

31960



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS SUPERIORES
IZTACALA

ESTUDIO DE LAS FORMAS MOLECULARES
CIRCULANTES DE LA PROLACTINA Y
HORMONA DE CRECIMIENTO EN MUJERES
NORMOPROLACTINEMICAS CON
GALACTORREA

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

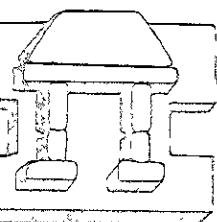
MAESTRIA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

PRESENTA:

QBP GLORIA CAROLINA SANDOVAL SANCHEZ

CON LA TUTORIA DEL:

DR. ARTURO ZARATE TREVIÑO



IZTACALA IZTACALA, EDO. DE MEXICO

2000

le
e:
la



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

La elaboración de este trabajo se efectuó en el Hospital de Especialidades de Centro Médico Nacional bajo la dirección del Dr. Arturo Zárate Treviño a quién le agradezco el apoyo y la confianza que me ha brindado.

Agradezco:

A mi asesor la QFB María Eugenia Fonseca por su valiosa dirección y asesoría que me brindó incondicionalmente para realizar este trabajo.

Al jurado:

La Dra. Cristina Revilla, la Dra. Martha del Campo, la Dra. Guadalupe Rico y al Dr. Martín Palomar, por el tiempo tan valioso que me dedicaron.

Con gratitud:

A mi esposo Jesús por su amor y apoyo que siempre me ha dado, ya que gracias a él he logrado dar un paso más en mi vida profesional.

A mi hija Adriana por su amor y paciencia, quién es la fuerza que me motiva a seguir superándome.

A mis padres Víctor y Herlinda por su herencia moral y por su apoyo incondicional que durante toda mi vida me han ofrecido.

A mis hermanas Lupita y Yola por su cariño.

A los señores José y Elena por ser un ejemplo a seguir.

A mi amiga y compañera la M. en C. Raquel Ochoa por su invaluable colaboración.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación de Enfermedades Endocrinas: Patricia Hernández, Rosa Eiba, Angélica, Silvia, Lourdes, Carmelita, Eiba, Hortencia, Elizabeth, Miriam, Carlos, Leticia y Rosa María, por la experiencia que me han compartido

INDICE

Resumen	1
Introducción	4
Planteamiento del Problema	29
Hipótesis	29
Objetivos	29
Método	30
Resultados	46
Discusión	71
Conclusiones	77
Referencias	78

RESUMEN

La familia lactogénica somatotrópica está integrada por la prolactina, la hormona de crecimiento y el lactógeno placentario que son hormonas que comparten homología estructural ya que se derivan de un gen ancestral común. Sus genes tienen una misma organización estructural.

Las múltiples funciones de la prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH) se ha tratado de relacionar a su estructura y su heterogeneidad molecular, que depende en gran parte de los eventos que ocurren durante su síntesis y las modificaciones que experimenta la proteína antes de ser liberada, a la circulación. Así, la heterogeneidad molecular que caracteriza a estas hormonas, está gobernada por la expresión de los genes que las codifican, fenómeno a su vez es regulado por estímulos hormonales específicos de ahí que el ambiente hormonal pueda modificar la síntesis de la hormona y probablemente la composición o proporción de las formas moleculares.

La prolactina presenta una homología de un 16% con la hormona de crecimiento, y también los receptores de estas dos hormonas presentan una identidad estructural de un 14 a 25% en la región transmembranal del receptor. Sus receptores se encuentran en diversos tejidos por lo que estas hormonas presentan un amplio espectro de acción.

El objetivo de este estudio fue averiguar si las formas moleculares de prolactina y hormona de crecimiento, influyen en las manifestaciones clínicas que presentan las mujeres con alteraciones en la secreción de estas hormonas y si las formas moleculares presentes se modifican con el ambiente hormonal.

Por esta razón se estudiaron 38 mujeres que se clasificaron en cuatro grupos diferentes. El grupo 1, corresponde al testigo o grupo normal (n=8); el grupo 2, integró mujeres normoprolactinémicas con galactorrea (n=10); el grupo 3, mujeres que presentaban hiperprolactinemia sin galactorrea (n=10); y el grupo 4 con mujeres que presentaban hiperprolactinemia con galactorrea (n=10).

En el suero de las 38 mujeres estudiadas se determinó la concentración de hormona luteinizante, hormona foliculo estimulante, estradiol, PRL y GH por radioinmunoanálisis. Después, el suero de estas mujeres fue fraccionado por cromatografía en gel para separar las diferentes formas moleculares de prolactina y hormona de crecimiento, que fueron caracterizados para su volumen de elución (V_e), peso molecular (PM) y constante de partición de cada molécula (K_{av}).

Este estudio comprobó que el ambiente hormonal influye sobre la proporción de las formas moleculares presentes en los diferentes grupos estudiados, es decir que la concentración hormonal puede modificar las formas moleculares de PRL y GH, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

En el caso de la PRL en el grupo testigo, se observó un predominio de la forma monomérica que mostró tener una relación directa con la concentración de estradiol; en el grupo de normoprolactinémicas con galactorrea, aunque predominó la forma monomérica, la big-PRL se elevó significativamente. En el grupo de hiperprolactinemia sin galactorrea se encontró aumentada la forma monomérica y en el grupo de hiperprolactinemia con galactorrea predominó la big-PRL, hecho que es difícil de explicar dado que la L-PRL es la más activa, pero puede deberse a la disminución de los niveles de estradiol y su efecto positivo sobre la forma monomérica. Con respecto a la

hormona de crecimiento en los grupos con hiperprolactinemia, su concentración no fue detectable, por lo que solo se comparó el grupo testigo y el grupo de normoprolactinemia con galactorrea que tuvo una concentración relativamente elevada de GH.

Se encontró que en el grupo testigo predomina la forma dimérica de GH y en el grupo de normoprolactinemia con galactorrea la forma monomérica. Esta molécula de acuerdo a los resultados de este estudio, es influenciada negativamente por la concentración de estradiol, lo que explica su elevación en el grupo de normoprolactinemia con galactorrea. Dada la posibilidad del reconocimiento de GH monomérica por los receptores de PRL, la elevación de GH (40-20 KDa) pudiera ser la responsable de la galactorrea.

Como conclusión puede decirse que el ambiente hormonal modifica las formas moleculares de prolactina y hormonas de crecimiento, y que la proporción de las isoformas, en especial la forma monomérica de estas hormonas pueden influir en las alteraciones clínicas que se presentan. Sin embargo no puede excluirse el papel tan importante de los receptores de ambas hormonas para la expresión de su actividad biológica.

INTRODUCCION

El sistema nervioso y endocrino constituyen dos sistemas de control del organismo integrados desde el punto de vista anatómico y funcional para constituir el sistema neuroendocrino, responsable de monitorear el ambiente interno y externo y mantener la homeostasis metabólica marcando los cambios adaptativos apropiados. El sistema inmune también está relacionado con el sistema neuroendócrino, ejerciendo ambos un control recíproco de sus funciones (1).

El sistema nervioso actúa a través de las terminaciones nerviosas que conectan diferentes tejidos y órganos por medio de estímulos nerviosos, liberando agentes químicos capaces de actuar como mediadores locales y como hormonas de diversos tipos dentro del sistema nervioso central. La producción de neurotransmisores cerebrales también, pueden controlar la síntesis de las hormonas hipotalámicas, las que a su vez pasan a la hipófisis para controlar la síntesis y liberación de mensajeros químicos, conocidos como hormonas. De esta manera se integra el sistema nervioso y el sistema endocrino para formar una sola unidad de control funcional (2).

El hipotálamo libera diferentes neurohormonas hacia el espacio intersticial de la eminencia media del hipotálamo y de ahí los factores liberadores llegan a la hipófisis por los vasos hipofisioportales, y de esta manera las señales del cerebro regulan la secreción de hormonas (3).

Las hormonas tienen diferentes funciones como la reproducción, el crecimiento y el desarrollo; así como la producción, utilización y el almacenamiento de energía. El efecto de las hormonas es complejo ya que una sola hormona puede tener efectos diferentes en diversos

tejidos y variar aún en el mismo tejido dependiendo de la etapa de la vida del individuo (4).

La hipófisis es una estructura compleja que se encuentra dentro de la cavidad de las paredes óseas llamada silla turca, al nivel de la base del cráneo; es un pequeño órgano formado por dos lóbulos; el lóbulo anterior o adenohipófisis y el lóbulo posterior o neurohipófisis (5)

La neurohipófisis es un engrosamiento del tallo hipofisario que está en la porción posterior y medial de la hipófisis; la neurohipófisis es irrigada por la arteria hipofisaria inferior y es independiente de la adenohipófisis. Libera vasopresina y la oxitocina. Estas hormonas son sintetizadas en el hipotálamo, pasan a la neurohipófisis y de ahí se liberan a la circulación periférica (6).

La adenohipófisis representa el 75% del peso total de la glándula y recibe irrigación sanguínea de la arteria hipofisaria superior que nace de la carótida interna y además del sistema portal. La adenohipófisis se encuentra regulada en su actividad endocrina por las hormonas elaboradas en el hipotálamo, estas son liberadas al sistema venoso portal hipotálamo-hipofisario que actúan sobre la adenohipófisis, estas hormonas pasan al torrente sanguíneo y de esta forma se establece la retroalimentación del sistema hipotálamo-hipófisis (7).

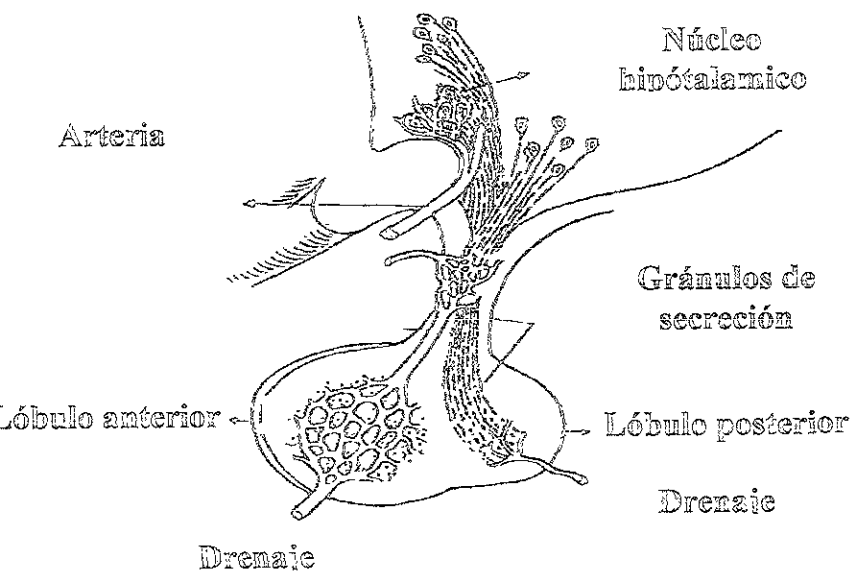
La identificación de los tipos celulares de la adenohipófisis por técnicas inmunoquímicas ha mostrado diferentes células, como las células corticotróficas, que responden a la hormona liberadora de corticotrófica (CRH) del que deriva la hormona adrenocorticotrófica (ACTH); las células gonadotróficas que secretan la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH), la que regula la síntesis de hormonas con una cadena α y una cadena β como la hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH); las células tirotróficas que son blanco de la hormona liberadora tirotrófica (TRH),

que estimulan la secreción de la hormona estimulante de tiroides (TSH); las células somatotróficas que responden al factor liberador de somatotropina y liberan péptidos de una sola cadena como el de la hormona de crecimiento (GH) y la prolactina (PRL) (8). En la figura 1 se presenta un esquema simplificado del hipotálamo y su relación con la hipófisis.

La mayoría de las hormonas son péptidos o derivados de aminoácidos, como el caso de la LH, que es un péptido complejo, la insulina que es un péptido de tamaño intermedio o la tiroxina que es un dipéptido modificado. Así que cualquiera que sea la estructura química o la manera en la que han evolucionado las hormonas comparten varias características como son las de encontrarse en bajas concentraciones en la circulación, tener receptores específicos en los tejidos efectores que reconocen a la hormona, donde se pueden fijar con gran afinidad. Además que las hormonas se dirigen a los tejidos específicos en forma directa por medio de un circuito circulatorio restringido actuando en forma directa sobre el tejido (9).

Las hormonas polipeptídicas son un conjunto importante y diverso de moléculas que cumplen la función de transmitir información específica entre células y órganos mediante el torrente sanguíneo o bien como comunicadores locales entre célula y célula; para poder llevar a cabo su función utiliza cuatro formas diferentes para expresar su acción biológica: 1) la forma endocrina, es la comunicación entre los órganos; 2) la forma parácrina, es la comunicación que existe entre células adyacentes que están dentro de los órganos endocrinos; 3) la forma neuroendocrina que implica la síntesis y liberación de neurohormonas peptidinérgicas, que actúan entre órganos distantes mediante el torrente sanguíneo; 4) forma autocrina en la que las

HIPOTALAMO



HIPOFISIS

Figura 1. Esquema del eje hipotálamo-hipofisario

Esquema simplificado del hipotálamo y la relación que guarda con la hipófisis.

hormonas actúan sobre la misma célula donde se producen para regular su función (10).

Para poder explicar que determina las múltiples funciones de las hormonas polipéptidicas, se ha tratado de relacionar la función que realiza, con la estructura de la hormona, el proceso de síntesis y la forma en que se lleva a cabo la liberación de las hormonas. Las características estructurales y la diversidad de formas moleculares de una hormona se originan en los mecanismos gobernados por la expresión de los genes que las codifican y las modificaciones postraduccionales.

Las vías biosintéticas son las mismas que conducen a la producción de hormonas péptidicas son las mismas vías bioquímicas que determinan las síntesis de otras proteínas, solo que las hormonas experimentan durante este proceso una serie de modificaciones que darán origen a las hormonas activas (11).

La expresión de un gen está determinado por la transferencia de información codificada en el lenguaje polinucleótido del DNA al lenguaje poliaminoácido de la proteína biológicamente activa (12). Los pasos de este evento son la transcripción, proceso transcripcional, la traducción y el proceso postraduccional.

El inicio del proceso es la transcripción de la información genética a un RNA, que es la copia fiel del DNA del gen, etapa catalizada por la RNA polimerasa II, que da origen al un precursor del RNA mensajero (pre-mRNA).

La etapa postraduncional se inicia con diferentes modificaciones en el pre-mRNA, la primera es la escisión de intrones y empalme de exones que dan como resultado el RNA mensajero (mRNA), otra cambio que presenta el mRNA se lleva a cabo en el extremo 5' por la adición de

7-metilguanidina y la unión en el extremo 3' de múltiples residuos de adenosina llamado poliadenilación, ambas modificaciones son necesarias para darle mayor estabilidad a la cadena de mRNA (13).

El mRNA sale del núcleo y pasa al citoplasma donde interactúa con los ribosomas y con el RNA de transferencia (tRNA) por medio de triplete de nucleótidos conocidos como anticodones que son específicos, esto permiten el ensamble de los aminoácidos y por último se polimerizan las cadenas polipeptídicas; este proceso es llamado traducción (14).

La nueva proteína lleva a cabo un transporte vectorial para atravesar la membrana del retículo endoplásmico (RE) por lo que al inicio de la molécula existe una secuencia de 15 a 30 aminoácidos, llamada péptido-síñal, la que es reconocida por un receptor que se encuentra tanto en el citoplasma como en el RE, este receptor está constituido por seis proteínas distintas y un RNA-7S (15). Una vez formado este complejo síñal-receptor se une a una proteína de "enlace" que se encuentra localizada en la membrana del RE, esta interacción del complejo síñal receptor con la proteína de enlace libera el bloque traduccional y se reanuda la síntesis proteica formando una cadena polipeptídica de 50 a 70 aminoácidos que se fija a la membrana (16). El péptido síñalador se desprende de la cadena polipeptídica mediante una peptidasa, que se encuentra en la parte interna de la membrana y así la cadena polipeptídica atraviesa la membrana del RE. No se conocen con exactitud los mecanismos responsables de la traslocación (17).

La cadena polipeptídica durante el recorrido por el RE y el complejo de Golgi lleva a cabo el alargamiento de la cadena polipeptídica, a este suceso se conoce como proceso cotraduccional, el proceso postraduccional finaliza cuando la cadena polipeptídica se libera

como una cadena completa. Las proteínas recién sintetizadas se descargan en la cisterna del RE, de donde pasan en forma directa a los conductos membranosos del complejo de Golgi o con la intervención de vesículas que se conocen como elementos de transición (18).

En la figura 2 se puede observar los diferentes pasos de la síntesis celular de las hormonas polipeptídicas.

Durante el proceso cotraduccional y postraduccional las proteínas sufren una serie de modificaciones que permiten la síntesis de pre-hormonas que posteriormente dan origen a la hormona activa tal es el caso de insulina, hormona paratiroidea y ACTH, con un peso molecular menor de 15 KDa, en el caso de GH, PRL y lactógeno placentario (hPL) que tienen un peso molecular de 20 a 22 KDa, estas pre-hormonas solo presentan una ruptura cotraduccional ya que aparentemente no requieren pasos intermedios por presentar una cadena de mas de 100 aminoácidos y pueden atravesar el RE sin que se alargue la cadena; solo en algunos casos puede presentar modificaciones postraduccionales como el de la forma glicosilada de la PRL que se encuentra en circulación. Durante el proceso cotraduccional, el proceso postraduccional, algunos aminoácidos específicos presentan cambios como la glicosilación, iodación, sulfatación, amidación, acetilación y fosforilación, que dan origen a las hormonas glicoproteicas; TSH, LH, FSH o la gonadotropina coriónica (hHGC), que tienen un P.M. de 28 a 38 KDa (19).

Todas las transformaciones que sufre la cadena polipeptídica desde las prehormonas hasta las hormonas activas son mediadas por diferentes enzimas que se encuentran tanto en el RE como en el complejo de Golgi (20).

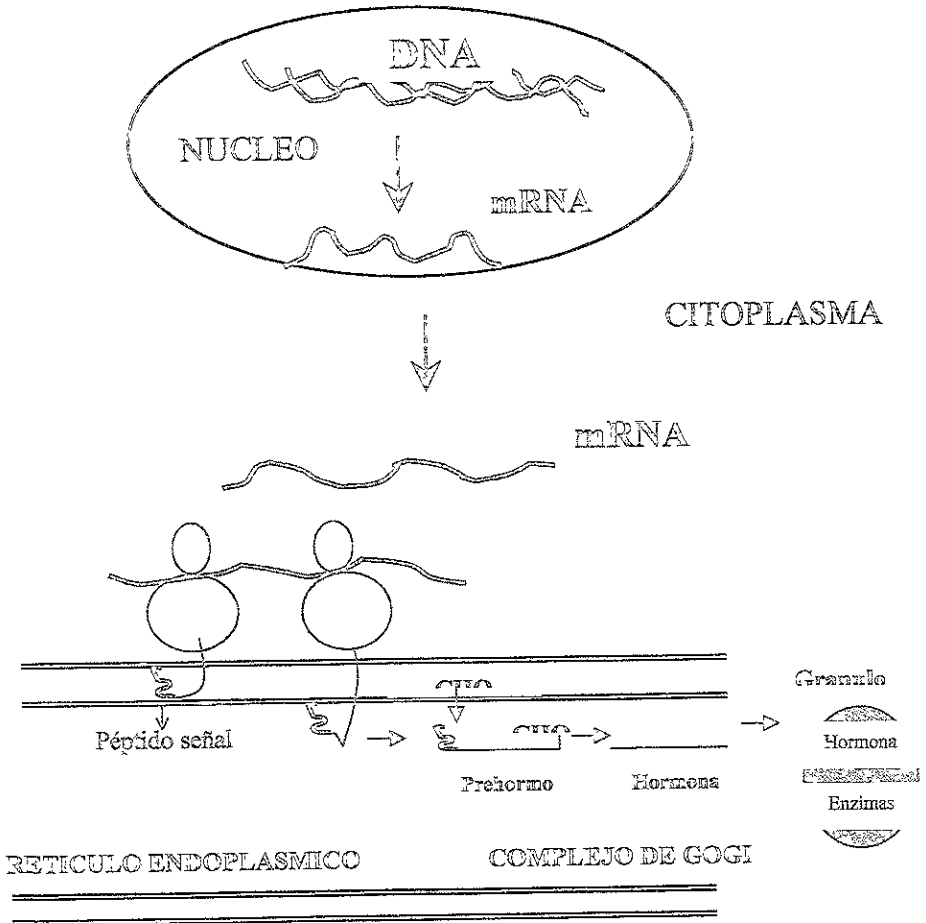


Figura 2. Pasos de la síntesis celular de las hormonas polipeptídicas. Los pasos que tienen lugar dentro del núcleo comprenden la transcripción de la información genética al RNA mensajero (mRNA). En el citoplasma se inicia el proceso de traducción del mRNA, en donde los ribosomas y el RNA de transferencia forman la cadena polipeptídica y el proceso final que es el proceso postraduccional se lleva a cabo en el retículo endoplásmico y el complejo de Golgi, para formar la hormona activa.

