. Neurosci.* 6, 269-324.
- Toubeau, G., Desclin, J., Parmentier, M., & Pasteels, J. L. (1979) *J. Endocrinol.* 83, 261-266.
- Harlan, R. E., Shivers, B. D., Fox, S. R., Kaplove, K. A., Schachter, B. S., & Pfaff, D. W. (1989) *Neuroendocrinology* 49, 7-22.
- Emanuele, N. V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T. C., Beer, C. T., Martinson, D., Gout, P. W., Kirsteins, L., & Lawrence, A. M. (1986) *Neuroendocrinology* 44, 217-221.
- Emanuele, N. V., Jurgens, J. K., Halloran, M. M., Tentler, J. J., Lawrence, A. M., & Kelley, M. R. (1992) *Mol. Endocrinol.* 6, 35-42.
- Harlan, R. E., & Scammell, J. G. (1991) *J. Histochem. Cytochem.* 39, 221-224.
- Cole, E. S., Nichols, E. H., Lauziere, K., Edmunds, T., & McPherson, J. M. (1991) *Endocrinology* 129, 2639-2646.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L., & Leung, D. W. (1993) *Endocr. Rev.* 13, 18-32.
- Van Wimersma Greidanus, T. B., & Hellebrekers, L. J. (1991) in *Brain Endocrinology*, ed. Motta, M. (Raven, New York), pp. 377-401.
- DeWardener, H. E., & Clarkson, E. M. (1985) *Physiol. Rev.* 65, 658-759.
- Hamakubo, T., Furuta, H., Ichimura, M., Appalsamy, M., Mosqueda-Garcia, R., Robertson, D., & Inagami, T. (1992) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 189, 691-696.

A 14-Kilodalton Prolactin-Like Fragment Is Secreted by the Hypothalamo-Neurohypophyseal System of the Rat*

LUZ TORNER, SALVADOR MEJÍA, FRANCISCO J. LÓPEZ-GÓMEZ, ANDRÉS QUINTANAR[†], GONZALO MARTÍNEZ DE LA ESCALERA, AND CARMEN CLAPP

Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., México

ABSTRACT

The recently described expression of the PRL gene, and the occurrence of a 14-kilodalton (kDa) PRL-like immunoreactive protein in the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat have raised the possibility that PRL variants are released from neurohypophyseal terminals into the blood. In this study, we investigated the local production of a hypothalamo-neurohypophyseal 14-kDa PRL-like protein by showing an independent origin from adenohypophyseal PRL. No 14-kDa PRL-like protein was detected in adenohypophyseal extracts by Western blots, whereas chronic hypophysectomy produced no change in the immunocytochemical detection of PRLs in supraoptic and paraventricular magnocellular neurons. In addition, a 14-kDa

immunoreactive PRL-like protein was released into the medium by incubated neurohypophyseal lobes. Western blot analysis showed that significantly more of this 14-kDa protein was released into calcium-containing medium (1.8 mM) than into calcium-free medium. Furthermore, depolarizing concentrations of potassium (56 mM) increased by 3-fold the release of immunoreactive PRL by incubated hypothalamo-neurohypophyseal explants. In addition, a 14-kDa PRL-like antigen was detected in the circulation of the rat by Western blot analysis. These results are consistent with the local synthesis and calcium-dependent release of neurohypophyseal PRL-like proteins that include a predominant 14-kDa form. (*Endocrinology* 136: 5454–5460, 1995)

NEUROHYPOPHYSEAL hormones are synthesized in magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei and are transported to and released from the neurohypophysis into the system circulation (1). Apart from the two main neurohypophyseal hormones, vasopressin and oxytocin, magnocellular neurons of the supraoptic and paraventricular nuclei synthesize and secrete several other chemical messengers, including angiotensin-II, corticotropin-releasing hormone, galanin, cholecystokinin, neuropeptide-Y, dynorphin, and met-enkephalin (2, 3). The significance of messenger molecules colocalized with the classical neurohypophyseal hormones remains unclear. Local interactions at the level of the hypophysis and effects on peripheral tissues, via their systemic release, are current possibilities (4, 5). On the other hand, independent regulation and effects of the chemical messengers secreted by the neurohypophysis cannot be ruled out.

Recent evidence has suggested that members of the PRL hormonal family are part of the biologically active molecules expressed by the magnocellular paraventricular and supraoptic neurosecretory cells (6). With the use of the reverse transcription-polymerase chain reaction, the full-size PRL messenger RNA was found in isolated hypothalamic paraventricular nuclei (6). Moreover, PRL-like immunoreactivity was detected in magnocellular neurons within both the paraventricular and supraoptic nuclei, and neurohypophyseal

extracts were found to contain PRL-like immunoreactive proteins of 23 and 14 kilodaltons (kDa) that display PRL-like bioactivities (6, 7). These findings support the expression of PRL variants by the hypothalamo-neurohypophyseal system and raise the possibility that, in addition to the adenohypophysis, the neurohypophysis could be a source for circulating chemical messengers related to the PRL family.

Materials and Methods

PRLs

Rat PRL (B-6) of the National Hormone and Pituitary Program (NHPP) was used as the standard monomeric form of 23 kDa (23K PRL) and as the source for the 16-kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL). 16K PRL was generated after the enzymatic proteolysis of 23K PRL by a particulate fraction from rat mammary gland extracts followed by disulfide-bond reduction as reported (8). Subsequently, 16K PRL was isolated by gel filtration and carbamidomethylated as described (9).

Antisera

An antiserum generated in rabbits to 16K PRL was used. The 16K PRL used as immunogen was obtained through the same PRL-proteolytic procedure described above and determined to be more than 95% pure on the basis of Coomassie blue-stained sodium dodecyl sulfate (SDS) gels (8), radioiodination of the preparation followed by SDS-gel autoradiography (9, 10), and Western blot analysis (6). The specificity of this antiserum in a 16K PRL RIA has been reported previously (6). Other PRL-directed antibodies used were the antirat PRL serum (5-9) of the NHPP and a monoclonal antibody, in raw ascites fluid, generated against rat PRL (kindly provided by Dr. Peter Berger, Institut für Biomedizinische Altersforschung, Innsbruck, Austria).

Animals and tissue preparation

Adult male and female Wistar rats (200–250 g) were kept in an environment of constant temperature and controlled day-night cycles with food and water *ad libitum*. Male rats were killed by decapitation,

Received May 30, 1995.

Address all correspondence and requests for reprints to: Dr. Carmen Clapp, Centro de Neurobiología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apdo. Postal 70228, 04510 México D.F. Mexico.

* This work was supported by Grant IN-201895 from the Universidad Nacional Autónoma de México and by Grant CONACYT-1893 from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

[†] Current address: Centro Básico, Universidad Autónoma de Aguascalientes 20100 Aguascalientes, Ags., México.

their pituitary gland was removed, and the pituitary neurointermediate lobe carefully separated from the anterior lobe under a dissecting microscope. Additionally, trunk blood was collected on crushed ice, and sera obtained by microcentrifugation ($12,000 \times g$ for 10 min at 4°C) was stored at -70°C . After decapitation in another group of male rats, the hypothalamo-neurohypophysial system was removed according to the procedure described by Sladek and Krigge (11). Briefly, the brain, with the pituitary gland attached to the stalk, was carefully removed from the skull by a caudal approach. The adenohypophysis was removed under a microscope. A tetrahedral block of tissue was then removed by cutting rostral to the optic chiasm, lateral to either side of the median eminence, caudal to the mammillary bodies, and undercutting at a depth of 1–2 mm. A group of female rats were hypophysectomized by the parapharyngeal approach as described (12) and kept with drinking water supplemented with 5% glucose. Three weeks after hypophysectomy, rats were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused with PBS followed by 4% paraformaldehyde. Brains were postfixed and processed for immunocytochemistry as previously described (6). The completeness of hypophysectomy was determined by visual inspection of the sella turcica and undetectable serum concentrations of PRL by the 23K PRL RIA.

Tissue incubation

Neurohypophysial lobes were rinsed and singly immersed in 20 μl of a Ca^{2+} -deficient Krebs-Ringer buffer (KRB) (127 mM NaCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 3.73 mM KCl, 1.18 mM MgSO_4 , 20 mM NaHCO_3 , 200 mM EGTA, 11.2 mM dextrose), and incubated at 37°C under a mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 . Incubation of the neurohypophysial lobes was carried out for three consecutive 15-min periods in the above KRB followed by additional 15-min incubation in either Ca^{2+} -deficient or complete (1.8 mM CaCl_2) KRB. Medium was collected after each period of incubation and immediately subjected to Western blot-densitometric analysis. For the hypothalamo-neurohypophysial system incubations, the organ explants were briefly washed, immersed individually in 1 ml of complete KRB, and maintained at 37°C under 95% O_2 and 5% CO_2 . After a 20-min equilibration period, the explants were exposed for 15 min to KRB, then for 15 min to KRB containing 56 mM K^+ , then back to the low K^+ KRB for a final 15-min period. (Media with higher K^+ concentrations were prepared by decreasing the concentrations of Na^+ by an equimolar quantity). Medium was collected after each incubation period and stored at -70°C before PRL and vasopressin were measured by the respective RIAs.

Western blots

Neurohypophysial (5 mg) or adenohypophysial (2.5 mg) lobes were sonicated in 100 μl of lysis buffer (0.01 M Tris.HCl/0.14 M NaCl/1% Triton X-100, pH 8.0, with aprotinin at 0.2 U/ml and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Tissue extracts (5 μl) or serum samples (2.5 μl) were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) under reducing or nonreducing conditions, i.e., presence or absence of β -mercaptoethanol, according to Laemmli (13). Proteins were blotted into nitrocellulose membranes and probed with a 1:500 dilution of the 16K PRL antiserum or of 23K PRL-directed antibodies. Color was developed with the use of the alkaline phosphatase second antibody kit (Bio-Rad Labs., Hercules, CA).