En el complejo de Golgi las proteínas son empaquetadas dentro de vesículas o gránulos secretores inmaduros y algunas de ellas se transforman en hormonas activas hasta después de su secreción. Para la liberación de estas proteínas, los gránulos o vesículas pasan al espacio extracelular por medio del fenómeno conocido como exocitosis que esta regulado por estímulos extracelulares específicos (21).

Durante la formación de las hormonas peptídicas existen diferentes puntos de control para regular la expresión de los genes. Los diversos pasos intervienen en la transferencia de información codificada en el DNA del gen hasta la proteína bioactiva final, son factores que conducen a la diversificación de la información genética.

Los tres principales niveles de regulación y diversificación genética son: la duplicación de genes a nivel del DNA (22); la variación en el procesamiento de precursores del RNA, que conducen a la formación de dos o más RNA mediante vías alternas de empalme en la transcripción (23); y el uso de patrones alternativos en el procesamiento de los precursores biosintéticos durante el procedimiento postraduccional (24).

La síntesis de las hormonas polipéptidicas tiene que tener varios tipos de regulaciones finas; la autoregulación que como es el caso de la regulación positiva, que se lleva a cabo por las proteínas CREB, que son proteínas de unión que responden al adenosin-monofosfato-cíclico (cAMP) (25) y el factor de proteínas 1 conocido como AP-1 (26). Estas son proteínas se unen en forma específica al DNA, y activan a las enzimas proteína-cinasa modificando su estado de fosforilación, lo que permite que se incremente la velocidad de transcripción (27). Por otra parte la autorregulación negativa que involucra cAMP que actúa como un modulador de las proteínas CREB y el factor AP-1

disminuyendo la regulación del promotor (28). Ambas regulaciones se combinan con otros factores de transcripción formándose una compleja regulación en la expresión del gen.

En el caso específico de PRL y GH se conoce otro regulador que es el factor 1 de transcripción específica de hipófisis (Pit-1); es un factor de regulación trans que actúa enviando una señal intracelular específica, que interacciona con un receptor-sensor del gen del DNA (29).

El factor Pit-1 se expresa exclusivamente en la hipófisis anterior de mamíferos (30), su función es incrementar la transcripción de los genes de PRL, GH y la cadena β de TSH (31). El factor Pit-1 se localiza en la región del promotor del gen en los somatotropos expresando GH, lactotropos expresando PRL y tirotropos expresando TSH (32). Este factor se encuentra ubicado cerca del sitio de inicio del gen y está formado por 100 pares de bases. Puede ser activado por factores de crecimiento insulinoideos y factor de crecimiento epidermal (33).

Familia Lactogénica Somatotrópica

Esta familia está integrada en el humano por PRL, GH y hLP, hormonas que comparten homología estructural; es decir que tienen secuencia de aminoácidos iguales o muy similares en determinadas regiones de la cadena polipeptídica (34), ya que derivan de un gen ancestral común (35). Los genes de estas hormonas presentan una organización estructural común y muestran una secuencia homóloga de los aminoácidos que codifican las proteínas de estas hormonas (36). El grado de homología se puede observar en la figura 3, en la que muestra la similitud estructural de las tres hormonas.

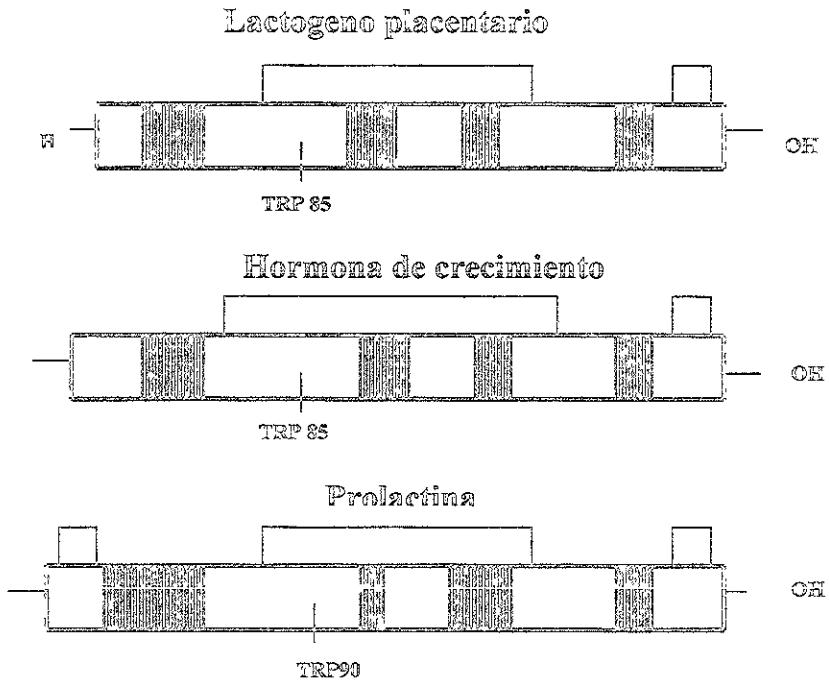


Figura 3. Similitud estructural de la familia de hormonas somatotropicas.

Las barras representan las cadenas peptidicas, con el amino-terminal a la derecha y a la izquierda el carboxi-terminal. Las áreas sombreadas representan la secuencia de replicación. La línea que se encuentra sobre cada barra representa las posiciones de los puentes disulfuro.

Los receptores de GH y PRL también presentan homología estructural

o identidad de su contenido de aminoácidos en un 14% a un 25%, es decir aproximadamente 200 aminoácidos en la región extracelular. Estos receptores pertenecen a la familia de receptores de GH/PRL/Citocinas; son receptores de dimerización que son activados por la tirosin-cinasa, presentan dos pares de cisteínas en la región N-terminal, mientras que en el extremo C-terminal hay una dominio llamado *ws-wsx motif* rico en triptofano y serina, el cual presentan todos los miembros de esta familia excepto el receptor de GH (37). En el dominio transmembranal existe una región de 25 aminoácidos que esta altamente conservada entre los receptores de GH y PRL y se propone que esta región pueda ser la que inicie el proceso de transducción (38). Los receptores de las hormonas peptídicas están integrados en la bicapa de fosfolípidos sobre la membrana, y se mueven en dos dimensiones, las hormonas en la circulación se encuentran en forma monomérica lo que facilita la dimerización del receptor lo que origina la señal de transducción. Esta unión hormona- receptor, es un proceso divalente, primero se une la hormona monomérica y una vez unida al receptor se induce un cambio conformacional (39)

En la figura 4 se muestra un esquema de algunos de receptores asociados a tirosin-cinasa a la que pertenece la familia de GH-PRL-Citocinas.

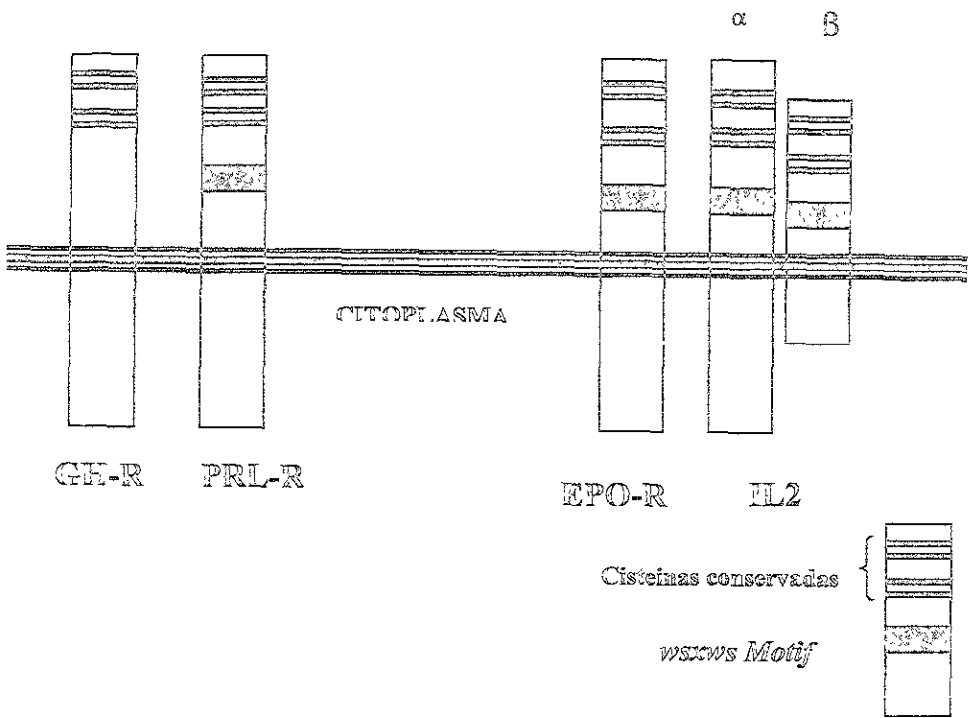


Figura 4. Representación esquemática de algunos receptores asociados a tirosin -cinasa.

En la figura solo se representan cuatro de los receptores el receptor de GH (GH-R), PRL (PRL-R Eritopoyetina (EPO-R) y el de la interleucina 2 con sus dos subunidades α y β (IL2-R) que componen la familia de la GH-PRL-citocinas. en la región transmembranal se pueden observar las dos regiones conservadas de cisteínas en todos los receptores del esquema (rectángulos blancos), y la región *wsxws* motif solo no se expresa en el receptor de GH (rectángulo negro)

Prolactina

La PRL se sintetiza y se secreta en las células lactotróficas de la adenohipófisis; estas células representan de un 40 a un 50 por ciento de la población de las células de la hipófisis normal y se encuentran en los bordes poslaterales de la glándula (40).

La PRL es una hormona polipeptídica de cadena lineal constituida por 199 aminoácidos, con tres puentes disulfuro intramoleculares; el primero se encuentra localizado entre el residuo 4-11, el segundo en las posiciones 58-174 y el tercero en la posición 191-199, tiene un peso molecular aproximado de 23 KDa (41).

El gen que codifica la síntesis de PRL, se localiza en el cromosoma 6 en los humanos y contiene en su estructura 914 pares de bases, que en total representan de 10 a 12 Kilobases (42).

La figura 5 nos muestra el diagrama del gen de la PRL en humanos y extrahipofisiario de la PRL, la forma nativa y algunas isoformas de la hormona.

Se ha encontrado que existe de un 60 a un 100% de homología estructural en la molécula de PRL en diferentes especies de mamíferos, lo que refleja una gran conservación filogenética (43), mientras que con la GH tiene un 16% de homología estructural (44).

Entendemos por variantes moleculares de una misma hormona a las isoformas moleculares y estas se caracterizan por tener diversas propiedades fisicoquímicas (como peso molecular, carga eléctrica, punto isoeléctrico y vida media), diferente inmunoreactividad frente a los anticuerpos y un grado variable en la acción biológica, tanto "*in vivo*" como "*in vitro*" lo que da origen a la heterogeneidad molecular (45).

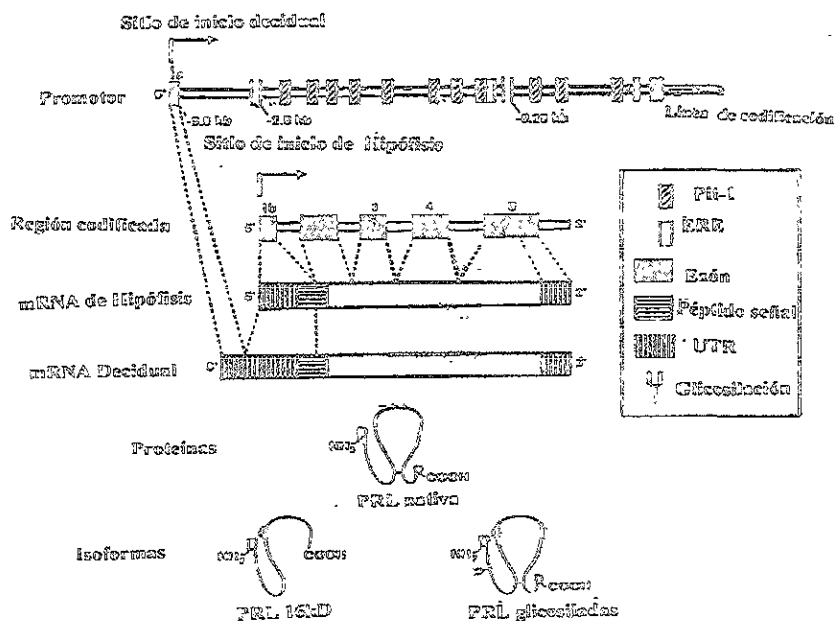


Figura 5. Diagrama del gen humano de PRL

En este diagrama se muestra el gen hipofisiario y extrahipofisiario (PRL decidua). En el promotor del gen se pueden distinguir la región Pit-1, la secuencia degenerada de ERE, que actúan como dominios de regulación de la síntesis de PRL. La decidua extrahipofisiaria utiliza un promotor alternativo en el mRNA de 150 pares de bases llamada región no traducible (UTR) y es menor en el mRNA de la hipófisis. La PRL nativa es una proteína de 199 aminoácidos y tres puentes disulfuro, y se representa también dos isoformas de la PRL la variante 16 KDa y la forma glicosilada (posición 31) de la PRL.

La heterogeneidad de la PRL y GH, ha sido demostrada por filtración gel, cromatografía de intercambio iónico, isoelectroenfoque y electroforesis, en muestras de suero, plasma seminal, extractos de hipófisis y líquido amniótico (46).

En la circulación han encontrado tres principales formas moleculares: la PRL pequeña o monomérica de 23 KDa es la forma predominante en el suero, la de mayor actividad biológica y con mayor afinidad por el receptor; la PRL grande o dimerica (big-PRL) de un peso molecular aproximado de 46 a 56 KDa, tiene 30% de la actividad hormonal; y la macroprolactina de 100 a 150 KDa con 15% a 20% de la inmunoreactividad total (47).

La heterogeneidad molecular se ha encontrado tanto en estados normales como en hiperprolactinemia, y las formas "big" y la "big-big" estas formas moleculares aparentemente tienen una menor afinidad por el receptor (48).

Las formas glicosiladas de PRL de 25 KDa, tienen una menor inmunoreactividad que la forma monomérica, se encuentra en un 15% en la circulación (49).

La forma monomérica de la PRL puede ser hidrolizada liberando las formas de 8 y 16 KDa. La molécula 16 KDa parece ser importante aunque no se conoce su acción biológica con exactitud, pero puede tener efecto mitogénico sobre las células mamarias (50). Además puede actuar como un potente inhibidor de factores angiogénicos en humanos (51) y puede interactuar con los receptores de PRL (52). Cada una de las isoformas posee diferente grado de actividad biológica que puede cambiar dependiendo de su sitio de acción, tipo y número de receptores (53).

La PRL, posee gran versatilidad funcional y se piensa que la diversidad

de acciones se debe a tres factores; a) polimorfismo estructural, b) producción y proceso local, y c) vía de señalización intracelular y acción sobre los órganos blancos (54). La PRL también se puede clasificar como una citocina esto se basa en sus propiedades y acciones como un factor de crecimiento para linfocitos y otras células del tejido inmune, considerándose también un factor hematopoyético (55).

La síntesis y la secreción de la PRL, se encuentra regulada por una compleja red de mecanismos de naturaleza neuroendócrina, autocrina y paracrina ya que los lactotrofos poseen una gran cantidad de receptores de membrana y nucleares en el que cada uno altera en forma específica la transcripción del gen de PRL, la regulación de la PRL se controla por un equilibrio entre inhibidores y activadores que se transmiten del hipotálamo a la hipófisis para modular la cantidad de hormona periférica.

La dopamina hipotalámica es el principal factor inhibidor de la PRL; el sistema dopaminérgico del hipotálamo emite proyecciones a la eminencia media secretando dopamina, esta activa a los receptores específicos D2 localizados en la superficie de la membrana de las células del lactotrofo actuando como un represor de la expresión génica de la PRL; al unirse la dopamina al receptor forman un complejo que inhibe la síntesis (56). El receptor D1 es capaz de mediar el efecto de estimulación de dopamina sobre la liberación de PRL (57).

Los factores hipotalámicos que inducen la transcripción del gen de PRL, son la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), estimulando la formación del mRNA que codifica a la PRL (58); el péptido vasoactivo intestinal (PHM 127), que es un péptido con estructura semejante al péptido intestinal (VIP), este péptido actúa cuando aumenta su

concentración en sangre hipofisoportal, y de esta forma puede incrementar la secreción de PRL (59). La angiotensina II que tiene acción directa sobre los receptores de los lactotorofos liberando la PRL (60). El significado fisiológico de los factores de liberación de PRL en el humano no se conoce con exactitud, ni cual es el factor predominante.

Los estrógenos pueden regular la función de los lactotropos al unirse en forma específica a los receptores nucleares llamados ERE, localizado en la parte distal de la región del promotor, adyacente al sitio de Pit-1 (61), pero para ejercer está acción los estrógenos requieren unirse a múltiples sitios de Pit-1 (62). El efecto que tienen los estrógenos sobre la expresión génica de la PRL se puede observar con el aumento de la PRL circulante durante el embarazo (63); en los valores de la hormona que se mantienen constantes durante la etapa reproductiva (64), y por la disminución de PRL en la vejez (65).

En condiciones normales los valores basales de PRL en el suero son iguales o menores de 20 ng/mL en mujeres adultas sanas, y menores de 15 ng/mL en hombres adultos sanos (66). Los niveles de PRL circulante varían durante las 24 horas del día, ya que es una hormona episódica con ritmo circadiano, los valores más bajos se encuentran al medio día y se incrementan ligeramente durante la tarde, aumentan durante el sueño y el mayor nivel se observa durante noche y se mantiene hasta las primeras horas de la mañana (67).

El espectro total de las funciones de la PRL en el humano es muy amplio y sin duda se debe a distribución de receptores en numerosos tejidos como hipotálamo (68), hipófisis (69), tracto intestinal (70), próstata (71), hueso (72), decidua (73), membranas fetales (74), linfocitos (75) y células de la glándula mamaria (76).

El receptor de PRL esta constituido por tres dominios citoplásmico,

transmembranal y extracelular, este receptor tiene diferentes isoformas que difieren principalmente en la secuencia y longitud del dominio citoplásmico lo cual permite explicar las acciones pleiotrópicas de PRL en una gran variedad de células. Se han encontrado tres variantes de receptores, la forma corta de 291 aminoácidos y la forma larga de 592 aminoácidos estas formas se han identificado en el humano (77) y una tercera variante la forma intermedia de 393 aminoácidos identificada en la línea celular Nb2 derivada del linfoma de la rata (78).

El mecanismo de acción de la PRL se inicia con el ensamble del receptor que activa a la tirosina-cinasa citoplásmica denominada JAK2 que se encarga de fosforilar al receptor y las proteínas que traducen la información extracelular en un mensaje intracelular. Las proteínas STAT que inmediatamente de su fosforilación acceden al núcleo activando la expresión de los genes específicos. Las proteínas Ras que se encuentran reguladas por las proteínas GAP/GNRP participan en el sistema a través de las enzimas MAPK que penetran al núcleo modulando la transcripción génica. La PLC genera el diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (IP3) que favorece la enzima PKC y la movilización de calcio intracelular y a MAPK (79).

El principal sitio de acción de la PRL es sobre la glándula mamaria. Durante el embarazo la PRL aumenta y de esta manera inicia y mantiene la lactancia por la acción de varias hormonas como la insulina, cortisol. El desarrollo mamario indispensable para la lactancia es estimulado por la presencia de estrógenos, progesterona y GH. Esta interacción de múltiples hormonas y factores de crecimiento para controlar la producción de leche (80).

La acción de la PRL en el cerebro es poco conocido pero se sabe que actúa en el hipotálamo para regular la dopamina y tiene influencia

sobre la secreción de gonadotropinas y están asociadas con el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, esto da como resultado una inhibición mediada por la PRL sobre la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) originando una disminución de LH, FSH y de esteroides gonadales (81).