RIA

A 16K PRL RIA was established as reported previously (6). Briefly, the 16K PRL standard described above was iodinated by the chloramine-T method modified as described (14). A total of 200 μl of 1:4000 16K PRL antiserum was added to tubes containing 16K PRL standard in assay buffer (0.1% BSA-0.1 M phosphate, 0.15 M NaCl, pH 7.6) or medium samples (200 μl). ^{125}I -labeled 16K PRL (20,000 cpm; 100 μl) and assay buffer to a final volume of 800 μl . Incubations were overnight at room temperature and antigen-antibody complexes were separated by the addition of pansorbine (Calbiochem-Novabiochem Corp., La Jolla, CA) (15 μl /tube). The sensitivity of the assay was 0.2 ng/tube, and the intra- and interassay coefficients of variation were 3% and 9.7%, respectively. The specificity of the 16K PRL RIA has been reported (6). Briefly, the assay has an affinity for 16K PRL that is 100 \times that for 23K PRL, whereas

no cross-reactivity was detected with GH, oxytocin, vasopressin, neurophysins I and II, and other peptides known to be present in the hypothalamo-neurohypophysial system. Parallellism was observed between serial dilutions of the incubation medium from hypothalamo-neurohypophysial explants and the 16K PRL standard competition curve.

The vasopressin concentration in the hypothalamo-neurohypophysial explants incubation medium was measured using a RIA technique, which has been described previously (15). The vasopressin standard (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) was iodinated by the chloramine-T method described by Glick and Kagan (16), and the iodinated vasopressin separated from free iodine by the use of a Sep-pak column (Millipore Corp., Bedford, MA). The vasopressin antiserum was kindly provided by Willis K. Samson (University of North Dakota, Grand Forks, ND). The assay had a sensitivity of 2 pg/tube.

Determination of immunoreactive PRL in serum from hypophysectomized rats was made with a 23K PRL RIA, using standard procedures and materials provided by the NHPP with rat PRL RP-3 as the reference preparation.

Results

Western blot detection of PRL-like molecules in neurohypophysial and adenohypophysial extracts

Cross-reactivity between proteins present in rat neurohypophysial extracts and different PRL antisera was examined by nonreducing Western blots (Fig. 1). As previously described (6), Western blots of neurohypophysial extracts probed with an antiserum directed against the 16-kDa N-terminal fragment of 16K PRL showed predominant immunoreactive proteins of 14, 23, and 25 kDa (Fig. 1, lane 3). Less abundant high molecular weight immunoreactive proteins were also detected (Fig. 1, lane 3). Blots from replicate samples of the same neurohypophysial extract were probed with the 16K PRL antiserum preabsorbed with 1 μM concentration of the standard preparation of 16K PRL (Fig. 1, lane 4), with a polyclonal antiserum raised against 23K PRL (Fig. 1, lane 5), or with a monoclonal antibody against rat 23K PRL (Fig. 1, lane 6). The preabsorption of the 16K PRL antiserum

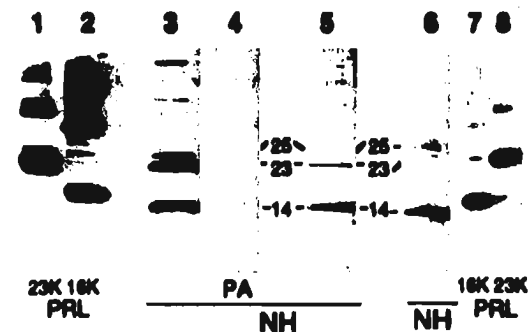


FIG. 1 Western blot identification of PRL-like antigens in neurohypophysial extracts. Western blots from a neurohypophysial extract (lanes 3–6) and 23K PRL and 16K PRL standards (lanes 1, 2, 7, and 8) were probed with antisera (1:500) against 16K PRL (lanes 1–4), 23K PRL (lane 5), or with a monoclonal 23K PRL antibody (lanes 6–8). In lane 4, 16K PRL antiserum was preabsorbed (PA) with 1 μM 16K PRL. Migration rates of the 25-, 23-, and 14-kDa immunoreactive proteins are indicated. SDS-PAGE was carried out under nonreducing (absence of β -mercaptoethanol) conditions. Results are representative of three independent experiments.

blocked the staining of the 14-, 23-, and 25-kDa immunoreactive proteins. On the other hand, both the polyclonal and monoclonal anti-23K PRL antibodies reacted with all three proteins, though the stained bands were less conspicuous than those observed with the 16K PRL antiserum. All antibodies reacted with both 16K PRL and 23K PRL standards (Fig. 1, lanes 1 and 2, probed with anti 16K PRL; lanes 7 and 8, probed with monoclonal anti 23K PRL).

To further substantiate that these PRL variants are synthesized within the neurohypophyseal system and thus independent from PRL produced in the anterior pituitary, the pattern of immunoreactive proteins in extracts of the adenohypophysis was examined by Western blots probed with the 16K PRL antiserum and compared with that in extracts of the neurohypophysis (Fig. 2). Western blots of reduced adenohypophyseal extracts showed a predominant immunoreactive 23-kDa band, plus a clear and discrete immunoreactive protein with an apparent molecular mass of 16 kDa (Fig. 2A). In the absence of β -mercaptoethanol, i.e., under nonreducing conditions, the 23-kDa immunoreactive variant was again largely predominant and immunoreactive pro-

teins with apparent molecular masses of 25 and 16 kDa were resolved. No immunoreactive protein of 14 kDa was detected in adenohypophyseal extracts under reducing or nonreducing conditions. On the other hand, in both reduced and nonreduced neurohypophyseal extracts, the major immunoreactive component corresponded to a 14-kDa protein, whereas the 23-kDa protein was less intense (Fig. 2B). Thus, in the neurohypophysis a 14-kDa immunoreactive PRL variant predominates over the 23-kDa form, and no immunoreactive variant of 16 kDa is detected. Conversely, in the adenohypophysis the predominant immunoreactive PRL form corresponds to a variant of 23 kDa, whereas a 16-kDa PRL form is less abundant, and no 14-kDa immunoreactive protein is detected.

Immunocytochemical detection of PRL-like antigens in paraventricular and supraoptic nuclei of hypophysectomized rats

To further support the independent origin of the neurohypophyseal PRL-like antigens from PRL produced in the anterior pituitary, the presence of PRL antigens in neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei was examined by means of immunocytochemistry in female rats hypophysectomized 3 weeks earlier. Magnocellular neurons of the paraventricular and supraoptic nuclei were positively stained with the anti-16K PRL antiserum (Fig. 3, A and B). Immunostaining was eliminated by preabsorption with the 16K PRL standard (1 μ M) (Fig. 3, C and D).

In vitro release of immunoreactive PRL variants by cultured neurohypophyseal and hypothalamo-neurohypophyseal explants

To investigate the possibility that PRL-like antigens within the hypothalamo-neurohypophyseal system enter the secretory pathway and thus are released by neurohypophyseal terminals, we studied the basal, stimulated, and Ca^{2+} -dependent release of immunoreactive PRL variants by incubated neurohypophyseal lobes and hypothalamo-neurohypophyseal explants. Neurohypophyseal lobes were incubated either in Ca^{2+} -deficient KRB for four consecutive 15-min periods or in Ca^{2+} -deficient KRB for three consecutive 15-min periods followed by an additional 15-min period with KRB containing 1.8 mM Ca^{2+} . The presence and relative concentration of PRL variants in the media were analyzed by Western blots probed with the 16K PRL antiserum. As shown in Fig. 4A, 14 and 23 kDa PRL variants were detected in all medium samples. The detected amounts of the 14-kDa immunoreactive PRL variant in the absence of Ca^{2+} declined throughout the time, i.e., the immunoreactive band was less intense in the medium from the 45- to 60-min incubation period than from the 30- to 45-min incubation period (Fig. 4, A and B). In contrast, the addition of Ca^{2+} during the last (45-60 min) period prevented the decline in the concentration of this PRL variant observed in the absence of Ca^{2+} (Fig. 4, A and B). Densitometric analysis of five independent experiments, in which the band density value of the last incubation period was expressed relative to the respective value of the preceding period, showed that significantly

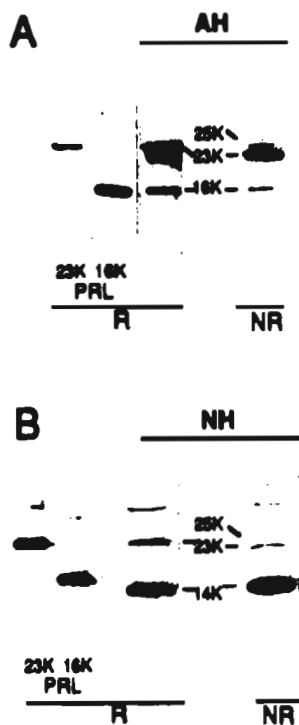


FIG. 2. Western blot detection of PRL-like antigens in adenohypophyseal and neurohypophyseal extracts. Western blots probed with the antiserum to 16K PRL (1:500) from adenohypophyseal (AH; A) or neurohypophyseal (NH; B) extracts. Proteins were separated by SDS-PAGE under reducing (R) or nonreducing (NR) conditions (with or without β -mercaptoethanol). Migration rates of the 25-, 23-, and 14-kDa immunoreactive proteins are indicated. Results are representative of five independent experiments.