La hiperprolactinemia es a nivel del hipotálamo induce un incremento en los niveles de dopamina y péptidos opiodes que son inhibidores para la secreción pulsátil de GnRH, dando origen a la falla gonadal con o sin galactorrea, como ocurre en la lactancia post-parto y en el síndrome de amenorrea galactorrea. Esto indica que existen receptores sobre las neuronas de GnRH (82) y esto origina que en pacientes con hiperprolactinemia los pulsos de LH se reduzcan en frecuencia y amplitud (83). Por otra parte la disminución de estrógenos inducen a la falla de la retroalimentación positiva de la secreción de gonadotropinas lo cual origina una inhibición de la función gonadal y en las mujeres causa trastornos menstruales (84). Se han reportado casos de mujeres que no obstante ser normoprolactinélicas presentan galactorrea, sin usar fármacos o drogas psicotrópicas (85) y por el contrario también existen mujeres con hiperprolactinemia que tienen una función ovárica conservada (86); lo que puede estar determinado por posibles alteraciones en la composición o proporción de las formas moleculares de PRL, con mayor o menor grado de acción biológica.

En varones con hiperprolactinemia puede presentar manifestaciones clínicas como hipogonadismo, tales como decremento de la libido, impotencia, infertilidad debido a la oligospermia y ginecomastia (87).

Hormona de Crecimiento

La adenohipofisis humana contiene de un 5 a 10 mg de GH, que se sintetiza y almacena en las células somatotróficas, representan cerca del 50% de las células, y ocupa principalmente el ala lateral de la hipófisis (88).

El gen humano de GH tiene un grupo de cinco regiones altamente conservadas, con aproximadamente 66 kilobases que se localizan sobre el brazo largo del cromosoma 17 (89). Estos genes están colocados de la posición 5' a la 3' como hGH-N, hCS-A, hGH-V y hCS-B. Estos tres últimos son expresados en el humano por la placenta, mientras que la hGH-N codifica la proteína de 191 aminoácidos con un peso de 22 KDa que es expresada en los somatotrofos (90). En la figura 6 se puede observar la estructura del gen de GH humano.

La estructura tridimensional de la GH de 22 KDa tiene dos tipos de uniones disulfuro una en la posición 53 con la 65 y otra entre el aminoácido 182 y el 189 (91).

La GH presenta una notable heterogeneidad molecular como resultado de fenómenos transcripcionales, pretraduccionales, postraduccionales y postsecretorios (92). En la circulación se han encontrado tres principales isoformas: la GH monomérica de 20 a 22 KDa, representa el 90% de la GH sintetizada y con un 40-45% de la inmunoreactividad total; la GH dimérica de 40 a 50 KDa con 20% de inmunoreactividad y por último la GH oligomérica con un peso de más de 60 KDa, con cerca del 30-35% de la actividad total de la GH (93).

La heterogeneidad molecular de la GH es aún más compleja que la de la PRL por la existencia de dos proteínas transportadoras específicas, una de elevada y otra de baja afinidad que al unirse a la GH modifican también sus características estructurales y limitan su acción biológica (94).

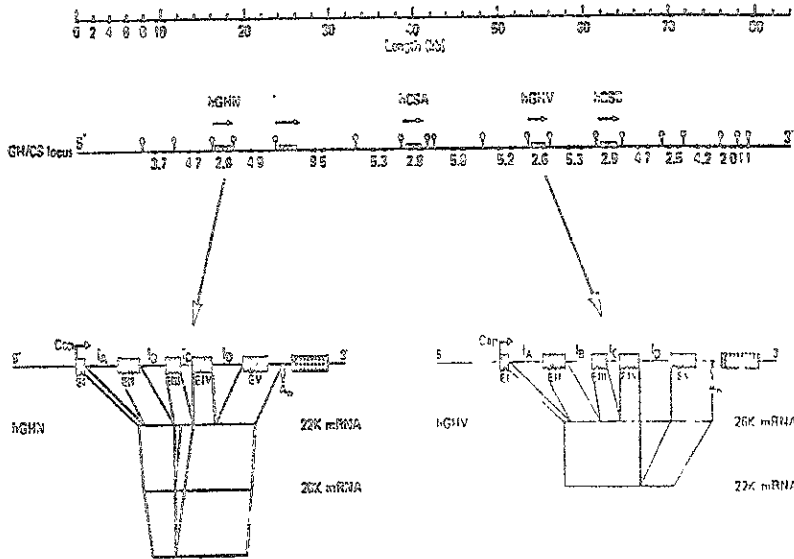


Figura 6. Estructura del gen de la hormona crecimiento humana

En el lado derecho de la figura se tienen la hGH-N que produce la GH humana y que es secretada por la hipófisis. Los cuadros oscuros representan las cinco regiones de mRNA codificadoras de GH señaladas con números romanos I-V (exones). Las líneas con letras de la A - D, son las secuencias intermedias (intrones). La posición alterna del empalme en E-II es lo que da origen a la variante 20kD de la GH, el cuadro punteado representan el segmento no traducido. En el lado izquierdo se representa la variante hGH-V que se produce en la placenta.

La variante de GH que se produce en la placenta durante el embarazo contiene 191 aminoácidos, de los cuales 161 son idénticos a la GH y los puentes disulfuro se localizan en las mismas posiciones (95).

La secreción de GH esta regulada por el hipotálamo a través de la hormona liberadora de crecimiento (GHRH) y la somatostatina. La GHRH controla la transcripción del mRNA de la GH a través de los niveles de la vía cAMP (96); mientras que la somatostatina es una hormona inhibidora, que controla la liberación y la amplitud de los pulsos de GH pero no tiene efecto sobre su síntesis (97).

Se ha visto también que los estrógenos son reguladores importantes en la secreción de GH. El sitio de acción de los estrógenos puede ser al nivel de la expresión génica en el Pit-1 para activar la transcripción de GH (98). Los estrógenos también tienen influencia en la síntesis de las proteínas de unión o factores de crecimiento insulinoide (IGF-1) son proteínas que se unen a la GH y circulan en el plasma como un complejo proteico (99). Alrededor del 15 al 20 % de la GH circulan en forma de complejo (100).

La secreción de GH depende de un gran número de factores en los que se incluyen el estado de desarrollo, el estado nutricional, sueño, estrés y ejercicio (101). Por ello las concentraciones de GH varían desde valores no detectables hasta valores de 4.5 ng/mL, en mujeres y hombres adultos normales (102). En el suero fetal se incrementan en el primer trimestre y el pico se encuentra cerca de la 20ª semana de la gestación; la mayor concentración circulante de GH se presenta durante la adolescencia y decrece con la edad tanto en hombres como en mujeres (103).

La GH tiene una acción directa en múltiples sitios como el hígado, tejido adiposo hueso, músculos gónadas y linfocitos (104). En el humano tiene un efecto metabólico importante ya que influye como

un promotor potencial en la síntesis de proteínas, en la lipólisis y la gluconeogénesis por lo que la GH se describe como un anabólico, lipolítico y diabético (105).

Las hormonas pueden actuar de diversas formas, actuar a distancia que es el efecto endocrino, otras tienen acción paracrina es decir sobre células adyacentes y pueden tener efecto autocrino ya que ejercen su acción sobre la misma célula, para que esta respuesta se lleve a cabo se requiere de la presencia de receptores.

El receptor de GH presenta dos variantes de receptores, la forma corta y la forma larga. Se han identificado dos sitios del receptor que interactúan con la molécula de GH para la unión de dos moléculas del receptor con una molécula del ligando (106). La primera unión es en el sitio 1 del receptor que es una secuencia compleja, posteriormente un segundo receptor en el sitio 2 se une a la molécula de GH, formando un complejo dimérico de 1GH:2GH (107), este complejo activa a la familia JAK2 (tirsina-cinasas) y a la familia de factores de transcripción STATs y la activación de JAK/STAT dependerá del tipo de célula (108). En la figura 7 se muestra en forma esquemática la activación del receptor de GH y PRL.

La unión de PRL o GH con sus receptores es específica y de elevada afinidad, sin embargo considerando la homología estructural entre ambas hormonas (109), la diversidad de formas moleculares y la homología entre los receptores, se piensa que es factible que la GH pueda unirse a los receptores de PRL o que esta se una al receptor de GH para promover una acción somatotrópica, como se ha observado en algunos pacientes con prolactinomas (110). De esta manera se explica que GH y PRL resulten competitivas frente a sus receptores y manifiesten una acción biológica no específica, sobre todo cuando se encuentran en concentraciones elevadas (111).

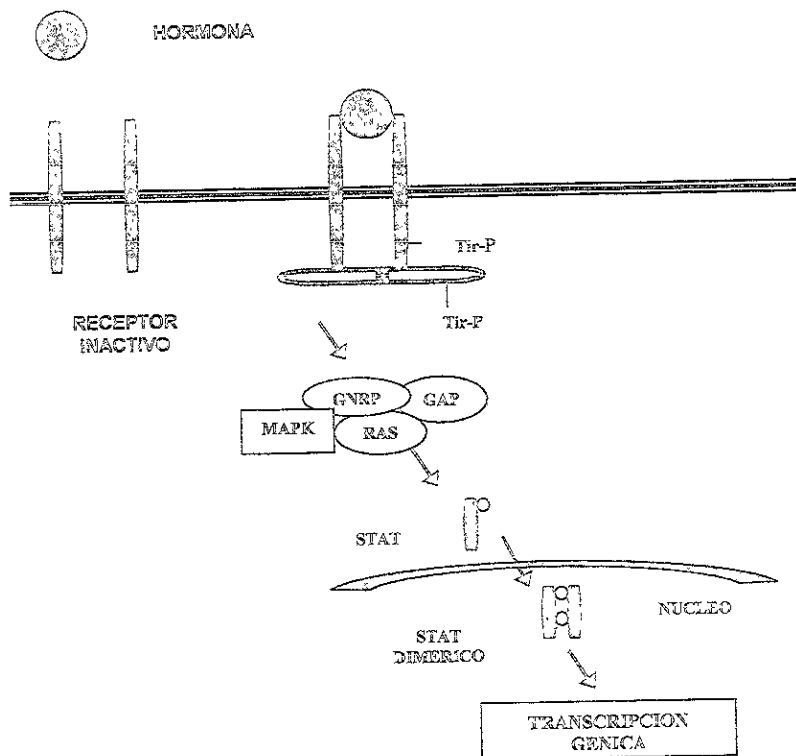


Figura 7. Mecanismo de acción de los receptores tirosin-cinasas
 Representación esquemática del mecanismo a través del cual los receptores de GH y PRL inician la transcripción

MATERIAL Y METODOS

METODO

Pacientes

Se estudiaron 38 mujeres de 20 a 35 años de edad, las cuales se asignaron en cuatro grupos de acuerdo con los siguientes criterios de inclusión:

Grupo 1- *Testigo*. Mujeres sanas de 20 a 35 años de edad, con ciclos menstruales regulares y niveles hormonales normales (n=8).

Grupo 2- *Normoprolactinémicas con galactorrea*. Mujeres con valores normales de PRL, que presentaban galactorrea y con ciclos menstruales regulares (n=10).

Grupo 3- *Hiperprolactinemia con amenorrea y sin galactorrea*. Mujeres con hiperprolactinemia (PRL >20ng/mL), que durante el presente estudio presentaron amenorrea, sin datos en la historia clínica de galactorrea o tumores hipofisarios (n=10).

Grupo 4- *Hiperprolactinemia con amenorrea y con galactorrea*. Mujeres con hiperprolactinemia (PRL >20 ng/mL), con amenorrea durante el presente estudio y con datos en la historia clínica de galactorrea, sin presentar tumores hipofisarios (n=10).

Todas las pacientes aceptaron voluntariamente participar y firmando su carta de consentimiento en este proyecto, el cual fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación del Hospital de Especialidades del CMN siglo XXI del IMSS.

Los criterios de exclusión fueron que las mujeres estudiadas no presentaran patología mamaria, excepto la galactorrea en los grupos referidos, sin ingerir medicamentos, sin estar embarazadas durante el estudio o con embarazos previos en los dos últimos años.

A todas las pacientes se les tomaron muestras de 10 mL de sangre

venosa en ayunas entre las 7:00 y 8:00 h., y con un reposo previo de 15 minutos antes de la toma; en las mujeres con función ovárica normal se realizó la toma de muestra, a la mitad del ciclo y a las mujeres que presentaron amenorrea en cualquier día.

La sangre se centrifugó a 1500 rpm durante 20 minutos, se separó el suero y se fraccionó en alícuotas, que se almacenaron a -35°C hasta su procesamiento para el estudio hormonal y cromatográfico.

Las determinaciones para las concentraciones de FSH, LH, GH, PRL, estradiol se realizaron por radioinmunoanálisis.

TECNICAS ANALITICAS

Radioinmunoanálisis

El radioinmunoanálisis (RIA) es una microtécnica para la cuantificación sensible, precisa y reproducible de diversos analitos en fluidos biológicos y su fundamento es el siguiente:

El RIA es un procedimiento en el que se lleva a cabo una competencia entre moléculas de antígenos homólogos o semejantes entre sí, uno no marcado (Ag) y otro idéntico, marcado con un radioisótopo (Ag*), por los sitios de unión con anticuerpos específicos (Ac), siguiendo la ley de acción de masas. Después de un período de incubación a un tiempo y temperatura previamente establecidos, se forman (asociación) y se separan (disociación) complejos antígeno-anticuerpo, hasta alcanzar el equilibrio; algunas moléculas de antígeno quedan libres. Al finalizar la incubación se utiliza un sistema de separación de las moléculas de antígeno que quedaron unidas a los anticuerpos (fracción unida), de las que no lo están (fracción libre). En la figura 8 se observa la reacción general de RIA.

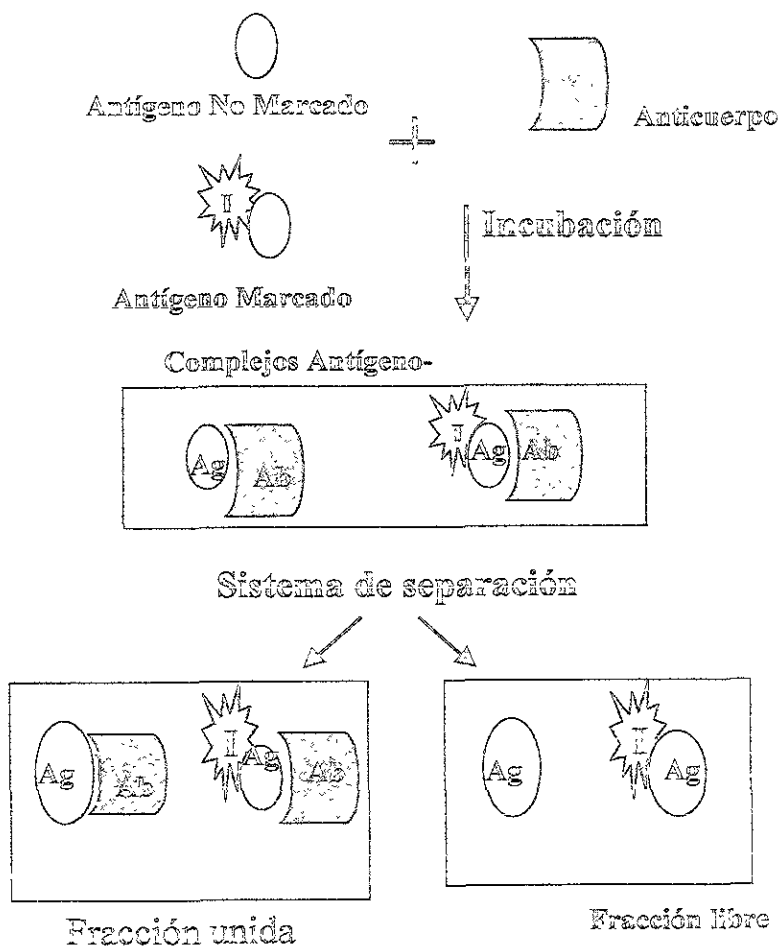


Figura 3. Reacción General del Radioinmunoanálisis

El RIA se lleva a cabo por la competencia entre moléculas de antígenos semejantes entre sí, los antígenos no marcados o fríos (Ag) y los antígenos marcados con radioisótopos llamados radiotrazadores (Ag*) por los sitios de unión con los anticuerpos (Ac). El Ag unido al Ac forman la fracción unida y los no unidos la fracción libre, los cuales se separan usando un sistema de separación adecuado.

Determinaciones Hormonales

Las determinaciones de LH, FSH, PRL y GH se realizaron por la técnica de RIA de doble anticuerpo y el estradiol por RIA de fase sólida, con estuches comerciales de Diagnostic Products Corporation. Para tener un buen control de calidad de los estuches, se realizó la validación, para todas las hormonas. En este trabajo sólo se presentan los realizados a PRL y GH.

Control de Calidad para validar PRL

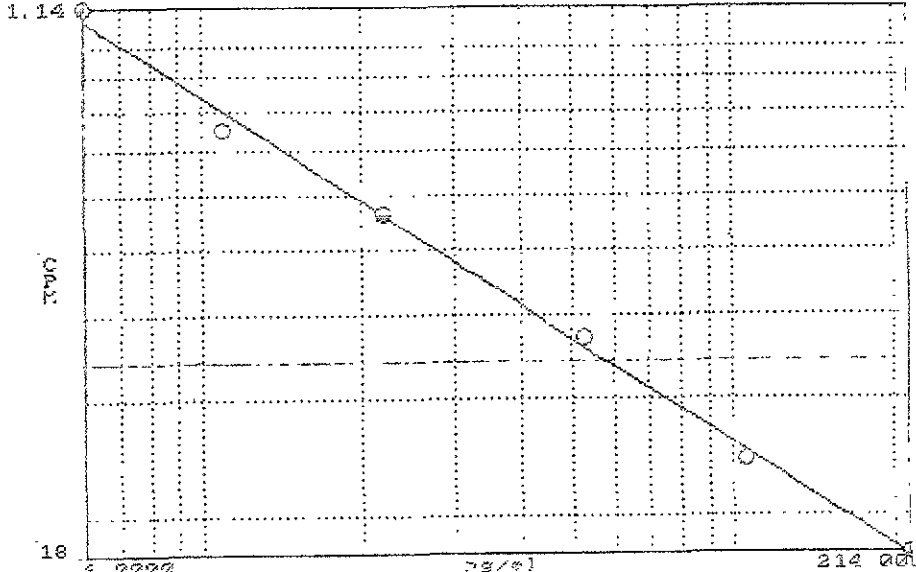
Para validar los valores obtenidos por la técnica de doble anticuerpo que se utilizó para medir las concentraciones de GH se realizaron los siguientes parámetros de control de calidad:

1) Curva de calibración de prolactina

La cantidad de hormona presente en una muestra desconocida se determina comparando su porcentaje de unión con el obtenido con cantidades conocidas de la hormona (estándares). Esta hormona, de concentración conocida actúa como el anticuerpo no marcado (Ag), y al agregar la hormona marcada con yodo 125 (Ag*) se inicia la competencia por los sitios de unión del Ac; por lo que mientras más elevada sea la concentración de la hormona no marcada, menor será el porcentaje de radioactividad unida al anticuerpo. Así, al interpolar el porcentaje unido sobre la curva se puede calcular la concentración de la hormona en la muestra desconocida.

La figura 9 muestra la gráfica de la curva de calibración de un ensayo de PRL. En la parte inferior de la curva se muestra los valores de la pendiente, la correlación entre los puntos y el intercepto de la curva, así como las concentraciones de los estándares utilizados.

Assay Type: RIA CPM BOUND
 (*10000)



STD #	CPM	DEFINED DOSE	ZR/F	CALC. DOSE	% DIFF
1	11422	6.00000		5.52653	-7.87
2	9282	11.00000		12.45627	13.20
3	7389	22.00000		21.74280	-1.17
4	5672	53.00000		49.87046	-6.24
5	2694	105.00000		112.47519	6.11
6	1766	214.00000		209.86543	-2.46

Curve Fit : LOGIT	Transform X : LOG	Transform Y : LOGIT
Corr. Coef. : 0.9969		Slope : -2.3558
Calc. Limit : 4.3090		Para. Const. : .9927
NWSB/Total : 1.2599	ED50 : 22.617	NWSB/Total : 33.836
ED20 : 87.480		ED80 : OFF CURVE
2Sigma Std. : 2.3569		
Intercept : 3.17621		

Figura 9. Curva de Calibración de PRL de un ensayo realizado para esta hormona.

En la figura se representan las diferentes concentraciones de los estándares utilizados para su calibración y los diferentes parámetros de control de calidad de la curva.

2) Precisión

La precisión la definiremos como la dispersión de una misma muestra alrededor de su promedio. En este caso se evaluó seleccionando tres muestras con tres diferentes rangos de concentración conocidas de PRL, en el que se midió la reproducibilidad de los datos. Se procesaron en 10 pares de tubos, en un mismo ensayo y se obtuvo la media (\bar{x}) y la desviación estandar (SD), se calculo el coeficiente de variación para los tres rangos.

Muestra	$\bar{x} \pm SD$	CV%
Bajo	9 ± 0.4	4.4
Medio	22 ± 0.5	2.3
Alto	43 ± 1.2	2.8

El perfil de precisión fue adecuado ya que presentaron CV menor del 10% en las diferentes concentraciones.

3) Sensibilidad

Es la mínima dosis detectable distinta de cero, que puede ser medida en el ensayo de PRL y esta definida como la aparente concentración a un 95% de B/Bo; donde B representa la unión entre el radiotrazador y el Ag de concentración cero, y Bo es el valor de referencia que representa el 100% de unión, que en este caso fue de 1 ng/mL.

4) Exactitud

Es el grado de coherencia entre el valor obtenido a través del análisis y la concentración verdadera de la muestra, se determinó por estudios de recuperación. A una muestra de concentración conocida de 6 ng/mL, se le agregó una solución con diferentes concentraciones de PRL probadas previamente y que fueron de 13.4, 26.8, 53.7, 89.7 y 107.3 ng/mL, y se obtuvieron los siguientes resultados:

Estandar preparado	Valor Esperado (ng/mL)	Valor Obtenido (ng/mL)	O/E (%)
13.4	19.4	21	108.2
26.8	32.8	36	109.7
53.7	59.7	65	108.8
89.4	95.4	98	102.7
107.3	113.3	120	105.9

Los resultados confirman que la técnica de doble anticuerpo para PRL es exacta dentro del margen establecido (90-110%).

5) Especificidad

El antisuero de PRL es muy específico y no presentó reacción cruzada con GH, hHCG y hPL:

Hormona	Cantidad Agregada	Reacción-Cruzada
GH	500 ng/mL	ND
hHCG	1000 UI/mL	ND
hPL	100 ug/mL	ND

ND: No Detectable

Control de calidad para validar GH

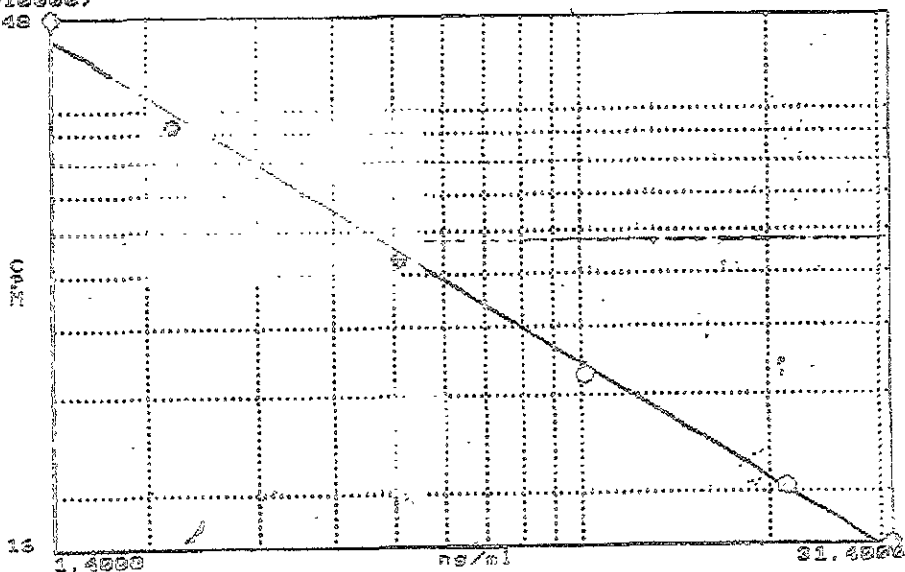
Para validar los valores obtenidos por la técnica de doble anticuerpo, que se utilizó para medir las concentraciones de GH, se realizaron los siguientes parámetros de control de calidad:

1) Curva de calibración de Hormona de Crecimiento.

La figura 10 es un ejemplo de la curva de calibración de GH en uno de los ensayos realizados, en la parte inferior se muestran diferentes parámetros de control de calidad de la curva de calibración como la pendiente, intercepto, coeficiente de correlación.

19 Sep 97 12:44 Richard Instrument Company Page 63
 Protocol 0616 M.CRECIMIENTO Door 1

Assay Type: RIA CPM BOUND
 (*10000)



STD	CPM	DEFINED NG/ML	ADJ	Calc. LINE	RESID
1	10790	1.00000		1.26306	-11.17
2	13037	2.20000		2.37603	0.57
3	9230	5.10000		3.34023	0.78
4	5765	10.00000		10.67331	3.60
5	2330	21.20000		20.75226	-1.10
6	1601	31.00000		29.67310	-5.50

Curve Fit : LINEAR
 Corr. Coef. : 0.9120
 Det. Limit : 1.0000
 SRES/Total : 0.5633
 ERSD : 15.945
 Sigma Std. : 0.0700
 Intercept : 2.75700

Transfer 1 : 103
 ERSD : 1.0220

Transfer 7 : 10311
 Slope : -5.7280
 Para. Coef. : 1.9970
 XRES/Total : 33.239
 ERSD : 2.5931

Figura 10. Curva de calibración de un ensayo de GH.

En esta figura se representa la curva de calibración para la GH, los estándares utilizados para su calibración y los diferentes parámetros de control de calidad de la curva

2) Precisión

Se determinó la reproducibilidad a la técnica de doble anticuerpo a cinco muestras de concentración conocida, que representan el nivel de valores normales de GH en humanos. Se calcularon en 10 pares de tubos dentro del mismo ensayo, coteniéndose la media y la desviación estándar los datos se muestran en la siguiente tabla:

Muestra	$\bar{x} \pm SD$	CV%
1	1.1 \pm 0.065	5.9
2	2.3 \pm 0.070	3.0
3	5.3 \pm 0.086	1.6
4	6.0 \pm 0.092	1.5
5	10.9 \pm 0.167	1.5

Se obtuvo un perfil de precisión adecuado con CV menor del 10%

3) Sensibilidad

La detección límite del ensayo a una concentración del 95% B/B₀ fue de aproximadamente 0.9 ng/mL.

4) Exactitud

La exactitud del ensayo de GH se evaluó agregando a una muestra de concentración conocida de 2.8 ng/mL, agregando esta a diferentes concentraciones de GH como se observa en la siguiente tabla:

Estándar preparado	Valor Esperado	Valor Obtenido (ng/mL)	O/E (%)
2.5	5.3	5.3	100
5.0	7.8	7.8	100
10	12.8	12.0	94
20	22.8	22.3	98

5) Especificidad

El antisuero de Gh es muy específico, con PRL presenta reacción-cruzada despreciable y con el hPL no presentó. Los resultados se observan en la siguiente tabla:

Hormona	Cantidad Agregada (ng/mL)	Reacción Cruzada (%)
PRL	700	0.6
hPL	100	ND

ND: No Detectable

Cromatografía en gel

La cromatografía en gel es un método de fraccionamiento bioquímico, que se basa en la diferencia de los tamaños moleculares. La herramienta para obtener una separación es el medio cromatográfico que esta formado por partículas pequeñas de gel que no presentan carga; estas moléculas tienen gran afinidad al disolvente, presentan enlaces cruzados para dar un armazón tridimensional que las hace insolubles, este en lugar de disolverse con el líquido se hinchan tomando una gran cantidad del disolvente y son empacadas en un tubo (fase estacionaria). El espacio entre las partículas de gel esta ocupado por un líquido que se hace fluir a través del medio cromatográfico, así las sustancias que se van a separar son acarreadas por el flujo del líquido. La fase estacionaria retarda el paso de las sustancias en diferente grado y separa a las sustancias de acuerdo con su tamaño molecular, las moléculas grandes emergen primero del medio, ya que por razones estéricas (de tamaño) no

penetran en el gel y viajan a la misma velocidad del líquido, mientras que las moléculas pequeñas pueden penetrar en el gel y se retardan, por lo que migran por el medio a diferentes velocidades; el efecto retardatorio es producido por la partición de las sustancias entre el líquido y la fase estacionaria. La figura 11 se representa el principio de la cromatografía en gel.

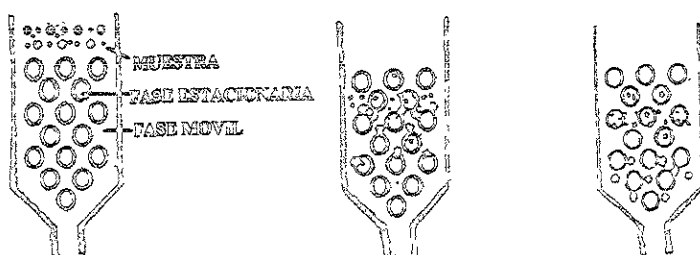


Figura 11. Representación gráfica del principio de la filtración en gel.

La cromatografía en gel presenta varias ventajas, entre las que se puede mencionar que no se produce desnaturalización de las proteínas, ya que el proceso se puede llevar a cabo bajo condiciones muy suaves de pH, el rango de separación es muy amplio y puede fraccionar desde sustancias en la región inferior a pesos moleculares de 1000 hasta pesos moleculares de varios millones, el sephadex es altamente estable y el mismo gel se puede usar durante años, sólo se trata de evitar la contaminación por bacterias. Para la valoración de los resultados experimentales es necesario establecer algunos parámetros que caracterizan el lecho cromatográfico como se muestra en la figura 12:

Volumen total del lecho (V_T). Es el volumen que abarca la longitud y altura del lecho y se extiende desde el soporte hasta la parte superficial del gel. Para medirlo se aplicaron a la columna 10 ul de

una solución de I^{125} (30,212 cpm que se obtuvo en el contador de radiación β), se recolectan las fracciones que de la columna, hasta obtener la totalidad de cpm. El volumen necesario para la elución del I^{125} corresponde al V_t de la columna.

Volumen de vaciado (V_0). Es el volumen del líquido del espacio intersticial entre los granos de gel del lecho. En la cromatografía en gel para determinar el V_0 se pueden emplear sustancias que eluyan totalmente y en este caso se utilizó azul dextran con un peso molecular aproximado de 2×10^6 , ya que esta molécula no penetra en los poros del gel. El volumen de vaciado incluye el espacio muerto que se encuentra debajo del soporte del lecho y el volumen de los tubos entre la columna y el colector de fracciones. Para obtener el V_0 se aplicaron 3 mL de azul dextran al 5%, en la parte central del lecho de la cromatografía y se recolectaron las fracciones necesarias para su elución. Finalmente se leyó la absorbancia de cerca de una de las fracciones a 610 nm. El volumen en el que eluye indica el volumen de vaciado de la columna.

Volumen del gel en el lecho (V_x). Se obtiene por la diferencia entre el volumen total del lecho y el volumen de vaciado.

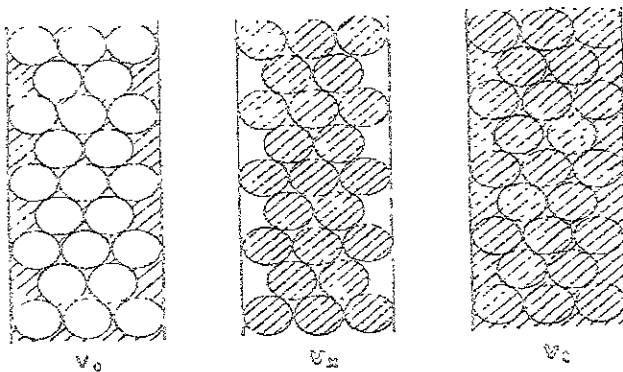


Figura 12. Se muestra en forma esquemática el V_0 , V_x y V_t .

Estos datos que se obtienen del corrimiento en una columna se utilizan para caracterizar la cromatografía, siendo necesario agregar diferentes marcadores de PM (proteínas de peso molecular conocido) para obtener la curva de calibración de pesos moleculares, en la que se puede conocer el peso de las diferentes sustancias sometidas al estudio cromatográfico para su caracterización.

La variable que se puede determinar es el volumen de elución de una sustancia denominado V_e . Este es el volumen teórico del eluyente que se requiere en promedio para transportar a las moléculas de la sustancia a través de la columna. Se puede utilizar el V_e para caracterizar a una sustancia, pero este valor tiene un significado limitado ya que depende de la geometría del medio cromatográfico, la temperatura y algunos otros factores que puedan modificar el V_e ; por eso para caracterizar el comportamiento de un soluto se utilizan los siguientes parámetros:

Volumen relativo de elución V_e/V_0 , donde V_0 muestra el volumen vacío, o el volumen de elución para una sustancia que está completamente excluido del gel, el V_e representa el volumen de elución de la molécula en estudio, es dependiente del empaquetamiento de la columna.

El valor de V_e/V_t es fácil de calcular, aunque es susceptible a la variación del empaquetamiento del gel, la variación de V_e/V_t es más pequeño, que la del V_e/V_0 .

El coeficiente de partición K_{av} es la medida del comportamiento de una molécula entre la fase líquida y la fase del gel. Esta variable es independiente de la compactación del gel, la temperatura y otros factores por lo que es el índice más confiable para caracterizar a una molécula en la cromatografía y se representa con la siguiente fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Condiciones de la Columna

Las condiciones en las que se trabajó la cromatografía fueron las siguientes:

Se utilizó una columna de vidrio de 60x1 cm que se empacó con Sephadex G - 100 que son partículas que tiene una medida de 40 - 120 micras, con un rango de fraccionamiento de PM de 1,000 a 100,000 de la casa comercial Pharmacia Fine Chemicals, la columna se acopló a un colector de fracciones (Gilson USA) programado a un volumen y tiempo constante (1 gota cada 12 segundos) hasta completar un volumen de 1 mL y se obtuvieron 70 fracciones. El eluyente empleado fue un amortiguador de fosfatos con 0.01M con azida de sodio y albúmina al 0.1% y un pH de 7.0. Para determinar el V_o se utilizó azul dextran y el V_t de la columna se obtuvo con I^{125} . Para poder trazar la curva de calibración se utilizaron los siguientes marcadores de peso molecular (marca Sigma) y con sus respectivas concentraciones se utilizaron; albúmina bovina (BSA) de 66 KDa (5mg/mL), ovoalbúmina (OVO) de 45 KDa (3mg/mL), tripsina (TRI) de 20 KDa (3mg/mL) y lisozima (LIS) de 14.3 KDa (2mg/mL). Para obtener el V_e de cada uno de los marcadores se hacen pasar por la columna y a las fracciones recolectadas se mide su absorbancia a 280 nm que es el punto máximo de absorbancia de las proteínas en el espectro de ultravioleta, obteniendo su V_e y este junto con el PM respectivo permite elaborar la curva de calibración de pesos moleculares por cromatografía, que se observa en la figura 13.

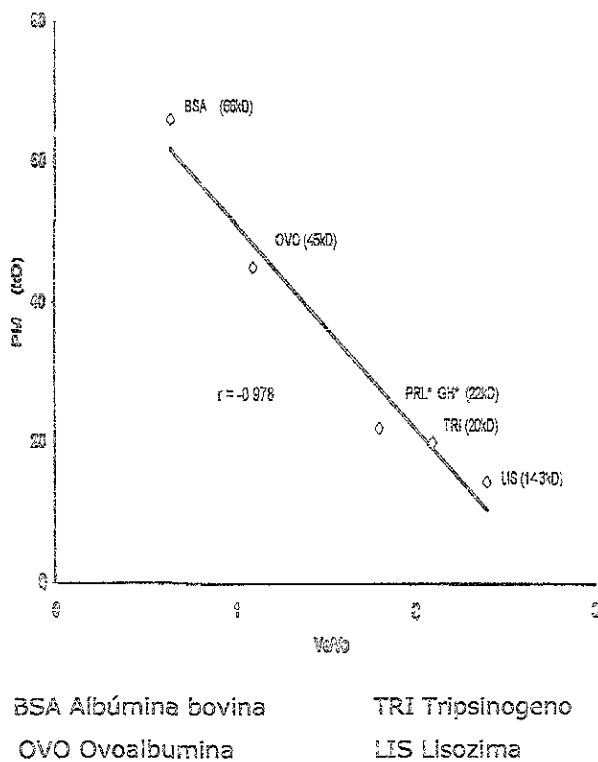


FIGURA 13. Curva de Calibración de Pesos Moleculares

En esta curva se representa la relación entre el PM de cada uno de los diferentes marcadores utilizados y el volumen relativo de elución

Una vez estandarizada la columna, se aplicaron las muestras de suero que eluyeron con el amortiguador de fosfatos, recolectando 70 fracciones de 1ml. Después, en cada una de las fracciones se determina la concentración de PRL y GH por RIA para obtener los perfiles de elución de las formas moleculares de las hormonas.

ANALISIS ESTADISTICO

Se determinó sesgo y curtosis de cada uno de los valores hormonales correspondientes a cada grupo, así como la expresión porcentual de las diferentes formas moleculares correspondientes a cada grupo obteniéndose una distribución normal. Todos los valores son expresados por la media y la desviación estandar y la significancia estadística, para la diferencia de los valores promedio de cada uno los diferentes grupos estudiados se determinó mediante ANOVA y la prueba comprobatoria de Tukey.

A las determinaciones de GH, de la cual se estudiaron solo dos grupos, y las diferencias se analizaron mediante la prueba de t-student.

En ambas pruebas estadísticas se considero como significativa una $p < 0.001$ y $p < 0.05$.

RESULTADOS

Estudio Hormonal

En la figura 14 se puede observar la concentración de LH, FSH y estradiol de los valores hormonales de los diferentes grupos estudiados. En el histograma (a) se representan la concentración de LH que fue diferente entre los grupos de estudio, los valores mayores fueron para el grupo testigo, y menores para los otros tres grupos estudiados, con la prueba de Tukey se observa hubo una diferencia significativa ($p < 0.001$), entre el grupo testigo y cada uno de los demás grupos, mientras que entre los grupos con hiperprolactinemia con y sin galactorrea la diferencia fue menor ($p < 0.05$). grupos.

Los niveles de FSH se muestran en el histograma (b), no se observaron diferencias significativas entre los cuatro grupos de estudio.

El histograma (c) muestra las concentraciones de estradiol, los niveles en mujeres con hiperprolactinemia fueron menores con relación a los grupos testigo y de normoprolactinemia con galactorrea, la prueba confirmatoria de Tukey nos indica que hay una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre el grupo testigo y normoprolactinemia con galactorrea y los grupos con hiperprolactinemia y una significancia menor ($p < 0.05$) entre los dos grupos de hiperprolactinemia.

En la figura 15 el histograma (a) muestra los niveles de concentración de PRL en los cuatro grupos, donde se puede observar una diferencia, entre los grupos con prolactina normal y una mayor concentración en los grupos con hiperprolactinemia.