FIG. 3 Immunocytochemical detection of PRL antigens in paraventricular and supraoptic nuclei from hypophysectomized rats. Horizontal sections showing hypothalamic paraventricular (A, C) and supraoptic (B, D) nuclei of hypophysectomized rats immunostained with antiserum to 16K PRL (1:500). C and D, 16K PRL antiserum was preabsorbed with 16K PRL ($1 \mu\text{M}$). Magnification, $\times 10$. Results are representative of five independent experiments.

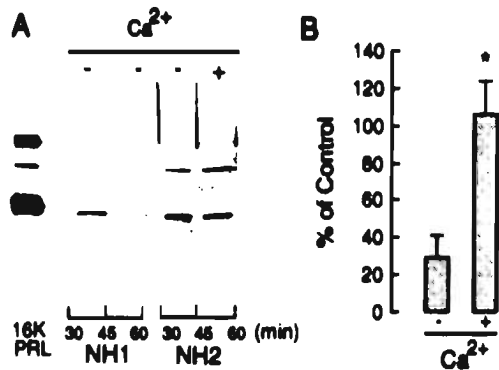
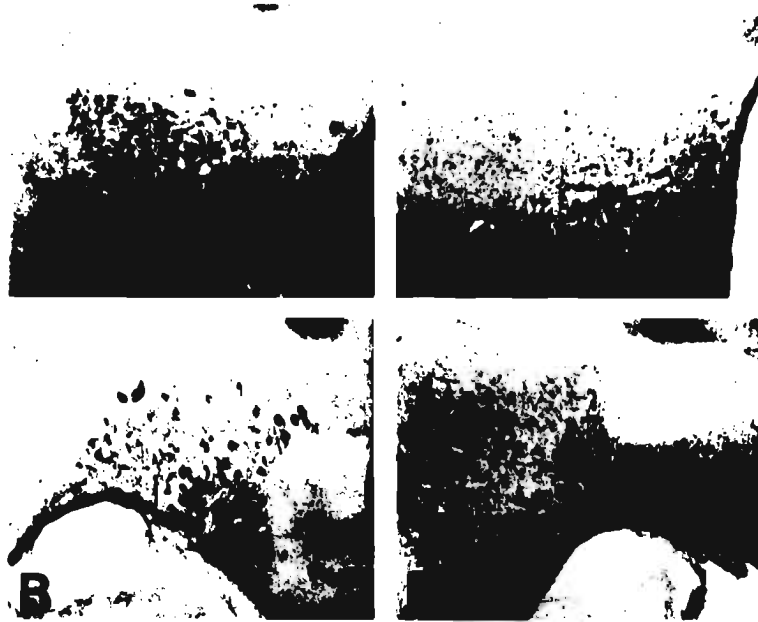


FIG. 4 Release of a 14-kDa PRL-like protein into medium of neurohypophyses incubated in the presence or absence of calcium. A, Western blots probed with 16K PRL antiserum (1:500) of media conditioned by two neurohypophyseal explants (NH1 and NH2). Blots from media of last two of four consecutive 15-min periods are shown. NH1 was in Ca^{2+} -deficient medium throughout incubation. NH2 was incubated in Ca^{2+} -containing medium (1.8 mM CaCl_2) only during the 45- to 60-min incubation period. B, Densitometric values of 14-kDa protein band from five independent experiments. Values of last incubation period (45-60 min) are expressed relative to values measured during previous 30- to 45-min period (means \pm SEM. * $P < 0.05$ vs. values without calcium ($-\text{Ca}^{2+}$)).

more 14-kDa PRL-like antigen was released into the Ca^{2+} -containing than into the Ca^{2+} -deficient medium (Fig. 4B). No significant differences were observed for the 23-kDa PRL-like antigen (not shown).

The *in vitro* release of immunoreactive PRL variants was further investigated by cultured explants of the whole rat

hypothalamo-neurohypophyseal system. The use of the incubated explants for studying hormonal release was validated measuring the levels of vasopressin by RIA in response to depolarizing concentrations of K^+ (56 mM). A challenge with high K^+ for 15 min increased the concentration of vasopressin in the incubation medium by 18-fold (Fig. 5A). Returning the concentration of K^+ to 5 mM during the subsequent 15-min period caused a substantial reduction in the levels of vasopressin found in the medium. Concomitantly, in the same medium samples we measured the concentration of immunoreactive PRL variants by a RIA for 16K PRL. Raising K^+ levels significantly increased the concentration of immunoreactive PRL-like antigens in the medium by more than 3-fold the basal values (Fig. 5B). Returning the concentration of K^+ to 5 mM during the subsequent 15-min period caused a substantial reduction in the levels of immunoreactive PRL-like antigens in the medium to a value similar to those of the prestimulated period.

Western blot detection of a 14-kDa PRL-immunoreactive protein in rat serum

Serum samples from male rats were analyzed by Western blots probed with the 16K PRL antiserum (Fig. 6). A clear-cut immunoreactive protein with an apparent molecular mass of 14 kDa was detected (Fig. 6A). An immunoreactive protein with an apparent molecular mass of 23 kDa was also observed. However, the latter was not always resolved from the artifacts created by higher molecular weight serum proteins. In support of the specificity of the 16K PRL antiserum, no 14- or 23-kDa positive bands were detected when replicate serum samples were blotted and probed with the 16K PRL antiserum preabsorbed with $1 \mu\text{M}$ 16K PRL or probed with

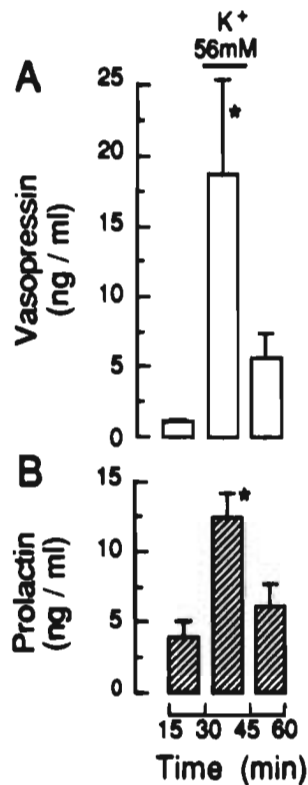


FIG. 5 Effect of potassium depolarization on release of immunoreactive PRL by hypothalamo-neurohypophyseal explants. Effects of high K^+ concentrations (56 mM) on the release of immunoreactive vasopressin (A) and PRL (B) from hypothalamo-neurohypophyseal explants incubated individually in 1 ml of KRB. Each bar represents means \pm SEM of six replicates. *, $P < 0.05$ vs. previous basal values.

normal rabbit serum. The 14-kDa PRL immunoreactive protein was observed both under reducing and nonreducing Western blots (Fig. 6B).

Discussion

The results presented here are consistent with the hypothesis that a 14-kDa fragment of PRL is locally produced in magnocellular neurons of the supraoptic and paraventricular nuclei and released from their neurohypophyseal nerve endings into the circulation.

The nature of the neurohypophyseal 14-kDa protein as a PRL fragment is suggested by its immunoreactivity to different PRL-directed antibodies. Western blot analyses revealed that, in addition to the interaction with an antiserum directed against the 16-kDa amino-terminal fragment of PRL (16K PRL), confirming previous results (6), the 14-kDa protein present in neurohypophyseal extracts cross-reacts with monomeric PRL (23K PRL)-directed polyclonal and monoclonal antibodies. Moreover immunostaining of the 14-kDa

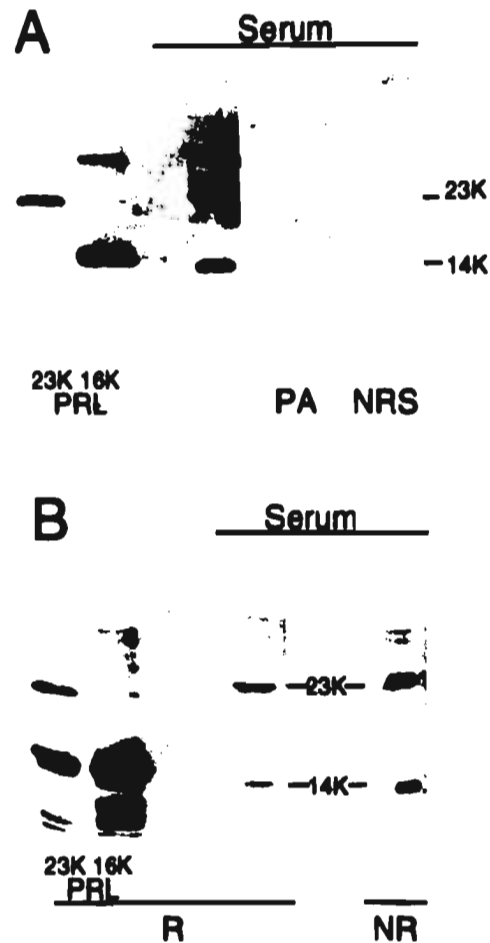


FIG. 6 Western blot detection of a 14-kDa PRL-like antigen in serum. A. Reducing Western blots from rat serum probed with antiserum (1:500) against 16K PRL before and after preabsorption (PA) with 1 μ M 16K PRL or with normal rabbit serum (NRS). B. Reducing (R) and nonreducing (NR) Western blots from serum probed with 16K PRL antiserum (1:500). Results are representative from five independent experiments.

protein was blocked by the preabsorption of the 16K PRL antiserum with 16K PRL standard. These results indicate that the 14-kDa protein contains antigenic determinants present on both 23K PRL as well as 16K PRL. Moreover, in a recent study, we showed that the neurohypophyseal 14-kDa protein displays actions characteristic of 16K PRL and 23K PRL (6, 7). Neurohypophyseal-conditioned medium enriched with the 14-kDa immunoreactive protein inhibited in a dose-dependent fashion the proliferation of endothelial cells in culture, an effect exerted by 16K PRL but not by 23K PRL. This conditioned medium also produced a dose-related stimulation of the proliferation of Nb2-lymphoma PRL-dependent cells. Both of these effects were neutralized by PRL-

directed antisera (7). Definitive identification of the nature of the 14-kDa protein awaits determination of its primary amino acid sequence.