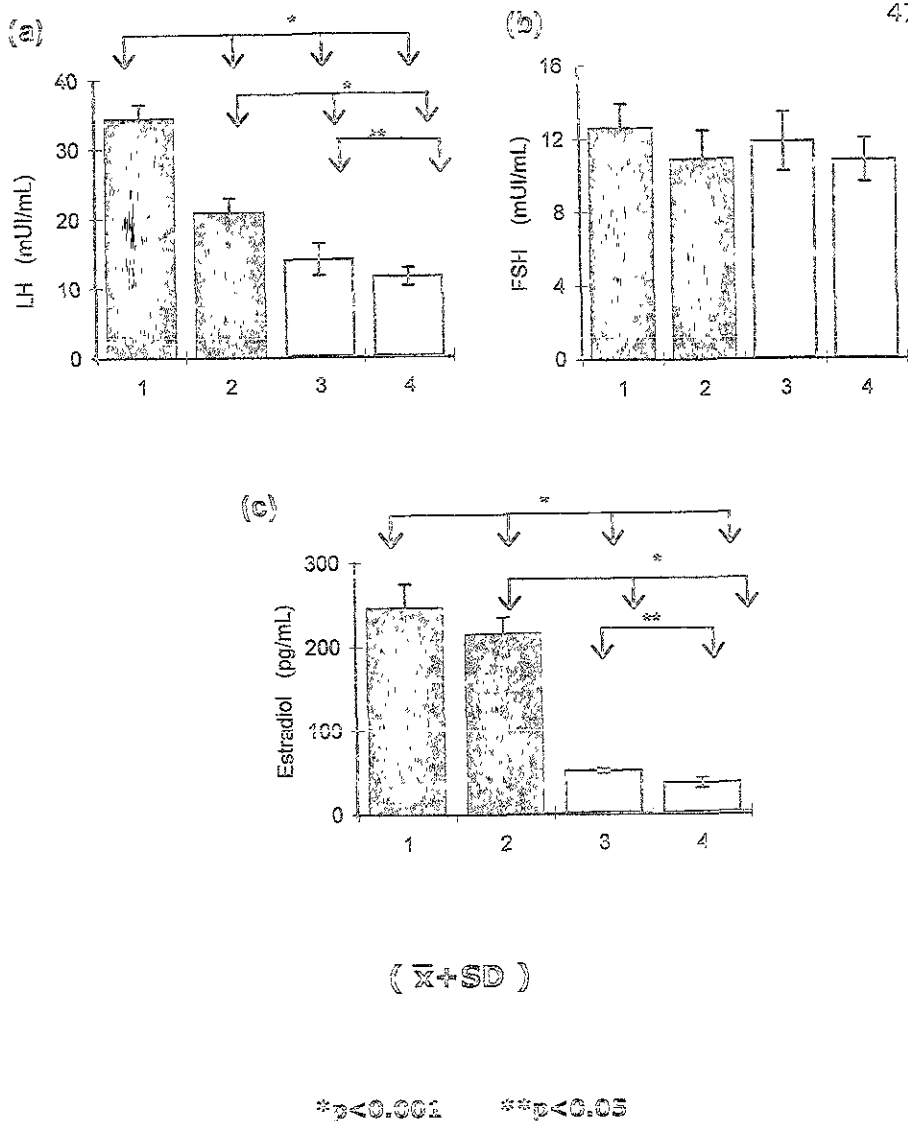
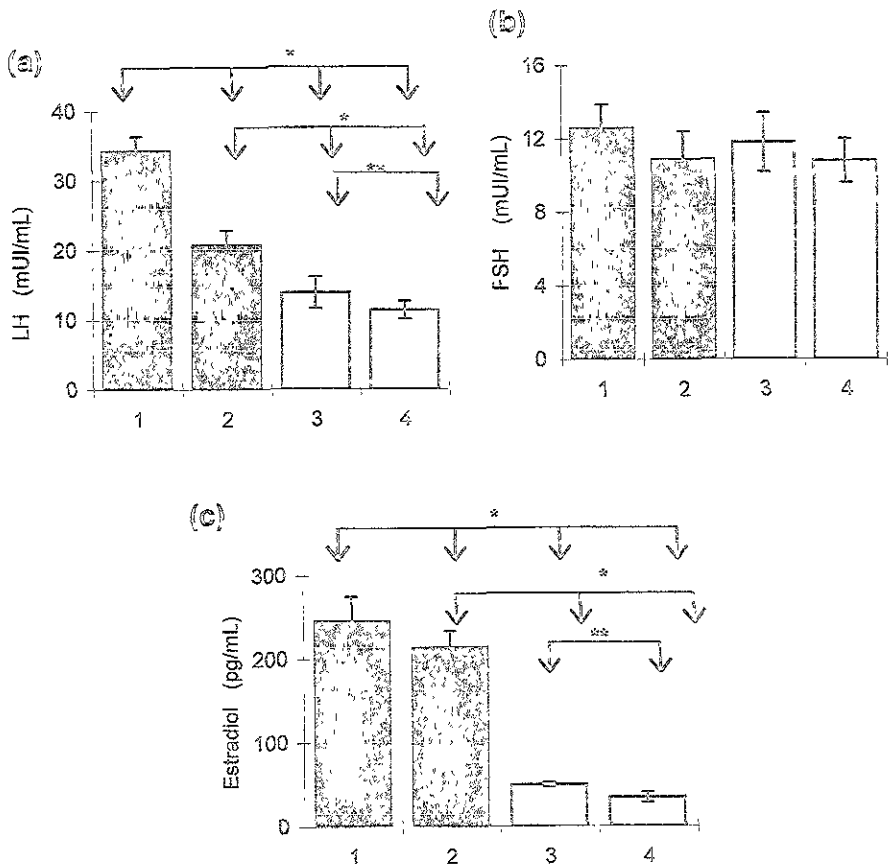


FIGURA 14. Representación Gráfica de los valores hormonales.

a) histograma de LH, b) Histograma de FHS, c) Histograma de estradiol

- Grupos:
- 1) Testigo
 - 2) Normoprolactinémica con galactorrea
 - 3) Hiperprolactinémica
 - 4) Hiperprolactinémica con galactorrea



* $p < 0.001$

Figura 25. Representación Gráfica de los niveles hormonales
 a) Histograma de PRL y b) histograma de GH.

Grupos : 1) Testigo

2) Normomoprolactinemia con galactorrea

3) Hiperprolactinemia

4) Hiperprolactinemia con galactorrea

Con la prueba de Tukey se encontró una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los grupos de hiperprolactinemia con el testigo y el grupo de normoprolactinemia con galactorrea con los grupos de hiperprolactinemia; pero no significativa entre el grupo testigo y el de normoprolactinémicas con galactorrea.

En el histograma (b) se representan las concentraciones de GH en el grupo testigo y el grupo de normoprolactinémicas con galactorrea presenta diferencia significativa ($p < 0.001$) con la prueba de t-student; en las mujeres con hiperprolactinemia GH fue no detectable por el método utilizado.

Formas Moleculares de Prolactina

La figura 16 muestra dos de los perfiles cromatográficos obtenidos en el suero de ocho mujeres del grupo testigo en los que pueden distinguirse la presencia de 5 formas moleculares de PRL; el pico I que se eluyó con el V_0 de la cromatografía y que corresponde a la big-big PRL, el pico II que corresponde a la albúmina bovina y corresponde también a la forma grande o big-big PRL, el pico III que eluye con ovoalbúmina que corresponde a la big-PRL, el pico IV que fue la fracción cuantitativamente más importante que corresponde a la PRL monomérica conocida como L-PRL y por último se observa el pico V de menor magnitud y de bajo peso molecular, de alrededor de 16 a 4 KDa que corresponde a los productos de degradación de la PRL.

En la tabla 1 se muestra la caracterización de las cinco formas moleculares de PRL con relación al volumen de elución (V_e), el peso molecular (PM) determinado en la curva de calibración de pesos moleculares y el coeficiente de partición (K_{av}) obtenido en el grupo testigo.

	I	II	III	IV	V
Ve (mL)	20-25	26-31	32-37	38-49	50-61
PM (KDa)	100-66	60-52	50-42	40-20	16-4
Kav	0-0.04	0.062-0.16	0.18-0.29	0.31-0.54	0.56-0.79

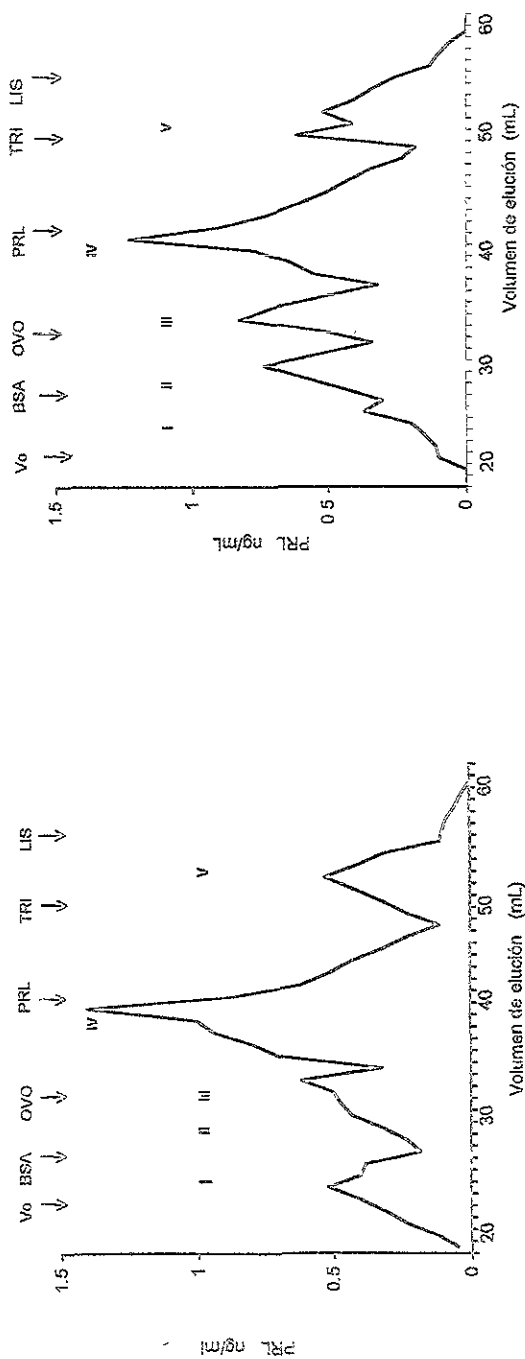
TABLA 1- Caracterización de las formas moleculares de PRL sobre la base del grupo testigo, para obtener el porcentaje de inmunoreactividad de cada una de las moléculas de PRL

En la Tabla 2 se indica el porcentaje de inmunoreactividad de PRL de cada molécula que se encontró en las ocho mujeres que se estudiaron y que fueron del grupo testigo, en este grupo se puede observar que el mayor porcentaje corresponde a la forma de 40-20 KDa (L-PRL).

Los perfiles cromatográficos de PRL representados en la figura 17, que corresponde al grupo de mujeres normoemenorreicas con galactorrea, se puede observar dos picos con una mayor concentración, uno de los picos eluye en la posición del marcador de ovoalbúmina, y corresponde a la forma molecular 45 KDa ó big-PRL, el segundo pico eluye con el de la PRL marcada y este corresponde a la forma molecular monomérica (L-PRL). La tabla 3 nos muestra el porcentaje de inmunoreactividad de PRL que se obtuvo de las diferentes formas moleculares de diez mujeres del grupo de normoprolactinemia con galactorrea.

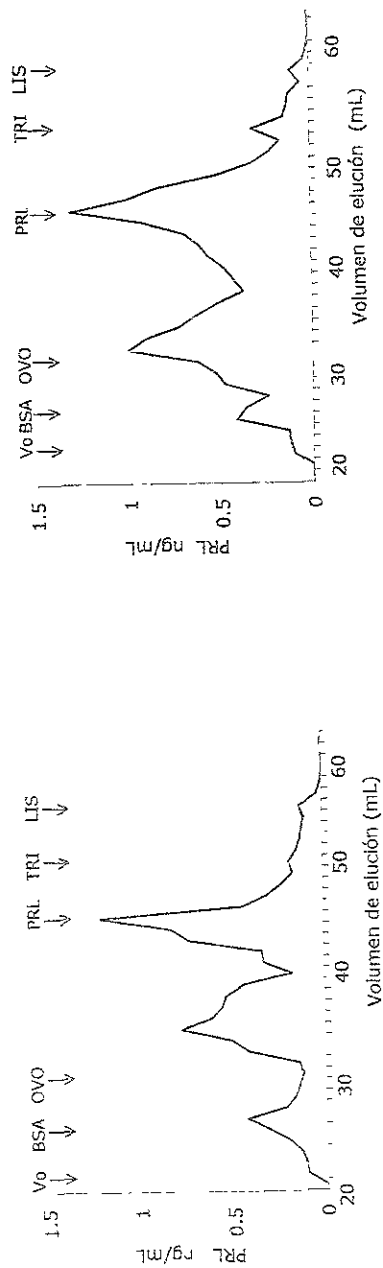
Los perfiles cromatográficos que se muestran en la figura 18, corresponde al grupo de diez mujeres con hiperprolactinemia sin galactorrea en la que se encuentra un predominio en el pico que eluye con la PRL marcada y esta correspondería a la forma monomérica de PRL (L-PRL), y con una ligera disminución de las formas grandes (100-52 KDa).

Figura 1.4. Formas moleculares de prolactina en el grupo testigo. Se muestran los marcadores de peso molecular.



PACIENTE	100 - 66	60 - 52	50 - 42	40 - 20	16-44
1	8.2	11.6	5.3	49.6	24.5
2	8.3	11.5	4.8	49.8	24.7
3	8.2	11.2	4.9	52.2	23.4
4	7.7	11	5.4	51.4	23.5
5	7.9	11.1	5	53.3	22.7
6	7.5	10.7	5.3	50.6	24.7
7	6.8	11.8	5	51	24.5
8	7.2	11.7	5.1	52.3	23.6
$\bar{x} \pm SD$	7.7 ± 0.53	11.3 ± 0.38	5.1 ± 0.21	51.2 ± 1.2	24.1 ± 0.73

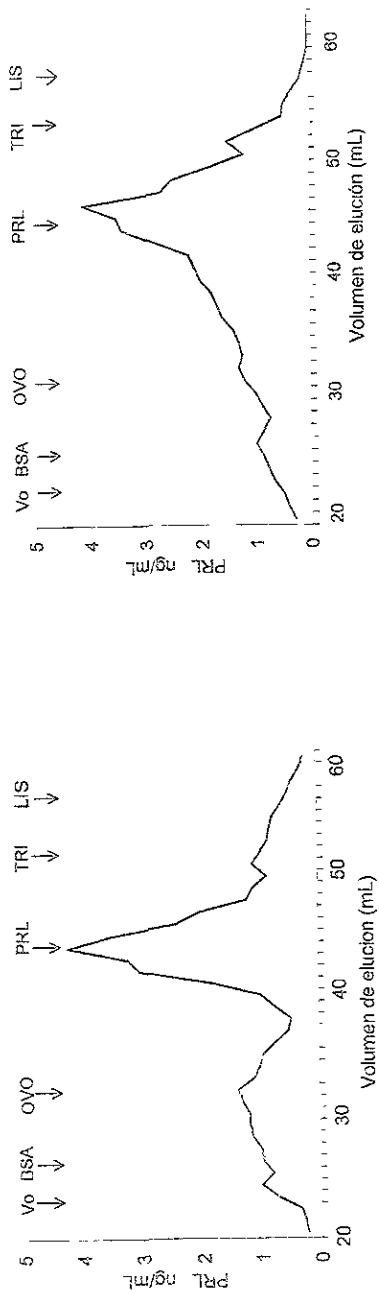
FIGURA 17. Formas moleculares de prolactina en el grupo de mujeres normoprolactinémicas con galactorrea



PACIENTE	PM (KDa)	100 - 66	60 - 52	50 - 42	40 - 20	16-44
1		3.1	5.2	26.4	49.6	15.7
2		3.3	5.3	27.1	49.2	15.1
3		3.1	4.9	28.7	49.5	13.8
4		3	4.8	26.6	51	14.6
5		3.7	5.3	27.1	49.2	14.7
6		3.3	4.9	26.7	51.8	13.3
7		3.1	4.7	27.1	52.4	12.7
8		3.5	5.1	26.7	50.4	14.3
9		3.9	5.2	26.8	53	11.1
10		3.8	4.8	27.1	52.8	11.5
	$\bar{x} \pm SD$	3.38 ± 0.32	5.02 ± 0.22	27.03 ± 0.63	50.89 ± 1.51	13.68 ± 1.52

TABLA 3. Porcentaje de inmunoreactividad de las isoformas de prolactina en el grupo de normoprolactinémicas con galactorrea

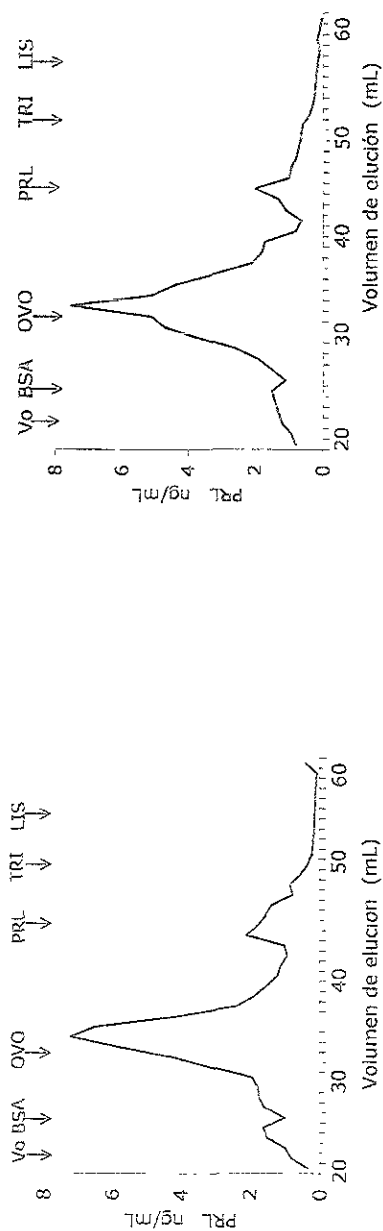
FIGURA 18. Formas moleculares de prolactina en mujeres del grupo hiperprolactinemia sin galactorrea



PACIENTE	PM (KDa)	100 - 66	60 - 52	50 - 42	40 - 20	16-44
1		5.1	6.6	10.3	63.1	14.9
2		6.3	6.9	10.9	64.3	11.6
3		5.6	7.3	11.1	63.4	12.6
4		5.3	7.8	10.7	62.5	13.7
5		6.1	6.9	11.4	64.3	11.3
6		6.4	7.2	11.1	63.5	11.8
7		6.5	7.3	10.8	64.2	11.2
8		5.3	6.9	10.4	65.1	12.3
9		6.8	7.2	10.1	62.4	13.5
10		5.4	7.1	10	63.3	14.2
	$\bar{X} \pm SD$	5.88 ± 0.6	7.12 ± 0.32	10.7 ± 0.46	63.6 ± 0.85	12.7 ± 1.29

TABLA 4. Porcentaje de Inmunoreactividad de las isoformas de prolactina en el grupo de hiperprolactinemia sin galactorrea

FIGURA 10. Formas moleculares de prolactina en mujeres del grupo de hiperprolactinemia con galactorrea



PACIENTE	PM (kDa)	100 - 66	60 - 52	50 - 42	40 - 20	16-44
1		6.2	4.3	54.8	23.2	11.5
2		6.4	3.8	55.4	22.8	11.6
3		6.9	4.1	54.2	21.4	13.2
4		5.9	4.1	56	23.7	10.3
5		5.8	4.8	56.3	21.5	11.6
6		4.9	4.2	57.2	22.5	11.2
7		6.5	5.1	55.7	21.6	11.1
8		6.4	4.4	56.1	21.8	11.3
9		6.8	4.8	54.2	22.3	11.9
10		6.5	5	54.3	21.9	12.3
$\bar{x} \pm SD$		6.2 ± 0.58	4.5 ± 0.43	55.4 ± 1.0	22.3 ± 0.8	11.6 ± 0.8

TABLE 5. Porcentaje de inmunoreactividad de las isoformas de prolactina en el grupo de hiperprolactinemia con galactorrea

La tabla 4 representa el porcentaje de inmunoreactividad de la PRL y las diferentes formas moleculares que se obtuvieron en este grupo.

Los perfiles cromatográficos característicos del grupo de mujeres con hiperprolactinemia y galactorrea se muestran en la figura 19, en la que se destaca una notable disminución de la prolactina monomérica y un predominio de las formas moleculares que eluyen con el marcador de ovoalbúmina y que corresponde la forma de 45 KDa. En la tabla 5 se muestra la proporción cuantitativa de las diferentes moléculas de PRL de las diez mujeres que formaron este grupo.

La tabla 6 nos muestra el porcentaje de inmunoreactividad de PRL, de los cuatro grupos para su comparación. En la 20 se muestra, mediante las gráficas de barras, el porcentaje de inmunoreactividad contra las diferentes formas moleculares obtenidas en cada grupo.

En la figura 21 se muestra la proporción cuantitativa de las cuatro formas moleculares que se obtuvieron de los grupos estudiados, a las cuales se les realizó el análisis estadístico de Anova y la prueba comprobatoria de comparaciones múltiple de Tukey. Los resultados obtenidos nos indican que la forma molecular de 100 a 66 KDa representada en el histograma (a), muestra una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre el grupo testigo, el grupo de normoprolactinemia con galactorrea y los grupos de hiperprolactinemia; no se encontró una diferencia significativa entre los grupos con hiperprolactinemia con y sin galactorrea.

El histograma (b) nos muestra el porcentaje de la isoforma de PRL de 60 a 52 KDa en la que se encontró una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre el grupo testigo con los otros tres grupos y una diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de normoprolactinemia con galactorrea y el grupo de hiperprolactinemia con galactorrea.

El histograma (c) se representa el porcentaje de la forma molecular de 50 a 42 KDa en la que obtuvimos una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los cuatro grupos.

El histograma (d) muestra el porcentaje de la isoforma de 40 a 20 KDa de PRL y observamos una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los grupos de hiperprolactinemia con relación al grupo testigo y el grupo con normoprolactinemia con galactorrea; pero sin diferencia significativa entre el grupo testigo y el grupo de normoprolactinemia con galactorrea.