In agreement with the local synthesis of the 14-kDa PRL-like protein in the hypothalamo-neurohypophyseal system, our results showed the independence of this protein from PRLs produced in the adenohypophysis. We were unable to detect the 14-kDa immunoreactive protein in adenohypophyseal extracts, and thus were able to exclude the possibility that the neurohypophyseal 14-kDa PRL-like protein could be the result of contamination with PRLs from adenohypophyseal lactotropes. In this regard, a number of studies have reported that the adenohypophysis contains low molecular mass PRL-like immunoreactive variants within a 22- to 4-kDa range (17-20). However, detection of these PRL-like fragments has been inconsistent, and their contribution has always been minor with respect to that of the major 23-kDa PRL form (17-19), whereas in the neurohypophyseal extracts and conditioned medium, the 14-kDa immunoreactive protein predominates over the 23-kDa PRL-like variant.

The possibility remained, however, that the 14-kDa PRL-like protein could originate within the neurohypophysis from circulating 23K PRL coming from the adenohypophysis. Nevertheless, this possibility was refuted by the fact that hypophysectomy, leading to undetectable serum PRL levels, did not prevent the immunocytochemical detection of PRLs in the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei previously observed in intact rats (6).

The local production of neurohypophyseal PRLs recently was further supported by the reverse transcription-polymerase chain reaction determination of the full-size PRL messenger RNA in isolated paraventricular hypothalamic nuclei (6). Because no smaller size transcript could be detected, it was suggested that the 14-kDa immunoreactive protein was not generated by alternative splicing but by the proteolysis and reduction of 23K PRL. The fact that this 14-kDa variant is found in the neurohypophysis but not in the adenohypophysis indicates that tissue-specific cleaving mechanisms may operate for the formation of the 14-kDa PRL molecule in the hypothalamo-neurohypophyseal system. In contrast, we were able to detect a minor 16-kDa immunoreactive protein in adenohypophyseal extracts under reducing and nonreducing conditions. The existence of this PRL variant is controversial (17, 21) because its detection appears to be influenced by the nature of the antibodies used. We have observed that although both 23K PRL- and 16K PRL-directed antisera react with adenohypophyseal 16K PRL, a much less conspicuous 16-kDa band is detected in Western blots probed with the 23K PRL than with 16K PRL antiserum (unpublished observations). Accordingly the posterior and anterior lobes of the hypophysis differ, both qualitatively and quantitatively, in their capacity to proteolytically process PRL. Proteolysis in the neurohypophysis results in a 14-kDa fragment, whereas in the adenohypophysis it generates a 16-kDa fragment. Moreover, in the neurohypophysis most of the PRL is proteolytically processed, whereas in the adenohypophyses only a small proportion of PRL gets cleaved. The similar nature of the 14- and 16-kDa PRL-like fragments is substantiated by the fact that they

appear to share at least one biological property, i.e., the inhibition of endothelial cell proliferation (6, 7, 10).

Differentiation of neurosecretory cells of the hypothalamo-neurohypophyseal system involves the synthesis and release of peptide hormones into the blood. Accordingly, locally produced PRLs, including the 14-kDa fragment, could also enter the secretory pathway and be released into the circulation. We investigated this possibility by studying whether incubated neurohypophyseal lobes released PRLs through a Ca^{2+} -dependent mechanism. Western blot analyses showed more 14-kDa PRL-like protein being released into the medium of neurohypophyses incubated in the presence of Ca^{2+} than in the absence of Ca^{2+} , showing both Ca^{2+} -dependent as well as Ca^{2+} -independent release. The Ca^{2+} -independent release of 14-kDa PRL may be due, at least in part, to a leak from the cut neurohypophyseal nerves. To avoid such an artifact, we studied the release of neurohypophyseal PRLs by organ-incubated explants of the hypothalamo-neurohypophyseal system. The incubation of hypothalamo-neurohypophyseal explants has been proven adequate to study the physiological release of neurohypophyseal hormones (11, 22). We validated its use in our hands by determining the release of vasopressin together with that of PRLs. The higher volume of medium required for the incubation of the explants determined the use of RIAs, as a substitute to the less-sensitive Western blots. Vasopressin levels were within the range of those previously reported for a similar incubation system (11). Moreover, depolarizing concentrations of K^+ (56 mM) produced a marked (18-fold) stimulation of vasopressin release that returned to basal values on removal of the stimulus. Accordingly, the incubated hypothalamo-neurohypophyseal explants contained intact, responsive vasopressin-secretory neurons and thus were suitable for our studies. Immunoreactive PRLs were also detected by the 16K PRL RIA in the medium of the incubated explants. Likewise, the release of immunoreactive PRLs was stimulated by K^+ depolarization in a reversible fashion. The measured RIA PRL levels, as well as the magnitude of their release in response to high K^+ , are similar to values previously reported for the release of immunoreactive PRL from whole hypothalamus incubated *in vitro* (23). Moreover, the basal levels of PRLs and vasopressin were within a similar range. Taken together these results suggest that PRLs are being released from the hypothalamo-neurohypophyseal system via a Ca^{2+} -dependent mechanism. The fact that PRL-like peptides, found in magnocellular somas and in the neurohypophysis, appear to be released by a Ca^{2+} -dependent exocytotic mechanism in a manner parallel to vasopressin, provides evidence to suggest their intragranular location and their regulated release into the system circulation.

PRL immunoreactive values measured by RIA in the medium conditioned by incubated hypothalamo-neurohypophyseal explants are likely to correspond primarily to the 14-kDa PRL-like protein, because this is the predominant PRL immunoreactive protein found in neurohypophyseal incubation medium (7, and present results), and is the only one to show a Ca^{2+} -dependent release by incubated neurohypophyseal lobes. Accordingly, our results would suggest that the 14-kDa PRL fragment produced in the hypothalamo-neurohypophyseal system may be released into the circula-

tion and thus would be present in blood. In this regard, Western blots probed with the 16K PRL antiserum showed that serum samples contain an immunoreactive protein with an apparent molecular mass of 14 kDa. The PRL-like nature of this protein was further supported by lack of reaction with either the 16K PRL antiserum preabsorbed with 16K PRL or with a preimmune serum.

A number of studies have analyzed the molecular heterogeneity of PRL in serum (19, 24, 25). Most of the reports have dealt with high molecular weight forms of PRL examined through gel permeation chromatography and RIA determinations (24–28). More recently, Western blot analysis of human serum samples has shown the presence of a 16-kDa PRL-like protein (29). However, due to the reducing conditions of the assay used, it was not clear to what extent the detected PRL-like fragment was the consequence of reduced cleaved PRL or of the fragment itself. We now have observed the 14-kDa PRL-like protein in serum, both under reducing and nonreducing conditions, demonstrating its existence independent of that of a precursor cleaved PRL molecule. Due to their close migration rate, it is possible that the protein in serum previously designated as 16 kDa may be 14 kDa. Alternatively, the antiserum used in our study might be more sensitive to detection of the 14-kDa PRL-like protein than the 16 kDa-PRL variant in serum. The functional implications of this circulating 14-kDa PRL-like protein awaits its purification and will be addressed by future experiments.

Acknowledgments

We are indebted to Drs. Peter Berger and Willis K. Samson for their kind generosity in providing us with the rat PRL monoclonal antibody and the vasopressin antiserum, respectively. We thank the National Institute of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases as well as the National Hormone and Pituitary Program for their generous gifts of rat PRL and antirat PRL antiserum.