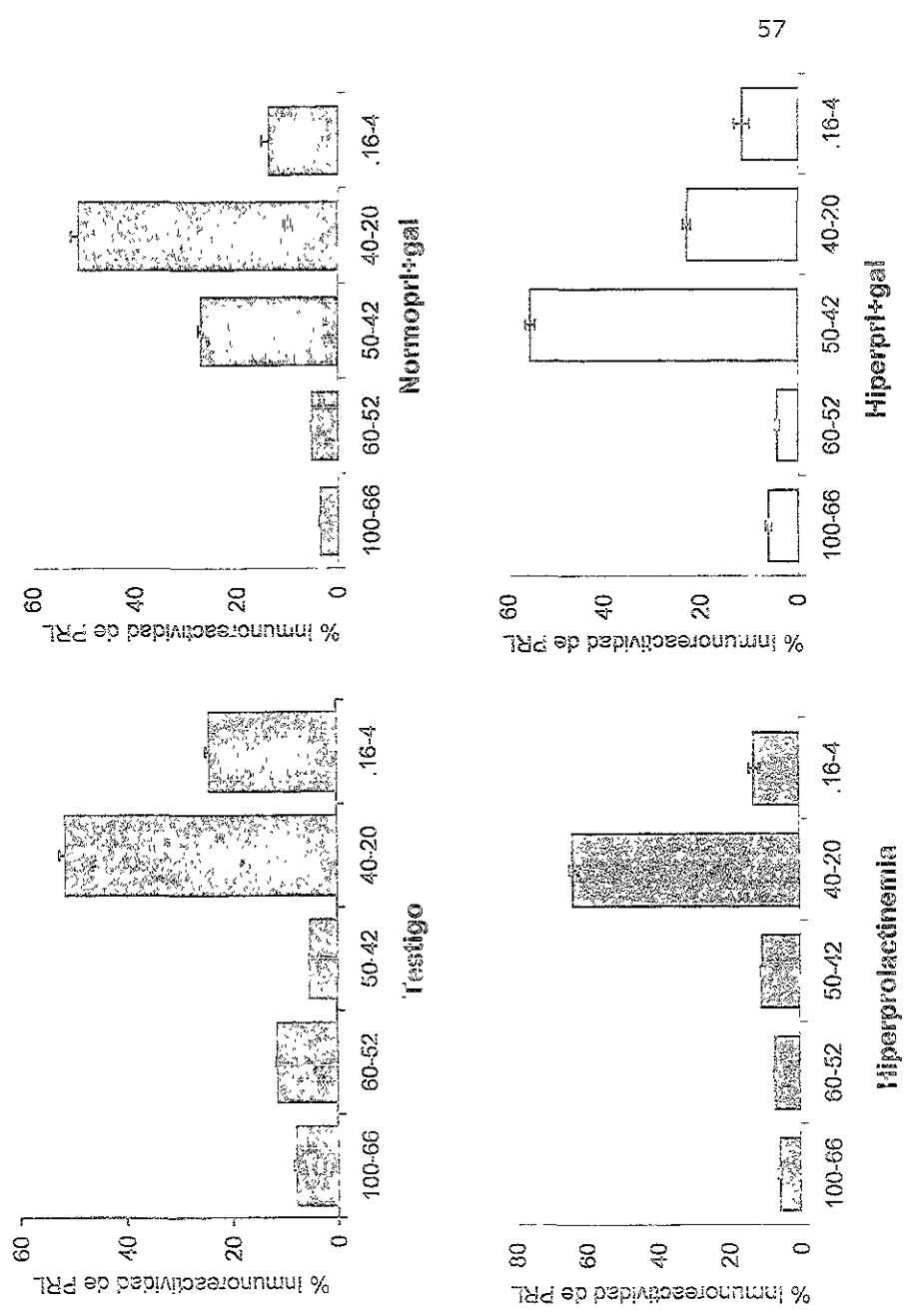
El histograma (e) representa el porcentaje de la forma molecular de 16 a 4 KDa de la PRL que mostró una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre el grupo testigo y los otros tres grupos, y diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el grupo de normoprolactinemia con galactorrea y el grupo de hiperprolactinemia con galactorrea, no se encontró diferencia significativa entre los dos grupos de hiperprolactinemia; ni tampoco entre el grupo de normoprolactinemia con galactorrea y el grupo de hiperprolactinemia sin galactorrea.

PROLACTINA

GRUPO	PM (KDa)	100 - 66	60 - 52	50 - 42	40 - 20	16 - 4
Normoeumenorrea con galactorrea		3.38±0.32	5.02±0.22	27.03±0.63	50.89±1.51	13.68±1.52
Hiperprolactinemia		5.88±0.60	7.12±0.32	10.68±0.46	63.61±0.85	12.7±1.29
Hiperprolactinemiaco galactorrea		6.23±0.58	4.46±0.43	55.4 ± 1.02	22.7 ± 0.77	11.6 ± 0.77
Testigo		7.72±0.53	11.3±0.32	5.1 ± 0.21	51.2 ± 1.2	24.08±0.73

TABLA 6. Porcentaje de inmunoreactividad de PRL de los cuatro grupos

FIGURA 20. Se representan en los histogramas de barras, el porcentaje de inmunoreactividad de PRL en los cuatro grupos



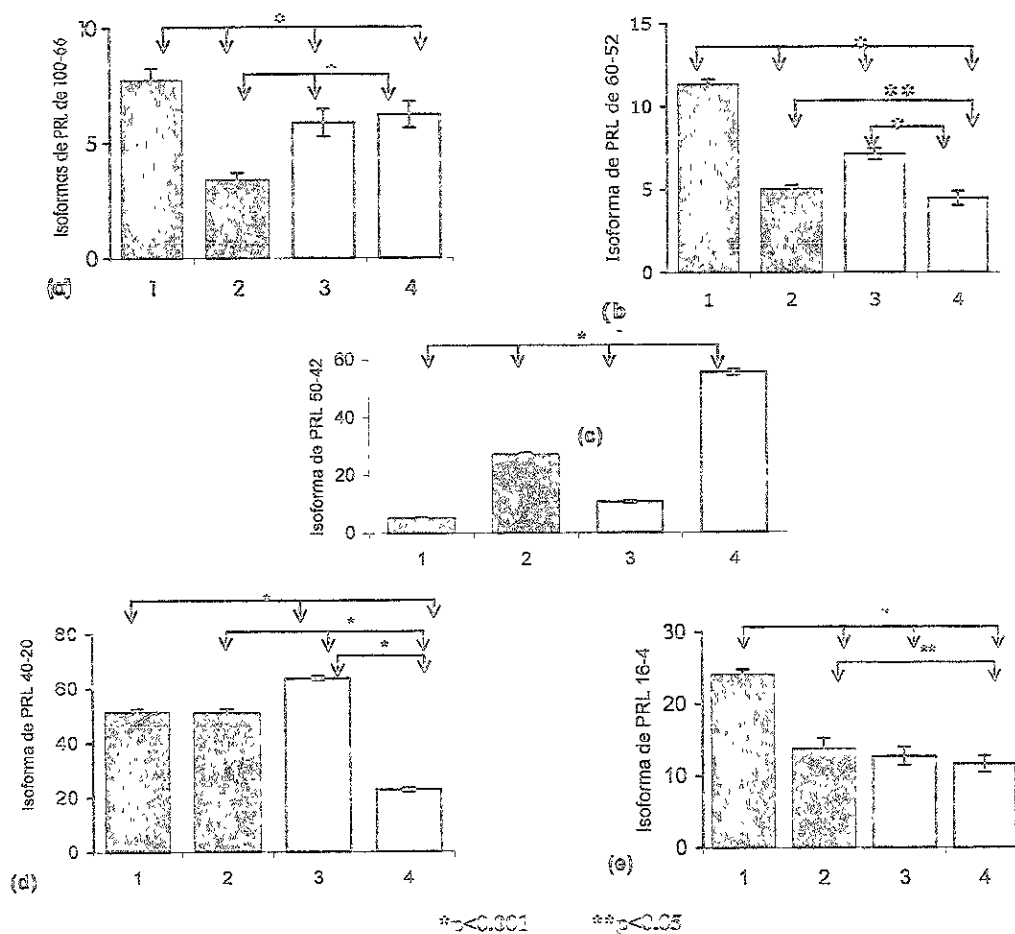


FIGURA 21. Representación de histogramas de las isoformas de PRL

Se muestra la media (\bar{x}) y la desviación estandar ($\pm SD$) de cada una de las isoformas encontradas para PRL. En la gráfica (a) se muestra la variante con un PM de 100 a 66KDa, (b) la variante de 60 a 52 KDa, (c) la variante de 50 a 42 KDa y (e) variante de 16 a 4 KDa

1. Grupo Testigo
2. Grupo Normoprolactinemia con galactorrea
3. Grupo Hiperprolactinemia sin galactorrea
4. Grupo Hiperprolactinemia con galactorrea

Formas Moleculares de la Hormona de Crecimiento

Los perfiles cromatográficos de GH en el suero de las ocho mujeres del grupo testigo, se presentan en la figura 22 estos perfiles se caracterizaron por presentar gran heterogeneidad molecular, la cual se manifiesta por varios picos de inmunoreactividad.

En la tabla 7 se presenta la clasificación de estas formas moleculares de GH en función de los pesos moleculares y Kav.

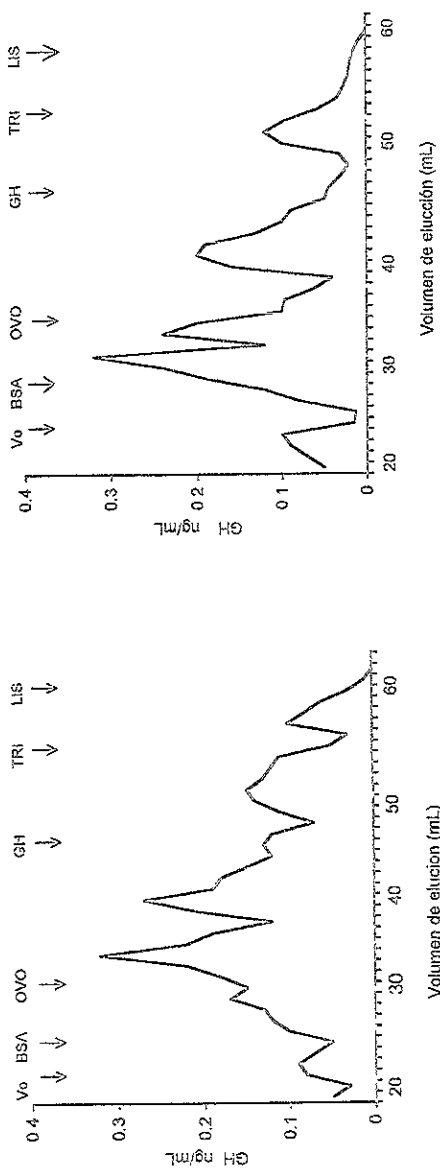
Las formas más predominante se encuentra la que se localizan en la zona correspondiente a los dímeros de GH que eluyen después de albúmina bovina (66 KDa) y la ovoalbúmina (45 KDa), mientras que en la zona de la GH monomérica que eluye con el estándar la proporción de fragmentos o productos de degradación de la hormona.

La tabla 8 nos muestra el porcentaje de inmunoreactividad de las formas moleculares de GH que se encontró en cada caso del grupo testigo.

Ve (mL)	20-34	35-40	41-50	51-60
PM (KDa)	100-66	60-45	40-20	16-6
Kav	0-0.145	0.16-0.35	0.37-0.56	0.58-0.79

TABLA 7. Caracterización de las isoformas de GH en el grupo testigo para obtener porcentaje de inmunoreactividad de las moléculas

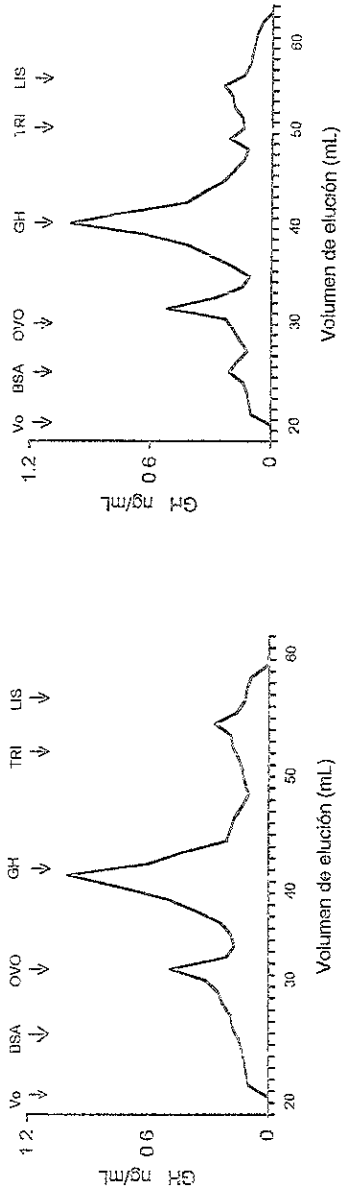
FIGURA 2.2. Formas moleculares de hormona de crecimiento en el grupo Testigo.



PACIENTE	PM (Kd)	100 - 66	60 - 45	40 - 20	16 - 66
1		30.2	34.8	25.6	9.4
2		30.4	36.3	23	10.3
3		26.8	37.7	24.4	10.3
4		27.1	39.6	23.7	9.3
5		32.5	31.3	24.5	10.1
6		28.4	35.2	25.2	10.5
7		25.9	37	26.2	10.5
8		23.4	37.5	28.9	10.6
$\bar{x} \pm DE$		28.1 \pm 2.89	36.17 \pm 2.5	25.1 \pm 1.8	10.1 \pm 0.5

FIGURA 3. Porcentaje de inmunoreactividad de hormona de crecimiento del grupo testigo

FIGURA 23. Formas moleculares de GI en el grupo de normoprotinéimica con galactorrea



PACIENTE	PM (Kd)	100 - 66	60 - 45	40 - 20	16 - 66
1		17.3	22.1	52.1	15.3
2		16.4	23.5	43.5	16.3
3		19.5	21.5	40.3	18.7
4		16.8	20.4	47.4	15.4
5		19.5	23.7	42.3	14.5
6		18.7	24.5	41.7	14.8
7		18.2	22.7	40.8	17.9
8		18.6	23.5	41	16.9
9		18.2	22	42	15.7
10		17.5	22.5	41.9	16.7

$\bar{X} \pm SD$ 18.07 \pm 1.06 22.8 \pm 1.34 43.3 \pm 3.6 16.2 \pm 1.35

Tabla 9. Porcentaje de inmunoreactividad de las formas moleculares de hormona de crecimiento en el grupo de normoimunenoreia con galactorrea

El comportamiento cromatográfico de la GH en el grupo de normoprolactinémicas con galactorrea se representa en la figura 23, en la que se observan un alta concentración que eluye con la GH marcada y que corresponde a la forma monomérica, en la fracción de 40 a 20 KDa y un segundo pico que eluye como el marcador de ovoalbúmina y que corresponde a la fracción de 60-45 KDa.

En la tabla 9 se muestra el porcentaje de inmunoreactividad de GH para las cuatro diferentes formas moleculares que se encontraron en el grupo de normoprolactinemia con galactorrea.

La tabla 10 muestra los valores del de la media (\bar{x}) y la desviación estándar (SD) del porcentaje de inmunoreactividad de GH para las cuatro formas moleculares encontradas en este estudio. En la figura 24 se muestran los histogramas con barras los parámetros moleculares de las variantes de GH, en el grupo testigo y el grupo de normoprolactinémicas con galactorrea,

La figura 25 representa una comparación de los porcentajes de inmunoreactividad de las cuatro formas moleculares de GH en el grupo testigo y el de normoprolactinemia con galactorrea en los histogramas a, b, c, d respectivamente, se le realizó a estos dos grupos la prueba de t-Student. Con esta prueba encontró que las cuatro formas moleculares tienen una diferencia significativa ($p < 0.001$) entre los dos grupos.

HORMONA DE CRECIMIENTO

GRUPO	PM (KDa)	100 - 66	60 - 45	40 - 20	16 - 6
Normoeumenorrea con galactorrea		18.07 ± 1.06	22.8 ± 1.34	43.3 ± 3.6	16.2 ± 1.35
Testigo		28.1 ± 2.8	36.17 ± 2.48	25.1 ± 1.6	10.1 ± 0.5

TABLA 10. Se representa el porcentaje de inmunoreactividad de GH en los dos grupos estudiados.

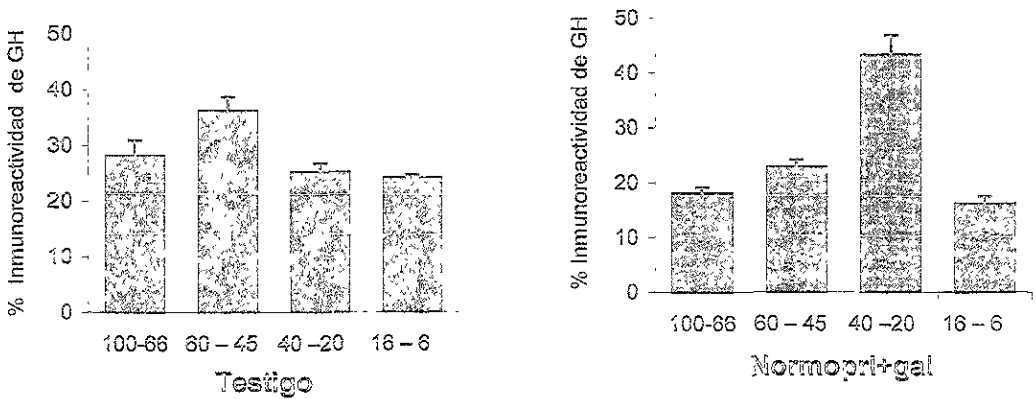
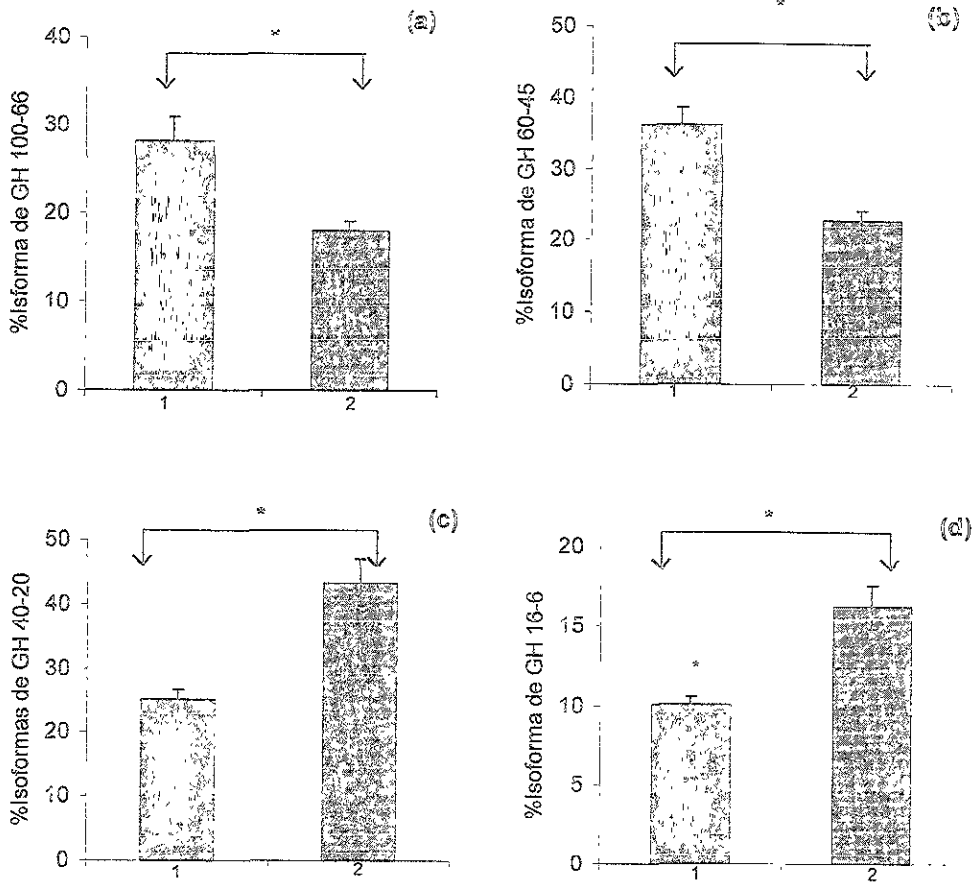


FIGURA 24. Se representa en esta gráfica en diagrama de barras el porcentaje de inmunoreactividad de GH contra las diferentes formas moleculares de cada grupo estudiado.



* $p < 0.01$

FIGURA 25. Histogramas de las isoformas de GH.

Se muestra la media (\bar{x}) y la desviación estándar ($\pm SD$) de cada una de las isoformas de GH de los dos grupos estudiados; (a) variante de un PM 100 a 66 KDa; (b) variante de PM de 60 a 45 KDa; (c) variante de 40 a 20 KDa y (d) variante de 16 a 6 KDa

1 Grupo Testigo

2 Grupo Normoprolactinemia con galactorrea

Estudio de Correlaciones

En la figura 26 se muestran algunas de las correlaciones entre el porcentaje de inmunoreactividad de las formas moleculares de PRL contra los niveles séricos de PRL, así como la concentración de estradiol, indicándose también el coeficiente de correlación (r) calculado por la ecuación de Pearson.

En la gráfica (a) se muestran la correlación entre el porcentaje de inmunoreactividad de la forma de 100 a 66 KDa con relación a concentración de PRL del grupo de normoprolactinemia con galactorrea encontrando una correlación negativa ($r = -0.85$).

En la gráfica (b) se muestra la correlación entre la forma molecular de 100 a 66 KDa y la concentración de PRL del grupo de hiperprolactinemia con galactorrea en donde por el contrario se encontró una correlación positiva ($r = 0.063$).

La gráfica (c) nos muestra la correlación positiva ($r = 0.42$) que hay entre las formas moleculares de 40 a 20 KDa (L-PRL) y la concentración de estradiol del grupo testigo y en la gráfica (d) muestra la correlación positiva ($r = 0.58$), entre la forma molecular 50 a 42 KDa y la concentración de estradiol en el grupo de normoprolactinemia con galactorrea.

La tabla 11 nos muestra en la parte superior los valores del coeficiente de correlación (r) entre los niveles de PRL y el porcentaje de inmunoreactividad de las formas moleculares encontradas para PRL. En la parte inferior se muestran la correlación de las formas moleculares de PRL y los niveles de estradiol de los diferentes grupos estudiados.

En la figura 27 se muestran algunas correlaciones entre el porcentaje de inmunoreactividad de las isoformas de GH y la concentración de GH y estradiol en los cuatro grupos estudiados.

En la gráfica (a) se muestra las formas moleculares de GH de 60 a 45 KDa de GH con la concentración de la hormona en el grupo testigo, ($r=0.16$).

En la gráfica (b) se tiene la correlación negativa ($r=-0.61$) de la isoforma de 40 a 20 kD de GH contra la concentración de estradiol en el grupo testigo.

La gráfica (c) muestra la correlación negativa ($r=-0.39$) observada entre la forma molecular de GH de 60 a 45 KDa y la concentración de GH; en la gráfica (d) se puede ver una correlación negativa ($r=-0.45$) entre la variante de 40 a 20 KDa y la concentración de estradiol.

La tabla 12 representa las correlaciones entre las formas moleculares de GH y las concentraciones séricas de GH y en la parte inferior las correlaciones entre las formas moleculares de GH y la concentración de estradiol.

TABLA 11. Correlación de Pearson entre el porcentaje de las formas moleculares de prolactina y el valor de los niveles séricos de PRL y estradiol.

PROLACTINA						
Grupo	PM (Kd)	100-66	60-52	50-42 (r)	40-20	16-4
Normoeumenorrea con galactorrea		-0.85	0.29	0.18	-0.35	0.53
Hiperprolactinemia		-0.35	-0.26	0.15	0.16	0.107
Hiperprolactinemia con galactorrea		0.63	0.23	0.43	-0.50	0.068
Testigo		0.16	0.069	0.06	0.63	0.58

ESTRADIOL						
Grupo	PM (kD)	100-66	60-52	50-42 (r)	40-20	16-4
Normoeumenorrea con galactorrea		-0.27	-0.33	0.58	-0.18	0.07
Hiperprolactinemia		0.44	0.15	-0.18-	0.04	-0.015
Hiperprolactinemia con galactorrea		-0.024	0.18	0.10	0.138	-0.20
Testigo		-0.27	0.02	-0.44	0.42	-0.51

FIGURA 26. Correlaciones de las formas moleculares para PRL, en relación a los niveles séricos de PRL y estradiol

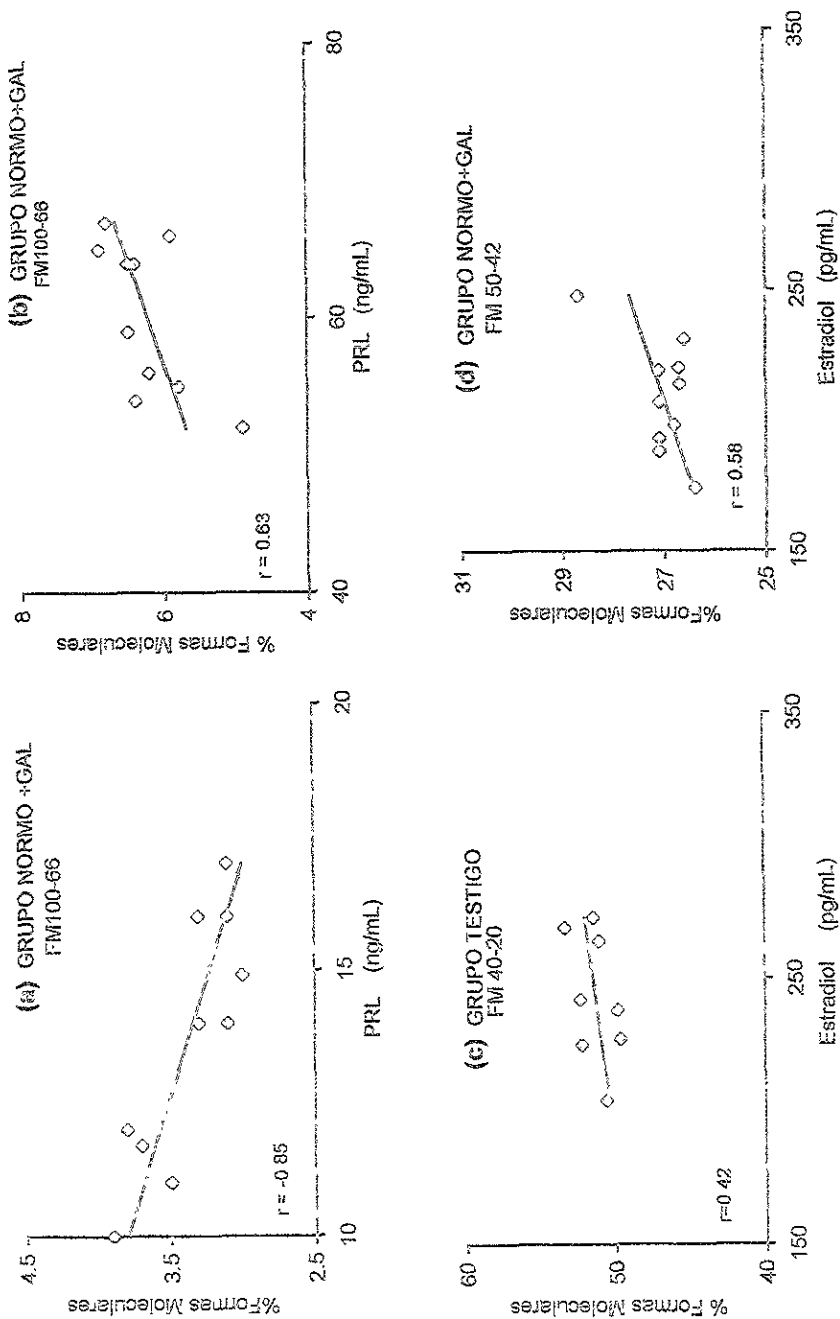
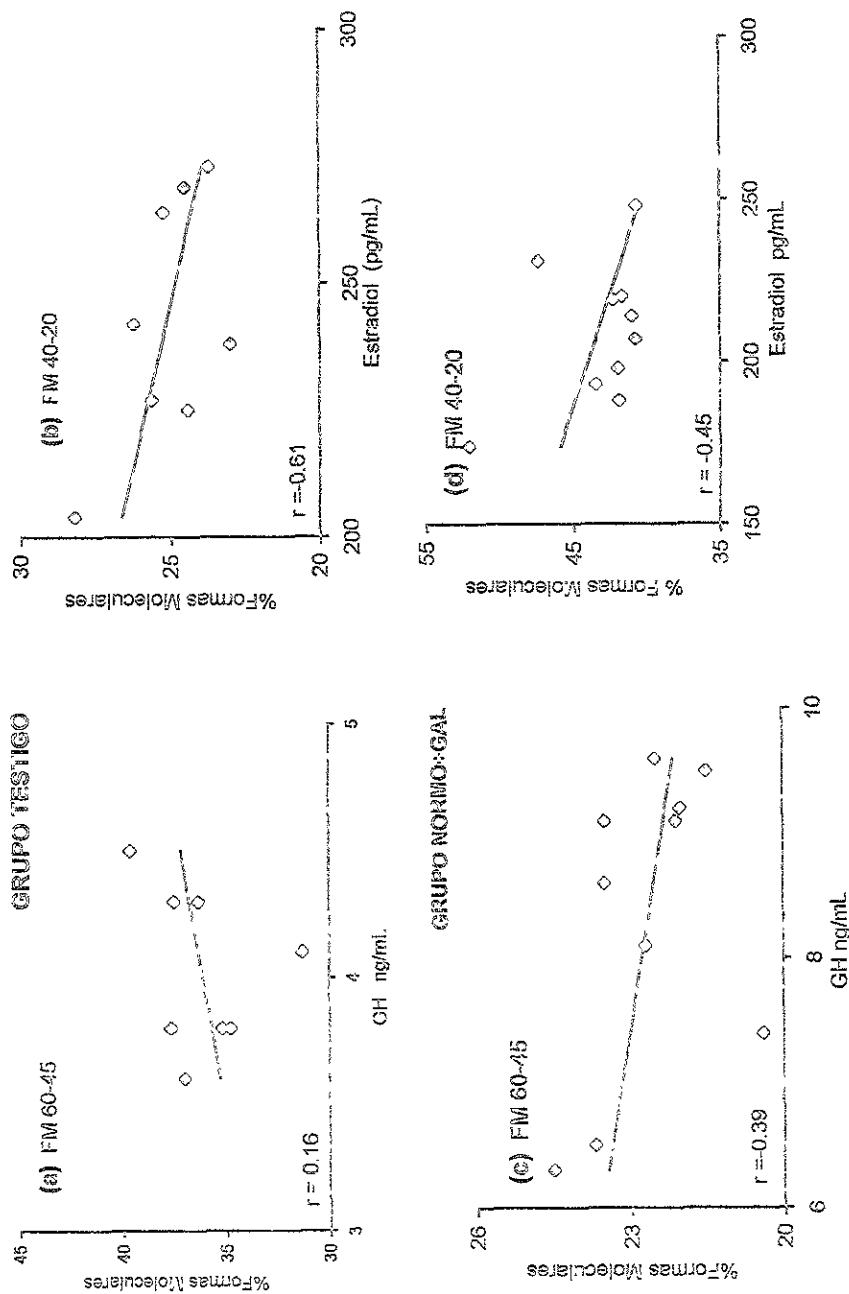


TABLA 12. Correlación entre el porcentaje de las formas moleculares de prolactina y la relación con los niveles séricos de GH y estradiol.

HORMONA DE CRECIMIENTO					
Grupo	PM (kD)	100-66	60-45	42-20	16-6
Normoprolactinemia con galactorrea		0.29	-0.39	-0.04	0.60
Testigo		0.018	0.16	-0.16	0.29

ESTRADIOL					
Grupo	PM (kD)	100-66	60-45	40-20	16-6
Normoprolactinémicas con galactorrea		-0.55	-0.2	-0.45	0.27
Testigo		-0.51	-0.24	-0.61	0.33

FIGURA 2%. Correlaciones de las formas moleculares de GH, en relación de a la concentración de GH y estradiol de los dos grupos estudiados



DISCUSION

El estudio hormonal realizado comprobó observaciones previas del efecto adverso de la hiperprolactinemia sobre la concentración de las gonadotropinas hipofisarias, y en consecuencia sobre la síntesis de estradiol que tuvo una correlación lineal negativa con la concentración de PRL, por lo que en las mujeres con hiperprolactinemia los niveles de estradiol fueron muy bajos, al igual que la concentración de la LH. Como se sabe, los estrógenos estimulan la síntesis de GH estimulando el factor de transcripción Pit-1 (112), a lo cual puede deberse que en los dos grupos con hiperprolactinemia y niveles bajos de estradiol la GH no se detectó. Por el contrario, en el grupo de pacientes eumenorreicas con normoprolactinemia y galactorrea, los niveles de GH se encontraron elevados con relación a su concentración en el grupo testigo.

Respecto al estudio de las formas moleculares de PRL y GH, los resultados obtenidos confirman que estas dos hormonas, al igual que otras de naturaleza proteica, circulan en varias formas moleculares que pueden ser modificadas cualitativa y cuantitativamente por el ambiente hormonal, en especial por la concentración de estradiol y de la misma PRL, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas. De acuerdo a los estudios de correlación realizados, las formas grandes de PRL 100-66 y 60-52 KDa son influenciadas negativamente por la concentración de estradiol, lo que explica porque estas dos formas moleculares tiene una menor proporción en las mujeres del grupo normoprolactinémica con galactorrea que en las mujeres hiperprolactinémicas. Por otra parte, cuando la PRL está elevada y tiene una mayor cantidad de la forma monomérica esto permite la formación de dímeros, agregados moleculares o la unión a proteínas circulantes originando isoformas de elevado peso molecular, como las observadas en este estudio.

La isoforma de 50-42 KDa de proporción muy baja en las mujeres del grupo testigo, se elevó notablemente en las mujeres con galactorrea, sobre todo en las hiperprolactinérmicas con galactorrea, indicando que la elevada concentración de PRL favorece la formación de este dímero; sin embargo llama la atención que su proporción no aumentó en igual magnitud en las mujeres hiperprolactinérmicas que no tuvieron galactorrea. En este grupo de mujeres, la hiperprolactinemia se relacionó con un marcado incremento de la forma monomérica, que fue la forma molecular predominante, mientras que en la hiperprolactinemia con galactorrea la proporción de la forma monomérica fue menor probablemente por la marcada circulación negativa que se observó entre la concentración de PRL y la forma 40-20 KDa en este grupo de mujeres. La diferencia en los perfiles cromatográficos de los dos grupos con hiperprolactinemia es difícil de explicar, sin embargo, los cambios en la proporción de formas moleculares y las características de los receptores en los diferentes tejidos, son sin duda factores que originan las diferencias en el cuadro clínico (113). En todos los grupos estudiados, la proporción de formas de bajo peso molecular, correspondiente a los fragmentos resultantes de la degradación de la hormona 15-6 KDa se encontró significativamente disminuida, debido probablemente que al aumentar la dimerización de PRL o la agregación molecular que determina el aumento de las formas grandes, disminuye la hidrólisis de la hormona y en consecuencia las isoformas de bajo peso molecular.

Este estudio mostró que en condiciones fisiológicas normales, predomina la forma monomérica de PRL que de acuerdo a los resultados de este estudio, el grupo testigo guarda una elevada correlación positiva entre los niveles séricos de PRL y estradiol de ahí que sea la variedad cuantitativamente más es la variedad cuantitativamente más importante en la circulación, y que en los casos de galactorrea ocurre un recambio en las formas moleculares

incrementándose el dímero de 50-42 KDa que eluye en la región de la ovoalbúmina (45 KDa) lo que puede deberse a los cambios en el ambiente hormonal, en especial la disminución de los estrógenos, lo que favorece el incremento de las formas grandes en el caso del grupo de hiperprolactinemia con galactorrea. En las normoprolactinémicas con galactorrea, aunque el dímero se encontró elevado, también predominó la forma monomérica, reconocida como la más activa de las variantes moleculares de PRL.

Diferentes estudios han mostrado que la estructura de la forma monomérica es la que interactúa con el receptor para determinar la acción biológica, presenta variantes moleculares que tienen diferente afinidad por la forma monomérica en diferentes tejidos, como la glándula mamaria, el ovario, el útero y el cerebro (114), por lo que en determinadas circunstancias podría determinar la aparición de galactorrea sin amenorrea, como ocurrió en las mujeres eumenorreicas que tuvieron galactorrea. Es probable que en algunos tejidos, cierta isoforma adquiera la propiedad de ser la forma activa de la hormona y desencadene un efecto biológico. No obstante que las diferentes isohormonas muestran cambios en su actividad biológica, todas presentan inmunoreactividad y reaccionan en forma similar frente a los anticuerpos policlonales utilizados en los inmunoensayos, explicando porque en algunas muestras biológicas se encuentra baja inmunoreactividad con elevada acción biológica, como ocurre en las mujeres normoprolactinémicas con galactorrea, o por el contrario, se tienen sueros con elevada inmunoreactividad y cifras elevadas de PRL en ausencia de datos clínicos (amenorrea o galactorrea) como ocurre cuando predominan en el suero las formas grandes, con pesos moleculares mayores de 66 KDa que tienen gran inmunoreactividad pero están desprovistas de acción biológica y que son incapaces de acoplarse a su receptor celular (115).

Las formas moleculares de GH, solo pudieron determinarse en el grupo testigo y en las mujeres eumenorreicas con galactorrea, ya que como se mencionó

anteriormente, en los dos grupos de mujeres hiperprolactinélicas la hormona se encontró en niveles no detectables. Los resultados del estudio cromatográfico mostraron que en las mujeres del grupo testigo predominaron las formas grandes, dímeros e isoformas de elevado peso molecular que resultan de la unión de la GH con diversas proteínas del suero, como son las proteínas transportadoras de la hormona (116) con solo un 25 % de la inmunoreactividad en la forma monomérica lo cual concuerda con la elevada correlación negativa observada entre la forma monomérica de GH y la concentración de estradiol en el grupo de mujeres normales; en contraste con los niveles de estradiol en las eumenorreicas con galactorrea predominó la forma monomérica. Recientes estudios han mostrado que la GH de primates incluyendo la GH humana, puede tener actividad lactogénica (117) uniéndose al sitio aceptor 1 del receptor de PRL al nivel de fenilalanina 44, interaccionando con leucina 157 y los residuos de tirosina 160 y 164 (118). Considerando, que en este grupo de mujeres eumenorreicas con galactorrea la concentración de PRL es normal y que por otra parte la concentración de GH está elevada con relación a su concentración en el grupo testigo y que además predomina la forma monomérica de GH; por lo que podría existir la posibilidad de la interacción de GH con los receptores de PRL para determinar el efecto biológico. Sin embargo, esta especulación aunque interesante, no puede ser probada con los datos del estudio. Es frecuente que en casos de hiperprolactinemia exista de manera colateral una concentración elevada de GH, ya que el mamotrofo puede sintetizar no-solo prolactina, sino también hormona de crecimiento, la relación que guarda la GH en relación al ambiente hormonal se encontró que la concentración de estradiol tiene una influencia sobre la forma molecular 40-20 KDa, que es la forma mas activa tanto en el grupo testigo en una forma directa, como en el grupo de normoprolactinemia de forma indirecta.

Puede decirse que aunque los receptores celulares de PRL y GH son diferentes, existen evidencias de que en determinadas circunstancias y dependiendo de sus características estructurales, los pueden compartir ambas hormonas. Así algunas manifestaciones clínicas se podrían explicar con base en la estructura molecular de las diferentes isoformas.

Las hormonas de naturaleza proteica son secretadas y circulan como diferentes isoformas de actividad biológica variable, y que la proporción de estas puede estar determinada, tanto por condiciones en el ámbito de la célula adenohipofisaria donde se produce la prolactina, como por la acción de diversas hormonas que constituyen el medio interno o ambiente hormonal característico. En este aspecto resalta la observación de la marcada relación entre la concentración de prolactina y los niveles circulantes de estradiol, lo cual ha sido observado ampliamente en diversos estudios clínicos (119). Por otra parte, como se comprobó en los estudios de correlación realizados, la concentración de estradiol modifica la proporción de las formas moleculares de PRL y de GH, predominando en condiciones fisiológicas la forma monomérica, mientras que las formas grandes aumentan en los estados de hipoestrogenismo en el caso de la PRL. De acuerdo con estos resultados, se sabe que las formas moleculares de PRL se modifican en las diferentes etapas del ciclo ovárico en mujeres menstruando y ovulando (120); así mismo se observan cambios en los niveles de PRL y de las isoformas en estados de hipoestrogenismo como es la menopausia (121) y la administración de estrógenos revierte las alteraciones observadas en mujeres menopausicas (122). También durante la gestación en la que aumenta notablemente la concentración de estrógenos se presentan variaciones fisiológicas de la proporción de formas moleculares de PRL y los cambios se manifiestan y persisten durante la lactancia. Se ha mencionado que las alteraciones metabólicas pueden ejercer cierto efecto sobre la proporción de isoformas de las hormonas proteicas como PRL y GH (123). Por otra parte se

confirma el concepto generalmente aceptado, de que es el receptor celular en los diferentes tejidos, el que finalmente determina el efecto biológico de la hormona, por su capacidad de reconocer la forma activa.