References

- Brownstein MJ, Russell JT, Gainer H 1980 Synthesis, transport and release of posterior pituitary hormones. *Science* 207:373–378
- Swanson LW 1987 The hypothalamus. In: Björklund A, Hökfelt T, Swanson LW (eds) *Handbook of Chemical Neuroanatomy*. Elsevier, Amsterdam, vol 5:1–124
- Meister B, Cortés R, Villar MJ, Schalling M, Hökfelt T 1990 Peptides and transmitter enzymes in hypothalamic magnocellular neurons after administration of hyperosmotic stimuli: comparison between messenger RNA and peptide/protein levels. *Cell Tissue Res* 260:279–297
- Meister B 1993 Gene expression and chemical diversity in hypothalamic neurosecretory neurons. *Mol Neurobiol* 7:87–110
- Sawchenko PE, Imaki T, Vale W 1992 Colocalization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Found Symp* 168:16–42
- Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, Alcántara E, López-Gómez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G 1994 The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:10384–10388
- López-Gómez FJ, Torner L, Mejía S, Martínez de la Escalera G, Clapp C 1995 Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin. *Endocrine* 3:573–578
- Clapp C 1987 Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121:2055–2064
- Ferrara N, Clapp C, Weiner R 1991 The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129:896–900
- Clapp C, Sears PS, Nicoll CS 1989 Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* 125:1054–1059
- Sladek CD, Knigge KM 1977 Cholinergic stimulation of vasopressin release from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system in organ culture. *Endocrinology* 101:411–420
- Quintanar A, Quintanar JL 1994 Hipofisectomia transfaringea en la rata (Descripción de la técnica). *Vet Mex* 25:13–17
- Laemmli UK 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680–685
- Barkey RJ, Shani J, Goldhaber G, Barzilai D 1981 Binding of iodinated rat and ovine prolactins to prolactin receptors and to its antibodies. *Mol Cell Endocrinol* 23:105–113
- Samson WK 1985 Atrial natriuretic factor inhibits dehydration and hemorrhage-induced vasopressin release. *Neuroendocrinology* 40:277–279
- Glick SM, Kagan A 1979 Vasopressin. In: Jaffe BM, Behrman HR (eds) *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, ed 2. Academic Press, New York, pp 341–351
- Sha GN, Hymer WC 1989 Prolactin variants in the rat adenohypophysis. *Mol Cell Endocrinol* 61:97–106
- Powers AC, Hatala MA 1990 Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: *in vitro* reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin *in vivo*. *Endocrinology* 127:1916–1927
- Mitra I 1980 A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem Biophys Res Commun* 95:1750–1759
- Sinha YN 1992 Prolactin variants. *Trends Endocrinol Metab* 3:100–106
- Casabiell X, Robertson MC, Friesen HG, Casanueva FF 1989 Cleaved prolactin and its 16K fragment are generated by an acid protease. *Endocrinology* 125:1967–1972
- Armstrong WE, Sladek CD, Sladek Jr JR 1982 Characterization of noradrenergic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology* 111:273–279
- DeVito W, Connors JM, Hedge GA 1987 Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: *in vitro* release and subcellular localization. *Neuroendocrinology* 46:155–161
- Subramanian MG, Gala RR 1986 Do prolactin levels measured by RIA reflect biologically active prolactin? *J Clin Immunoassay* 9:42–52
- Smith CR, Norman MR 1990 Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem* 27:542–550
- Stevens RW, Lawson DM 1977 Size heterogeneity of plasma prolactin in the female rat following various natural, pharmacological and stressful stimuli. *Life Sci* 20:1961–1969
- Gala RR, Hart IC 1980 Serum prolactin heterogeneity in the cow and goat. *Life Sci* 27:723–727
- Suh HK, Frantz AG 1974 Size heterogeneity of human prolactin in plasma and pituitary extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 39:928–935
- Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D, Markoff E 1985 Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 60:239–243



Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin

F.J. López-Gómez, L. Torner, S. Mejía, G. Martínez de la Escalera & C. Clapp

Neurobiology Center, National University of Mexico, 04510 Mexico City, Mexico

We have described the expression of the prolactin (PRL) gene and the occurrence of PRL-like immunoreactive proteins in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat. Here, we investigated the nature of neurohypophyseal PRL-like antigens, by studying the biological activity of medium conditioned by incubated neurohypophyses in specific bioassays for PRL and for the 16 kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL). Neurohypophyseal conditioned medium (NHCM) obtained after incubating neurohypophyseal lobes (1 h at 37°C) was enriched with proteins of 14 kDa and 23 kDa, that crossreacted with PRL- and 16K PRL-directed antisera. The NHCM stimulated in a dose-dependent fashion the proliferation of Nb2-lymphoma PRL-dependent cells. This effect paralleled that of PRL and 16K PRL standards and was neutralized by different dilutions of both PRL- and 16K PRL-antisera. Also, the NHCM inhibited the proliferation of endothelial cells in culture, an antiangiogenic-effect exerted by 16K PRL. The antiangiogenic effect of the NHCM was parallel to that of 16K PRL standard and neutralized by 16K PRL antiserum in a dose-dependent fashion. These results indicate that NHCM contains proteins that share receptor activation properties as well as antigenic determinants with both PRL and 16K PRL.

Keywords: brain prolactin; prolactin isoforms; neurohypophysis; angiogenesis; Nb2 cells

Introduction

Prolactin (PRL) is a polypeptide hormone that exhibits a wide spectrum of molecular polymorphism. The major variant form of PRL, constituted by a single polypeptide chain with a molecular mass of 23 kDa (23K PRL), is known to be subjected to post-translational modifications that include glycosylation, phosphorylation and specific proteolytic processing (Sinha, 1992). Posttranslational events have been proposed as mechanisms for generating diversity in the biological actions of PRL (Sinha, 1992). Accordingly, it has been shown that the proteolytic cleavage and subsequent reduction of 23K PRL generates molecular variants with specific functions. Cleaved PRL, a variant with a nick at Tyr 145, specifically enhances proliferation of gonadotropes and thyrotropes, an effect not caused by 23K PRL (Andries *et al.*, 1992). Moreover the 16 kDa N-terminal fragment of PRL (16K PRL) inhibits the proliferation of endothelial cells as well as other events of angiogenesis, i.e., the formation of new capillary blood vessels (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993). 23K PRL does not affect such events of the angiogenic process (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993).

Although the anterior pituitary gland is known to be the major site for the synthesis and secretion of the PRL family of hormones, there are other known sources, including the brain (Dutt *et al.*, 1994). It has been recognized that the PRL gene is expressed in the central nervous system, particularly in the hypothalamus, although the PRL transcript is present

in very low abundance (Wilson *et al.*, 1992; Dutt *et al.*, 1994). The molecular heterogeneity of brain PRL is substantiated by described differences in the molecule's epitopes (Harlan & Scammell, 1991), size (Emanuele *et al.*, 1986, 1987; DeVito, 1988) and bioactivity (Emanuele *et al.*, 1986) with respect to anterior pituitary PRL. Moreover, both a PRL mRNA with identical sequence to that of anterior pituitary PRL (Wilson *et al.*, 1992), as well as an alternatively spliced PRL mRNA have been identified in brain tissue (Emanuele *et al.*, 1992).

In a recent study, with the use of the reverse transcription-polymerase chain reaction we found the full size PRL mRNA in the hypothalamic-neurohypophyseal system of the rat (Clapp *et al.*, 1994). Consistent with this result, PRL-immunoreactive proteins with a predominant molecular mass of 14 and 23 kDa were detected in neurohypophyseal extracts and found to be secreted by neurohypophyses in culture (Clapp *et al.*, 1994; Torner *et al.*, 1994). Moreover the medium conditioned by incubated neurohypophyses inhibited the proliferation of endothelial cells in culture (Clapp *et al.*, 1994). Thus we have hypothesized that PRL gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and that the protein is modified, through tissue-specific mechanisms, to yield variant forms with specific functions.

In this paper, we have tested the above hypothesis by investigating the nature of the neurohypophyseal PRL-immunoreactive proteins through the characterization of their biological activities in cell proliferation assays specific for 16K PRL (endothelial cells in culture) and 23K PRL (Nb2 lymphoma cells).

Results

Western blot detection of PRL-like antigens in medium conditioned by incubated neurohypophyses

Crossreactivity of proteins in medium conditioned by incubated neurohypophyses with PRL antisera was examined by Western blot analysis. As previously described (Clapp *et al.*, 1994), Western blots probed with the 16K PRL antiserum showed that the predominant immunoreactive protein present in the neurohypophyseal conditioned medium (NHCM) has an apparent molecular mass of 14 kDa (Figure 1). A 23 kDa immunoreactive protein was also consistently observed. These two immunoreactive proteins present in NHCM were also detected by an antiserum raised against 23K PRL (Figure 1A). Both the 14 kDa and the 23 kDa proteins were detected after reducing or not the samples with 5% β -mercaptoethanol (Figure 1B). In Western blots probed with pre-immune serum, no bands of 14 kDa or 23 kDa were detected (Figure 1A).

Effect of medium conditioned by incubated neurohypophyses on proliferation of Nb2 cells

The biological activity of NHCM was tested on the proliferation of Nb2 cells in culture and compared to the activities of 23K PRL and 16K PRL standards (Figure 2). Both PRL standards stimulated the proliferation of Nb2 cells in a dose-

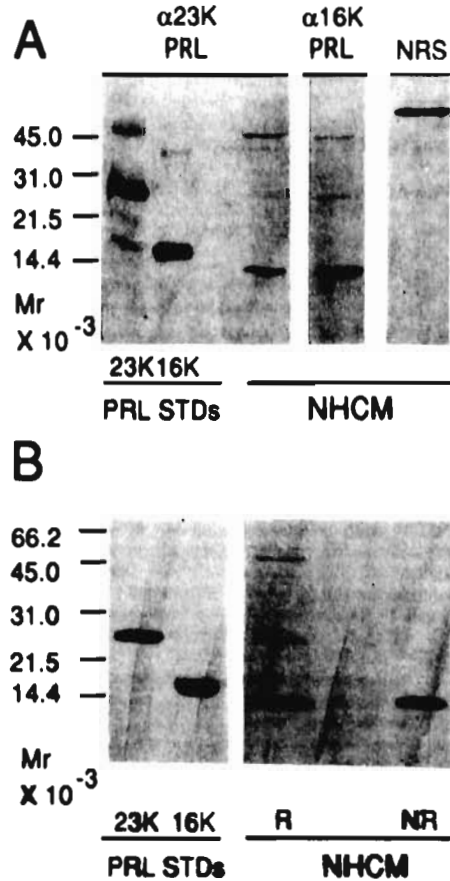


Figure 1 Western blot identification of PRL-like antigens in the medium conditioned by incubated neurohypophyses. (A) Blots from neurohypophyseal conditioned medium (NHCM), neurohypophyses were incubated 1 h in Krebs Ringer at 37°C, were probed with a 1:500 dilution of the 23K PRL antiserum (α 23K PRL), 16K PRL antiserum (α 16K PRL) or normal rabbit serum (NRS). (B) Blots from NHCM were probed with the antiserum to 16K PRL (2:500) under non-reducing (NR) or reducing (R) conditions. The migration rate (M_r) of molecular weight markers are indicated at left.

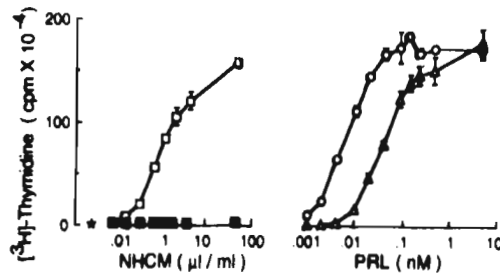


Figure 2 Stimulation by neurohypophyseal conditioned medium of Nb2 cell proliferation. $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation into Nb2 cells was measured in response to increasing concentrations of neurohypophyseal conditioned medium (NHCM) (\square), and compared to the effects of increasing concentrations of 23K PRL (\circ), 16K PRL (Δ), or pre-conditioned medium (\bullet). The basal incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine is shown (*). Starting at the 0.02 $\mu\text{l/ml}$ concentration, the NHCM values were significantly higher ($P < 0.05$) than basal values.

dependent fashion. The proliferative effect induced by 16K PRL showed a lower potency than the one induced by 23K PRL, i.e., 16K PRL had a one-half maximal response concentration (EC_{50}) seven times greater than that of 23K PRL or 45 pM vs 6 pM, respectively. Increasing concentrations of the NHCM stimulated the proliferation of Nb2 cells in a manner parallel to that of both PRL standards, while pre-conditioned medium had no effect. The concentration of the NHCM to give a half-maximal proliferative effect was 1 $\mu\text{l/ml}$. Western blotting and densitometric analysis of the NHCM, calibrated against different concentrations of 23K PRL standard, were used to estimate the concentration of the 23 kDa and the 14 kDa immunoreactive proteins in the medium as 1.2 and 7.2 ng/ μl , respectively. Thus, the activity of the NHCM to stimulate the proliferation of Nb2 cells, expressed as a function of the estimated concentrations of either the 23 kDa or the 14 kDa immunoreactive proteins gave EC_{50} values of 0.05 and 0.45 nM, respectively.

Inhibition of the Nb2 cell proliferative effect of neurohypophyseal conditioned medium by 23K PRL and 16K PRL antisera

The ability of antisera raised against 16K PRL and 23K PRL to inhibit the mitogenic activity of NHCM was tested (Figure 3). Nb2 cells were incubated with NHCM (1 $\mu\text{l/ml}$) to obtain a half-maximal proliferative effect, in the presence or absence of either PRL antisera. Serial concentrations of 23K PRL or of 16K PRL antisera inhibited in a dose-dependent fashion the stimulation of Nb2 cell proliferation induced by NHCM or by 23K PRL standard. Pre-immune serum had no effect.

Effect of neurohypophyseal conditioned medium on bFGF-stimulated proliferation of bovine brain capillary endothelial (BBCE) cells

Increasing concentrations of NHCM were tested on the proliferation of BBCE cells stimulated by bFGF and their effects

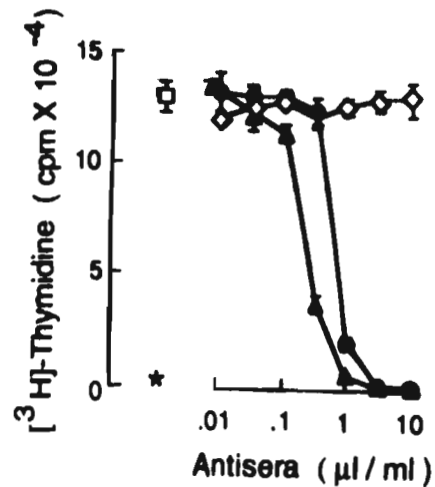


Figure 3 Blockage by PRL antisera of the stimulation of Nb2 cell proliferation induced by neurohypophyseal conditioned medium. $[^3\text{H}]$ thymidine incorporation into Nb2 cells was measured in response to neurohypophyseal conditioned medium (NHCM, at the EC_{50} value of 1 $\mu\text{l/ml}$) in combination with increasing concentrations of 23K PRL antiserum (\bullet), 16K PRL antiserum (\blacktriangle) or normal rabbit serum (\circ). The basal incorporation of $[^3\text{H}]$ thymidine (*), and that induced by NHCM alone (\square) are shown. The values for the anti-16K PRL and the anti-23K PRL antisera co-culture, starting at the 0.5 and 1.0 $\mu\text{l/ml}$ antiserum concentrations, respectively, were significantly ($P < 0.05$) lower than that of NHCM alone.

were compared to those of different concentrations of carbamidomethylated 16K PRL standard (CAM-16K PRL) (Figure 4). CAM-16K PRL was used for this purpose, since blockage of disulfide bond formation by carbamidomethylation enhances the potency of 16K PRL to inhibit endothelial cell proliferation (Ferrara *et al.*, 1991). Administration of NHCM inhibited the bFGF-stimulated proliferation of BBCE cells in a dose-dependent fashion that paralleled the inhibitory effect of CAM-16K PRL. The activity of NHCM to inhibit BBCE cells proliferation expressed as a function of the estimated concentration of the 14 kDa immunoreactive protein (7.2 ng/ μ l) gave an EC₅₀ value of 5.4 nM, close to the EC₅₀ value of 13 nM observed for CAM-16K PRL.

Blockage of the effect of neurohypophyseal conditioned medium on endothelial cell proliferation by 16K PRL antiserum

We next examined whether increasing concentrations of PRL-directed antisera were capable of neutralizing the inhibitory effect of NHCM on the bFGF-stimulated BBCE cell proliferation. BBCE cells were incubated with NHCM (12 μ l/ml) to give a half maximal inhibition of cell proliferation, in the presence or absence of either PRL antisera. Increasing concentrations of 16K PRL antiserum blocked, in a dose-dependent manner, the inhibition by NHCM of bFGF-stimulated BBCE cell proliferation (Figure 5). Conversely, 23K PRL antiserum or pre-immune serum at dilutions of up to 1:100 had no significant effects on the inhibitory activity of NHCM.

Discussion

Our results demonstrate that PRL-like immunoreactive proteins found in the medium conditioned by incubated neurohypophyses share bioactivities with both PRL and 16K PRL. Proliferation of lymphoma Nb2 PRL-dependent cells was stimulated by NHCM, and this effect was neutralized by a 23K PRL-directed antiserum. Proliferation of endothelial cells was also inhibited by NHCM, and this effect was neut-

ralized by a 16K PRL antiserum. These results indicate that biologically active PRLs are secreted by the hypothalamic-neurohypophyseal system, including a predominant 14 kDa PRL-like fragment with antiangiogenic effects.

In a recent study we described the presence of immunoreactive PRLs in the hypothalamic-neurohypophyseal system. With the use of an antiserum directed against the N-terminal 16 kDa fragment of PRL, we found that the hypothalamic-neurohypophyseal system contained two PRL-like antigens, i.e., a predominant 14 kDa protein and small amounts of a 23 kDa protein (Clapp *et al.*, 1994). The PRL nature of both antigens and their local production was substantiated by the amplification, via the polymerase chain reaction, of the full size PRL mRNA in isolated hypothalamic paraventricular nuclei (Clapp *et al.*, 1994). These results were consistent with the expression of PRL in the hypothalamic-neurohypophyseal system and with its posttranslational modification into a lower molecular weight fragment. The precise nature of the neurohypophyseal immunoreactive proteins requires further analysis.

In the present study we have confirmed that the neurohypophyses secrete 14 kDa and 23 kDa proteins that react with the 16K PRL antiserum, and showed that these two proteins also crossreact with an antiserum directed against 23K PRL. Thus it is concluded that both immunoreactive proteins share antigenic determinants with the 16K and the 23K PRL molecules.

We further investigated the identity of the neurohypophyseal PRL-like immunoreactive proteins, by analysing biological activities of the NHCM. In support to the PRL-like nature of the neurohypophyseal immunoreactive proteins, the NHCM stimulated in a dose-dependent fashion the proliferation of Nb2 lymphoma cells. The effect was parallel

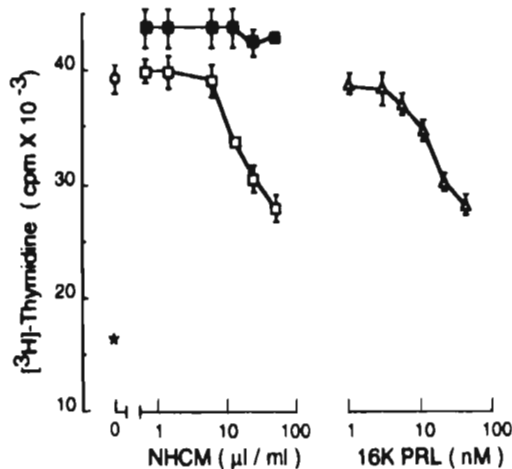


Figure 4 Inhibition by neurohypophyseal conditioned medium of bFGF-stimulated proliferation of endothelial cells. [³H] thymidine incorporation into BBCE cells was measured in response to bFGF (50 pM) alone (○) or in combination with increasing concentrations of neurohypophyseal conditioned medium (NHCM) (□), pre-conditioned medium (■), or 16K PRL (Δ). The basal incorporation of [³H] thymidine (*) is shown. Starting at the 12.5 μ l/ml concentration, both the NHCM and the 16K PRL values were significantly lower ($P < 0.05$) than that of bFGF alone.

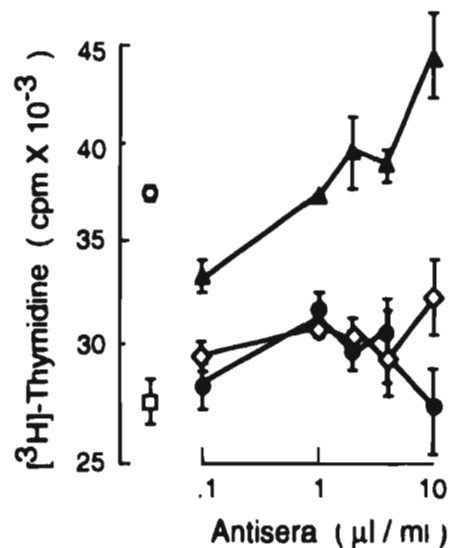


Figure 5 Blockage by 16K PRL antiserum of the inhibition by neurohypophyseal conditioned medium of bFGF-stimulated proliferation of endothelial cells. [³H] thymidine incorporation into BBCE cells was measured in response to bFGF (50 pM) alone (○) or in combination with neurohypophyseal conditioned medium (NHCM, at the EC₅₀ value of 10 μ l/ml) in the absence (□) or presence of increasing concentrations of 16K PRL antiserum (▲), 23K PRL antiserum (●) or normal rabbit serum (◇). All values for the anti-16K PRL co-culture were significantly ($P < 0.05$) higher than the NHCM (□) control. Values of 23K PRL antiserum- or normal rabbit serum- co-cultures were not significant from the NHCM control value.

to that elicited by 23K and 16K PRL standards, and was blocked by both 23K and 16K PRL-directed antisera. Accordingly, in addition to antigenic determinants, the proteins of the NHCM share PRL-receptor activation properties with both 23K and 16K PRL.

The Nb2 cell proliferation activity of the NHCM could be due to the combined action of both the 14 kDa and the 23 kDa PRL antigens, or to the independent effect of either one of them. The bioactivity of the NHCM expressed in terms of the sum of the estimated concentrations of both antigens gave an EC_{50} value 10- to 80-fold higher than the values obtained with 16K PRL and 23K PRL standards respectively. The apparently low biological potency of both PRL antigens could be explained in one of several ways. It is possible that the concentration of both antigens was overestimated, perhaps due to a high reactivity of these proteins with the PRL antisera. Alternatively, both neurohypophysial PRLs could have a low biological activity. This possibility is consistent with previous determinations of PRL-like bioactivity from hypothalamic extracts in which a low PRL bioassay to immunoassay ratio was demonstrated (Emanuele *et al.*, 1986, 1987). A low biological potency can be expected for PRL fragments. The EC_{50} value observed for 16K PRL (45 pM) was 7.5 times higher than that of 23K PRL (6 pM). An additional possibility would be that the 14 kDa antigen is acting as an antagonist of the PRL receptor. According to this possibility the 23 kDa antigen would be expected to have a reduced effect in the presence of the 14 kDa immunoreactive protein. Accordingly, the bioactivity of the conditioned medium expressed solely in terms of the 23 kDa antigen showed an EC_{50} value (0.05 nM) 8-fold higher than the respective value of 23K PRL standard (0.006 nM).

Possibilities like the ones raised above have been considered for the understanding of PRL signaling mechanisms. PRL fragments are currently being conceived as partial agonists and/or antagonists of the PRL receptor (Fuh *et al.*, 1993). It is now well accepted that PRL activates the PRL receptor by a sequential dimerization process that yields an active PRL-(receptor)₂ complex (Cunningham *et al.*, 1991; Fuh *et al.*, 1993; Hooper *et al.*, 1993; Rui *et al.*, 1994). This mode of activation implies that there are two receptor binding sites on the PRL molecule and that PRL binds through the first site (Site 1) to a receptor and then through the second site (Site 2) to a second receptor. PRL analogs with mutations at Site 1 or Site 2 act as partial agonists or antagonists of the receptor, respectively. For instance mutants of hGH which bind tightly with Site 1 but not with Site 2 are potent antagonists of the PRL receptor and virtually inactive on Nb2 lymphoma cells (Fuh *et al.*, 1993). On the other hand a hGH mutant with Site 2 intact, but with a compromised Site 1, acted as a partial agonist on Nb2 cells, with an EC_{50} value 12 times higher than that of native hGH (Cunningham & Wells, 1991; Fuh *et al.*, 1993). In a similar way, 16K PRL could be acting as a partial agonist for the PRL receptor because the C-terminal end of the molecule is at Tyr 145 (Baldochi *et al.*, 1993) and thus a group of amino acid residues (167-191), presumed to be part of Site 1 (Cunningham & Wells, 1989), have been lost. Along the same line a role for the neurohypophysial 14 kDa PRL as a partial agonist and/or antagonist at the PRL receptor level are open possibilities that need to be addressed following the purification and sequencing of the protein.

The functional significance of the PRL variants found in the hypothalamic-neurohypophysial system may lie on their ability to subserve different functions. For instance, 16K PRL while being a weak agonist of the PRL receptor, is a potent inhibitor of angiogenesis (Clapp *et al.*, 1988, 1993; Ferrara *et al.*, 1991), an effect not shared with 23K PRL. We previously showed that the PRL-like molecules present in the hypothalamic-neurohypophysial system exert an antiangiogenic-effect similar to that attributed to 16K PRL (Clapp *et al.*, 1994). Here we show that inhibition of endothelial cell

proliferation by the NHCM occurs in a dose-dependent fashion that parallels the dose-related antiangiogenic effect of 16K PRL standard. In addition, serial dilutions of the 16K PRL antiserum neutralize, in a dose dependent manner, the antiangiogenic-effect of the NHCM. In support to the 14 kDa protein as the likely antiangiogenic-molecule, we found that the activity of the NHCM expressed in terms of the estimated concentration of the 14 kDa PRL antigen, showed an EC_{50} value close to that obtained with 16K PRL standard.

The 23K PRL antiserum, even at a 1:100 dilution, did not neutralize the antiangiogenic effect of the NHCM. The selectivity of the 23K PRL antiserum to neutralize the NHCM effect on Nb2 cells, but not on endothelial cells, could be explained in one of several ways. It is possible that this antiserum recognizes epitopes in neurohypophysial PRLs that are part of the binding region to the PRL receptor but not to the 16K PRL receptor, and thus block the activation of the former but not of the latter. High affinity, specific binding sites for 16K PRL are present on endothelial cell membranes and have been proposed as the receptors mediating the antiangiogenic effect of 16K PRL (Clapp & Weiner, 1992). These 16K PRL receptors differ structurally from the PRL receptor and do not bind 23K PRL (Clapp & Weiner, 1992). Thus it is likely that epitopes associated to the 16K PRL receptor-binding region are not present in 23K PRL and thus not recognized by the 23K PRL antiserum. Alternatively, the 23K PRL antiserum may bind to epitopes distinct to either receptor-binding region. Once bound, the antibodies could alter the molecular conformation required for binding to the PRL receptor but not the one required for binding to the 16K PRL receptor. Similar mechanisms have been proposed to explain the selective neutralization activity of PRL monoclonal antibodies of the action of PRLs from different species. (Scammell *et al.*, 1990).

At any event, it is likely that the 23K PRL antiserum does not recognize all the epitopes of the neurohypophysial PRLs that are recognized by the 16K PRL antiserum. This is plausible since differences in three-dimensional structure of 16K PRL, attributed to the lost C-terminal end of the 23K PRL molecule, might have created new epitopes that are now recognized by 16K PRL-directed antibodies. Accordingly in assays where the three-dimensional structure of the molecules is preserved, the specificity of both the 23K PRL- and the 16K PRL-antisera increases. For instance, there is a low (1-2%) crossreactivity of 16K PRL and 23K PRL in the corresponding radioimmunoassays (Clapp *et al.*, 1988, 1994). Moreover, with immunocytochemistry, the 16K PRL antiserum clearly recognizes PRL-like antigens in the hypothalamic-neurohypophysial system (Clapp *et al.*, 1994), while the 23K PRL antiserum fails to detect the neurohypophysial PRL-like immunoreactivity (Siaud *et al.*, 1980; Harian *et al.*, 1989; Paut-Pagano *et al.*, 1993).

In support to the biosynthesis of the PRL variants by the hypothalamic-neurohypophysial system we have detected the PRL mRNA in isolated paraventricular nuclei (Clapp *et al.*, 1994). Moreover, these prolactin variants appear to enter the neurohypophysial secretory pathway, as indicated by the observed *in vitro* release of PRL-like immunoreactive proteins following potassium-induced depolarization of hypothalamic-neurohypophysial explants (Torner *et al.*, 1994). On the other hand, we have not detected the 14 kDa PRL-like immunoreactive protein in extracts of anterior pituitary glands, isolated lactotropes, or in the medium of cultured lactotropes (Torner *et al.*, 1994, unpublished observations). Moreover, we have not been able to detect immunoreactive PRLs in the hypophysial intermediate lobe (Clapp *et al.*, 1994). These data allow excluding a possible contamination of neurohypophysial PRLs with PRLs from adenohypophysial lactotropes or hypophysial-intermediate lobe cells. Furthermore PRL-like antigens were detected throughout the hypothalamic-neurohypophysial system, i.e. somas, axonal

projections and terminals of magnocellular neurons from the paraventricular and supraoptic hypothalamic nuclei (Clapp *et al.*, 1994).

It is not clear what are the functional implications of neurohypophysial PRLs and, in particular, of an anti-angiogenic-PRL molecule at this site. An effect on local vascularization is plausible. For instance, magnocellular neurons within hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei are known to express high levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) mRNA (Ferrara *et al.*, 1992). On the other hand, the presence of this PRL variant in a neuroendocrine system raises its potential hormonal action upon distant target tissues. Accordingly, we have observed Ca^{2+} -dependent release of the 14 kDa antigen by incubated neurohypophyses and detected a 14 kDa PRL immunoreactive molecule in the circulation of the rat (unpublished observations).

The involvement of PRL-like molecules in the control of angiogenesis is being increasingly supported. Proliferin and proliferin-related protein, two proteins with extensive amino acid sequence homology to PRL, were shown to stimulate and inhibit angiogenesis, respectively (Jackson *et al.*, 1994). Similarly our results suggest that the neurohypophysial 14 kDa PRL, may constitute a new member of the PRL family likely to be involved in the regulation of angiogenesis, as well.

Materials and methods

PRLs

Rat PRL [B-6; National Hormone and Pituitary Program (NHPP)] was used as the 23K PRL standard and as the source for the production of 16K PRL. 16K PRL was isolated after the enzymatic proteolysis of 23K PRL by a particulate fraction from rat mammary gland homogenates, disulfide-bond reduction and gel filtration as reported (Clapp, 1987). A portion of the 16K PRL preparation was carbamidomethylated (CAM-16K PRL) by its reduction with dithiothreitol under denaturing conditions and subsequent alkylation with iodoacetamide (Ferrara *et al.*, 1991).

PRL antisera

The anti-rat 23K PRL serum (S-9) distributed by the NHPP was used. 16K PRL has a low crossreactivity (2% that of 23K PRL) with this antiserum in the 23K PRL RIA (Clapp *et al.*, 1988). The 16K PRL antiserum was raised in rabbits against the 16K PRL non-carbamidomethylated preparation described above. The specificity of this antiserum in the 16K PRL RIA has been reported previously (Clapp *et al.*, 1994). Briefly, 23K PRL has a reduced crossreactivity (1% that of 16K PRL) with the 16K PRL antiserum, while growth hormone, oxytocin, vasopressin, neurophysins I and II and other peptides known to be present in the hypothalamic-neurohypophysial system, do not show crossreactivity with this antiserum (Clapp *et al.*, 1994).

Animals

Adult male Wistar rats (200–250 g) were kept in an environment of constant temperature and controlled day-night cycles and received food and water *ad libitum*. Their pituitary glands were removed following decapitation and the anterior lobes were dissected out under the microscope.

Incubation of neurohypophyses

The neurohypophysial lobes were washed in Ca^{2+} -deficient Krebs-Ringer solution for 10 min at 37°C and incubated individually in 20 μ l of Krebs-Ringer solution for 1 h at

37°C. The resulting conditioned media were pooled, concentrated (10 \times , Centricon 10, Amicon, Beverly, MA) and stored in aliquots at -70°C.

Western blot-densitometric analysis

Conditioned medium (10 μ l) was subjected to SDS-PAGE as previously described (Clapp *et al.*, 1994). Medium proteins were blotted onto nitrocellulose membranes, probed with a 1:500 dilution of the 16K PRL or the 23K PRL-antisera, and developed by using the alkaline phosphatase second antibody kit (Bio-Rad Labs). To determine the concentration of the 16K PRL reference preparation and of the PRL immunoreactive proteins of the conditioned media, different dilutions of the respective samples were blotted and probed with the 16K PRL antiserum. The blots were then subjected to a densitometric analysis (Fotoanalyzer-Fotodyne, Greensboro, NC, USA) calibrated with different concentrations of the 23K PRL standard processed within the same blot, as previously described (Clapp, 1987).

Cell proliferation assays

Nb2 cells The PRL activity of the conditioned media was measured using the lactogen-dependent rat T cell lymphoma Nb2 cell line as detailed previously (Tanaka *et al.*, 1980). Briefly, the cells (kindly provided by Dr. Peter Gout, Cancer Control Agency of British Columbia, Vancouver, B.C., Canada) were maintained as suspension cultures in high glucose-Dulbecco's Modified Eagle's medium supplemented with 10% horse serum, 10% fetal calf serum, 10^{-4} M β -mercaptoethanol and penicillin/streptomycin (50 U/ml). The effect of the conditioned or non-conditioned media was tested on Nb2 cell growth, in the presence or absence of the PRL antisera. Cell proliferation was determined in triplicate 12-mm tissue culture wells at a starting density of 2.5×10^4 cells in 0.25 ml of the above incubation medium, but without fetal calf serum. The cells were incubated for 72 h, after which [3 H]-thymidine incorporation into cellular DNA was measured as an index of cell proliferation (Ferrara *et al.*, 1991).

Bovine brain capillary endothelial cells Bovine brain capillary endothelial (BBCE) cells were isolated as previously described (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993) and grown in low glucose-Dulbecco's Modified Eagle's medium, supplemented with 10% fetal calf serum, glutamine (2 mM) and antibiotics (50 U/ml penicillin/streptomycin) as reported (Ferrara *et al.*, 1991; Clapp *et al.*, 1993). To assess cell proliferation, BBCE cells were plated at 2.5×10^3 cells per 12 mm culture wells in 0.25 ml of the above culture medium. bFGF (50 pM; GIBCO/BRL) alone or together with medium conditioned or not by incubated neurohypophyses were added to the wells every other day for 4 days. For immunoneutralization studies different dilutions of either PRL antisera were added together with the conditioned medium. On day 4, [3 H]-thymidine incorporation into cellular DNA was measured as reported (Ferrara *et al.*, 1991).

Data analysis

The data in Figures 2 to 5 are presented as means \pm SEM of triplicate determinations of representative experiments. Comparisons of means were carried out by one-way analysis of variance (ANOVA) and the Newman-Keuls test for determining statistical differences between two treatment means in multitreatment experiments.

Acknowledgements

We thank the National Institute of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases as well as the National Hormone and

Pituitary Program for their generous gifts of rat PRL and anti-rat PRL antiserum. This work was supported by Grant IN201992 from the National University of Mexico and by

Grant 1893-N9212 from the National Council of Science and Technology of Mexico.

References

- Andries, M., Tilemans, D. & Deneef, C. (1992). *Biochem. J.*, **281**, 393-400.
- Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S. & Nicoll, C. (1993). *Endocrinology*, **133**, 935-938.
- Clapp, C. (1987). *Endocrinology*, **121**, 2055-2064.
- Clapp, C., Sears, P.S., Russell, D.H., Richards, J., Levay-Young, B.K. & Nicoll, C.S. (1988). *Endocrinology*, **122**, 2892-2898.
- Clapp, C. & Weiner, R.I. (1992). *Endocrinology*, **130**, 1380-1386.
- Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F. & Weiner, R.I. (1993). *Endocrinology*, **133**, 1292-1299.
- Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Nagano, M., Kelly, P.A., Mejía, S., Morales, M.A. & Martínez de la Escalera, G. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10384-10388.
- Cunningham, B.C. & Wells, J.A. (1989). *Science*, **244**, 1081-1085.
- Cunningham, B.C. & Wells, J.A. (1991). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 3407-3411.
- Cunningham, B.C., Ullsch, M., de Vos, A.M., Mulkerrin, M.G., Clauser, K.R. & Wells, J.A. (1991). *Science*, **254**, 821-825.
- DeVito, W.J. (1988). *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **150**, 599-604.
- Dutt, A., Kaplitt, M.G., Kow, L.M. & Pfaff, D.W. (1994). *Neuroendocrinology*, **59**, 413-419.
- Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Martinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. & Lawrence, A.M. (1986). *Neuroendocrinology*, **44**, 217-221.
- Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Martinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. & Lawrence, A.M. (1987). *Brain Res.*, **421**, 255-262.
- Emanuele, N.V., Jurgens, J.K., Halloran, M.M., Tentler, J.J., Lawrence, A.M. & Kelley, M.R. (1992). *Mol. Endocrinol.*, **6**, 35-42.
- Ferrara, N., Clapp, C. & Weiner, R.I. (1991). *Endocrinology*, **129**, 896-900.
- Ferrara, N., Houck, K., Jakeman, L. & Leung, D.W. (1992). *Endocr. Rev.*, **13**, 18-32.
- Fuh, G., Colosi, P., Wood, W.I. & Wells, J.A. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 5376-5381.
- Harlan, R.E., Shivers, B.D., Fox, S.R., Kaplove, K.A., Schachters, B.S. & Pfaff, D.W. (1989). *Neuroendocrinology*, **49**, 7-22.
- Harlan, R.E. & Scammell, J.G. (1991). *J. Histochem. Cytochem.*, **39**, 221-224.
- Hooper, K.P., Padmanabhan, R. & Ebner, K.E. (1993). *J. Biol. Chem.*, **268**, 22347-22352.
- Jackson, D., Volpert, O.V., Bouck, N. & Linzer, D.I.H. (1994). *Science*, **266**, 1581-1584.
- Paut-Pagano, L., Roky, R., Valata, J.-L., Kitahama, K. & Jouvet, M. (1993). *Neuroendocrinology*, **58**, 682-695.
- Rui, H., Lebrun, J.-J., Kirken, R.A., Kelly, P.A. & Farrar, W.L. (1994). *Endocrinology*, **135**, 1299-1306.
- Scammell, J.G., Wear, L.B. & Von Haven, R. (1990). *Mol. Cell. Endocrinol.*, **71**, 125-131.
- Siaud, P., Manzoni, O., Balmefrezol, M., Barbanel, G., Assenmacher, I. & Alonso, G. (1980). *Cell Tissue Res.*, **255**, 107-115.
- Sinha, Y.N. (1992). *Trends Endocrinol. Metab.*, **3**, 100-106.
- Tanaka, T., Shiu, R.P.C., Gout, P.W., Beer, C.T., Noble, R.L. & Friesen, H.G. (1980). *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **51**, 1058-1063.
- Torner, L., López, F., Mejía, S., Uribe, E., Noris, G., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G. & Clapp, C. (1994). *76th Annual Meeting of the Endocrine Society, Anaheim: CA*, p 429 (abstract).
- Wilson III, D.M., Emanuele, N.V., Jurgens, J.K. & Kelley, M.R. (1992). *Endocrinology*, **131**, 2488-2490.