No debe olvidarse que los métodos analíticos bioquímicos como los utilizados en este estudio, se basan en el reconocimiento de partes específicas de la estructura de las hormonas y en sus características fisicoquímicas y no miden actividad biológica por lo que los resultados del laboratorio no siempre se correlacionan con los datos clínicos, por lo que sería necesario trabajar las diferentes formas moleculares de PRL y GH con receptores de la glándula mamaria para comprobar su actividad biológica.

CONCLUSIONES

1. El ambiente hormonal tiene un efecto directo sobre la síntesis de las formas moleculares de PRL y GH.
2. En mujeres normales predomina la forma molecular monomérica (40 a 20 KDa) de PRL y las formas diméricas (50-45kD) de GH.
3. En mujeres con normoprolactinemia con galactorrea hay predominio de la forma monomérica (40-20 KDa) pero se elevó la proporción de la forma dimérica (50-42 KDa) de PRL, y en el caso de GH disminuyeron las formas grandes y predominó la forma monomérica (40-20 KDa) y la dímérica (60-45 Da).
4. En contraste, en las mujeres con hiperprolactinemia predominó la forma monomérica (40-20 KDa) de PRL.
5. En mujeres con hiperprolactinemia con galactorrea la forma molecular predominante es la forma dimérica (50-42 KDa).
6. La forma monomérica se encontró diferente entre los grupos con hiperprolactinemia, mientras que en los grupos con PRL normal es muy parecida dicha proporción en cada uno de los grupos estudiados, siendo esta la forma más activa biológicamente.
7. En mujeres que presentan galactorrea, con niveles normales de PRL la alteración puede estar causada por un aumento de la forma molecular monomérica de GH; por la similitud estructural con PRL y GH, podría ocupar los receptores de PRL en la glándula mamaria y desencadenar la galactorrea.

REFERENCIAS

1. Bateman A, Singh A, Kral T. The immune-hypothalamic-pituitary axis. *Endocr Rev.* 1989; 10:92-111.
2. Robel P, Baulieu EE. Neurosteroids. Biosynthesis and function. *Trends Endocrinol Metab.* 1994; 5:1-7.
3. Brann, D.W, Mahesh, VB. Excitatory amino acid neurotransmission. Evidence for a role in neuroendocrine regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 1992; 3:122-126.
4. Jones E, Seifer D, Naftolin F. Effects of hypothalamic- pituitary aging. *Sem. Reprod. Endocrinol.* 1991; 9:221.
5. Asa SL, Kovacs K, Lazslo FA. Human fetal adenohypophysis. Histologic and immunocytochemical analysis. *Neuroendocrinology.* 1986; 43:308-315.
6. Ikeda H, Susuki J, Samano N. The development and morphogenesis of the pituitary gland. *Anat. Embryol.* 1988; 178:327-336.
7. Asa SL, Kovacks K. Fuctional morphology of the human fetal pituitary. *Pathol Annu.* 1984; 19:275-315.
8. Fowler MR, McKell DW. Human adenohypophyseal quantitative histochemical cell classification. *Arch Pathol Lab Med.* 1979; 103:613-621.
9. Brann DW, Mahesh VB. Excitatory amino acids: Evidence for a role in the control of reproduction and anterior pituitary hormone secretion. *Endocr Rev.* 1997; 18: 678-683.
10. Roth J, LeRoith D, Shiloach J. The evolutionary origins of hormones, neurotransmitters, and other extracellular chemical messengers. *N Engl J Med.* 1982; 306:523-527.
11. Ulrich A, Shine J, Chirgwin J. Rat insulin genes: construction of plasmides containing the coding sequences. *Science* 1977; 196: 1313-1319.

12. Gilbert W. DNA sequencing and gene structure. *Science*. 1981; 214:1205-1210.
13. Rogers J, Wall R. A mechanics for RNA splicing. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1980; 77:1877-1879.
14. Long EO, Dawid IB. Repeated genes in eucaryotes. *Annu Rev Biochem*. 1980; 49: 727-764
15. Walter P, Blobel F. Signal recognition particle contains a 7S RNA essential for protein translocation across the endoplasmic reticulum. *Nature* 1982; 299:691-698.
16. Meyer DJ, Krause E, Dobbertein B. Secretory protein translocation across membranes: the role of the "docking protein". *Nature*. 1982; 297:647-650.
17. Emr SD, Hall MM, Silhavy, TJ. A mechanism of protein localization: The signal hypothesis and bacteria. *J Cell Biol*. 1980; 86:701-711.
18. Lingappa VR. Intracellular aspect of the process of protein synthesis. *Science* 1975; 189: 347-358.
19. Bruce D, Weltraub. Diverse mechanisms for regulation of hormone synthesis and action: Relationship to endocrine diseases and the human genome project. *Molecular Endocrinology: Basic concepts and clinical correlations*. Raven Press.Ltd. New York 1995.
20. Hudbar SC, Ivatt RT. Synthesis and processing of asparagine-linked oligosaccharides. *Annu Rev Biochem*. 1981; 50:555-583.
21. Palade G. Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science*. 1975; 189: 347-358.
22. Dover G. Molecular drive: a cohesive mode of species evolution. *Nature* 1982. 299:111-117.
23. Rosenfel MG, Mermod JJ, Amara SG. Production of a novel neuropeptide encoded, by the calcitonin gene via tissue-specific RNA processing. *Nature*. 1983; 304:129-135.

24. Noda M, Teranishi Y, Takahashi T. Isolation and structural organization of the human preproenkephalin gene. *Nature*. 1982; 297; 423-427.
25. Mellon PL, Clegg CH, Corell LAS, Mcknight GS. Regulation of transcription by AMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1989; 86:4887-4891.
26. Lin A, Frost J, Deng T. Protein-kinase 11 is a negative regulator of c-jun DNA binding and AP-1 activity. *Cell* 1992; 70:777-789.
27. Hoeffler JP, Meyer TE, Yun Y. Cyclic AMP-responsive DNA-binding protein: structure based on a cloned placental cDNA. *Science*. 1988; 242:1430-1432.
28. Jackson SM, Keesch CA, Williamson DJ, Gutierrez-Hartmann A. Interaction of basal positive and negative transcription elements controls repression of the proximal rat prolactin promoter in nonpituitary cells. *Mol Cell Biol*. 1992; 35:519-529.
29. Chen RP, Ingraham HA, Treacy MN. Autoregulation of Pit-1 gene expression mediated by two cis-active promoter elements. 1990; 346:583-586.
30. Pfaffle RW, DiMattia GE, Parks JS. Mutation of the POU-specific domain of Pit-1 and hypopituitarism without pituitary hypoplasia. *Science*. 1992; 257: 1118-1121.
31. Steinfeldt HJ, Radovick S, Wondisfor FE. Hormonal regulation in the hormonal thyrotropin β subunit gene by phosphorylation of the pituitary-specific transcription factor Pit-1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 257:5942-5945.
32. Radovick S, Nations M, Yuefen Du. A mutation in the POU-homeodomain of Pit-1 responsible for combined pituitary hormone deficiency. *Science*. 1992; 257:1111-1118.
33. Murdoch GH, Potter E, Nicolaisen AK. Epidermal growth rapidly stimulates prolactin gene transcription. *Nature* 1982; 300:192-194.

34. Nall HD, Hogan ML, Tregar GW. The chemistry of growth hormone and the lactogenic hormone. *Recent Prog Horm Res* 1974; 387:325-329.
35. Miller W, Eberhardt NL. Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev.*1983; 4:97-130.
36. Nall HD, Hogan ML, Sauer R. Sequences of pituitary and placental lactogenic and growth hormones: Evolution from a primordial peptide by gene reduplication. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1971; 68:866-870.
37. Pastan I, Roth J, Macchia V. Binding of hormone to tissue: the first step in polypeptide hormone action. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996; 56:1802-1809.
38. Cunningham BC, Ultsch M, de VosAM, Mulkerrin MG. Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by single hormone molecule. *Science.* 1991; 254:821-825.
39. Goujon L, Allevalo G, Simonin G, Edery M, Kelly PA. Cytoplasmic domains of the growth hormone receptor necessary for signal transduction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; 91:957-961
40. Lloyd RV, Anagnostou D, Cano M. Analysis of mammosomatotropic cells in normal and neoplastic human pituitary tissues by the reverse hemolytic plaque assay and immunocytochemistry. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 66:1103-1108.
41. Truong AT, Duez C, Belayew A. Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO J.* 1984; 3:429-437
42. Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE. The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science.* 1981; 212:815-816.
43. Cooke NE, Colt D, Shine J. Human prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem.* 1981; 256: 4007-4012.
44. Nicol CS, Mayer GL, Russell. Structural features of prolactin and growth hormone that can be related to their biological properties. 1986; 7:169-203.

45. Bauman G. Metabolism of growth hormone heterogeneity genes isohormones, variants and binding proteins. *Endocr Rev.* 1991; 12:424-446.
46. Suh H, Frantz AG. Size heterogeneity of human prolactin in plasma and fluid extracts. *J Clin Endocrinol Metab* 1974; 39:928-935
47. Jordan RM, Tresp MN, Kohler PO. Human prolactin heterogeneity in pituitary effluent blood. *Horm Metabol Res.* 17; 1985:698-701.
48. Farkouh NH, Packer MG, Frantz AG. Large molecular PRL with reduced receptor activity in human serum: High proportion in basal state and reduced after TRH. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979; 48:1026-1031
49. Lewis UJ; Singh RN, Sinha YN. Glycosylated human prolactin. *Endocrinology.* 1985; 116:359-363
50. Casabiell X, Robertson MC, Friesen HG. Cleaved prolactin and its a 16k fragment are generated by an acid protease. *Endocrinology.* 1989; 125:1967-1972.
51. Clapp C, Martial JA, Guzman RC. The 16 kilodalton N- terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology.* 1993; 132:1292-1298.
52. Clapp C, Sears PS, Nicoli CS. Binding studies with intact prolactin and 16K fragment of the hormone. *Endocrinology.* 1989; 125:1054-1059
53. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev.* 1995; 16: 354-369.
54. Lui DW, Ben-Jonathan N. Prolactin-releasing activity of neurohypophysial hormones: structure-function relationship. *Endocrinology.* 1994; 134:114-118.
55. Sandoval C, Fonseca ME, Ochoa R. Trascendencia de la prolactina y su relación con la respuesta inmune. *Ginec Obstet.* 1997; 65:148-151.

56. Leblanc H, Lachelin GC, Abu-Fadil S, Yen SS. Effects of dopamine infusion on pituitary hormone secretion in human. *J Clin Endocrinol Metab.* 1976; 43:668-673.
57. Porter TE, Grandy D, Bunzow J. Evidence that stimulatory dopamine receptors may be involved in the regulation of prolactin secretion. *Endocrinology.* 1994; 134:1263-1270
58. Jacobs LS, Snyder PJ, Wilbur JF. Increased serum prolactin after administration of TRH in man *J Clin Endocrinol Metab.* 1971; 33:996-1001
59. Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD. Autocrine control of secretion by vasoactive peptide. *Endocrinology.* 1988; 122; 364-366.
60. Aguilera G, Hyde CL, Catt KJ. Angiotensin II receptors and prolactin release in pituitary lactotrophs. *Endocrinology.* 1982; 11:1045- 1052.
61. Nowakowski BE, Maurer RA. Multiple Pit-1-binding sites facilitate estrogen responsiveness of the prolactin gene. *Mol Endocrinol.* 1994 8:1742-1749.
62. Ingraham HA, Chen R, Mangalam HJ, Simmons DM. A tissue-specific transcription factor containing a homeodomain specifies a pituitary phenotype. *Cell.* 1988; 55:519-529
63. Markoff E, Lee DW, Holligsworth DR. Glycosylated and nonglycosylated prolactin in serum during pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab.* 1988; 67:519-523.
64. Vakeman M, Delvoye P, L'Hermite M, Robyn C. Serum prolactin levels during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab.* 1977; 44:989-995.
65. Leighton PC, McNeilly AS, Chard T. Short-term variation in blood levels of prolactin in woman. *J Endocrinol.* 1976; 68:117-124
66. Van Cauter E, L'Hermite M, Copinschi G. Quantitative analysis of spontaneous of plasma prolactin in normal man. *Am J Physiol.* 1981; 241:355-363.

67. Desir D, Van Cauter E, L'Hermite M. Effects of "jet lag" on hormonal patterns. Demonstration of an intrinsic circadian rhythmicity in plasma prolactin. *Endocrinol Metab.* 1982; 55:849-857.
68. Schachter BS, Durgerian S, Hartan RE, Pfaff DW. Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. *Endocrinology.* 1984; 114: 1947-1949
69. Jin L, Quian X, Kulig E. Prolactin receptor messenger ribonucleic in normal neoplastic human pituitary tissues. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997; 82:963-967.
70. Nagano M, Chastre E, Choquet A. Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol.* 1995; 268:431-437.
71. Nevalainen MT, Valve EM, Ingleton PM. Prolactin and prolactin receptors are expressed and functioning in human prostate. *J Clin Invest.* 1997; 99:396-399.
72. Klibanski A, Neer R, Beitins J. Decreased bone density in hiperprolactinemic women. *N Engl J Med.* 1981; 303: 1511-1515
73. Maaskant RA, Bogic LV, Gilger S. The human prolactin receptor in the fetal membranes, decidua and placenta. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; 81:396-399.
74. Mulchahey JJ, Jaffe RB. Detection of a potential progenitor cell in human fetal pituitary that secretes both growth hormone and prolactin. *J Clin Endocrin Metab.* 1988; 66:24-2
75. Hiestand PC, Mekier P, Nordmand R. Prolactin as a modulator of lymphocytes responsiveness provides a possible mechanism for cyclosporine. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1983; 83:2599-2603.
76. Clevenger CV, Chang WP, Ngo W. Expression of prolactin and prolactin receptor in human breast carcinoma. Evidence for an autocrine/paracrine loop. *Am J Pathol.* 1995; 146:695-699.

77. Das R, Vonderhaar BK. Transduction of prolactin's (PRL) signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Mol Endocrinol.* 1995; 9:1750-1754.
78. Rao YP, Olson MD, Buckley DJ, Buckley AR. Nuclear colonization of prolactin and the prolactin receptor in rat Nb2 node lymphoma cells. *Endocrinology.* 1993; 133:3062-3065.
79. Gouilleux F, Wakao H, Mundt M. Prolactin induces phosphorylation of tyr694 of Stat5 a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *EMBO J* 1994; 13:4361.
80. Topper YJ, Freeman CS. Multiple hormone interaction in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol Rev.* 1980; 60:1049-1063.
81. Adashi EY, Resnick CE. Prolactin as an inhibitor of granulosa cell luteinization: implications for hyperprolactinemia-associated luteal phase dysfunction. *Fertil Steril.* 1987; 48: 131-139.
82. Milenkovic L, D'Angelo G, Kelly PA. Inhibition of gonadotropin hormone-releasing hormone release by prolactin from GT1 neuronal cell lines through prolactin receptors. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91:1244-1247.
83. Boyar RM, Kapen S, Finkelstein JW. Hypothalamic-pituitary function in diverse hyperprolactinemic states. *J Clin Invest.* 1974; 53: 1588-1592.
84. Quigley ME, Judd SJ, Gilliland GB, Yen SSC. Effects of a dopamine antagonist on the release of gonadotropin and prolactin normal women and women with hyperprolactinemic anovulation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1979; 48:718-720.
85. Moran C, Garcia E, Fonseca ME. Bromocriptina en los padecimientos de mama. Análisis de la secreción de prolactina en mujeres con galactorrea sin hiperprolactinemia. *Rev Latin Amer Esteril Fertil.* 1990; 4:26-29.

86. Tambascia MD, Bahamondes L, Pinotti J. Hyperprolactinemia in a normally menstruating women with apparently normal ovarian function. *Fertil Steril*. 1980; 34:282-284.
87. Perryman RL, Thoner MO. The effects of hiperprolactinemia on sexual and reproductive funtion in man. *J Androl*. 1981; 123:233-242.
88. Pelletier G, Robert F, Hardy J. Identification of human anterior pituitary cell by immunoelectron microscopy. *J Clin Endocrinol Metab*. 1978; 46:534-542.
89. Owerbach D, Rutter WJ, Martial JA. Genes for growth hormone, chorionic somatomammotropin and growth hormone-like gene on chromosome 17 in human. *Science* 1980; 209:289-292
90. Moore DD, Walker MD, Diamond DJ. Structure, expression, and evolution of growth hormone genes. *Recent Horm Res*. 1982; 38:197-225.
91. Stolar MW, Baumann G. Growth hormone form in human plasma immunochemical evidence for their pituitary origen. *Metabolism*. 1986; 35:75-77
92. Cooke ME, Watson MA. Human growth hormone gene and highly homologous growth hormone variant gene display diferent patterns. *J Clin Invest*. 1988; 82:270-275.
93. Baumann G. Growth hormone heterogeneity: Genes, isohormones, variants and binding proteins. *Endocrine Reviews*. 1991; 12:424- 446.
94. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*. 1987; 330:537-543.
95. Frankenne F, Rentier DF, Scippo ML. Expression of the growth hormone variant gene in human placenta. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987; 64: 635-637.

96. Faria AC, Veldhuis JD, Thorner MO. Half-time of endogenous growth hormone (GH) disappearance in normal man after stimulation of GH secretion by growth hormone releasing hormone (GHRH) and suppression with somatostatin. *J Clin Invest* 1972; 51:3193-3199.
97. Patye YC. Growth hormone stimulates hypothalamic somatostatin. *Life Sci*. 1979; 24: 1589-1592.
98. Parker MG. Steroid and related receptors. *Curr Opin Cell Biol*. 1993. 5:499-504.
99. Daughaday WH, Rotwein P. Insulin Like growth factor I and II: Peptide, messenger ribonucleic acid and gene structures, serum and tissue concentration. *Endocr Rev*. 1989; 10:68-79.
100. Schoenie E, Zads J, Humble RE. Insulin like growth factor I stimulates growth in hypophysectomized rats. *Nature*. 1982; 296:252-253.
101. Golstein J, Cauter EV, Desir D. Effects of "jet lag" on hormonal patterns. Time shifts increase growth hormone release. *J Clin Endocrinol Metab*. 1983; 56:433-437.
102. Finkelstein JW, Roffward HP, Boyar RM. Age-related change in the twenty-four-hour spontaneous secretion of growth hormone. *J Clin Endocrinol Metab*. 1972; 35:665-668.
103. Miller JD, Tannenbaumgs GS, Colle E. Daytime pulsatile growth hormone secretion during childhood and adolescence. *J Clin Endocrinol*. 1982; 55 989-993.
104. Isaksson OG, Ede, S, Jansson JO. Mode of action of pituitary growth hormone on target cell. *Annu Rev Physiol*. 1985; 47:483-499.
105. Salem M. Effects of the amino terminal portion of human growth hormone on glucose clearance and metabolism in normal, diabetic, hypophysectomized, normal and diabetic rat. *Endocrinology*. 1988. 123:1565-1576.

106. Leung DW, Spencer SA, Cachianes G. Growth hormone receptor and serum binding protein: purification, cloning and expression. *Nature*. 1988; 330: 537-543.
107. Kelly PA, Goujon L, Sotiropoulos A, Dinerstein H. The GH receptor and signal transduction. *Horm Res*. 1994; 42:133-139.
108. Finidori J, Kelly PA. Cytokine receptor signalling through two novel families of transducer molecules: Janus kinases, and signal transducers and activators of transcription. *J Endocrinol*. 1995; 147:11-23.
109. Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H. Cloning and expression of the prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell* 1998; 53:69-77.
110. Zarate A, Moran C, Miranda R. Long acting bromocriptine for the acute treatment of large prolactinomas. *J Endocrinol Invest*. 1987; 10: 233-236.
111. Muichahey JJ, Jaffe RB. Detection of potential progenitor cell in the human fetal pituitary that secretes both growth hormone and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988; 66:24-28.
112. Davis S, Latchman DS. Transcription-factor mutations and disease. *New England J Medicine*. 1996; 334:28-33.
113. Romero O, León J, Jara R, Gonzalez O. Importancia de las isoformas de prolactina sobre la función ovarica en mujeres hiperprolactinemicas. *Rev Chil Obstet Ginecol*. 1993; 58(6):465-469.
114. Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. *J Biol Chem*. 1994; 269:13337-13345
115. Soong YK, Fergusson KM, McGarrick G, J effcoate SL. Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in hiperprolactinemia serum. *Oxford: Clin Endocrinol*. 1982; 16: 259-265.

116. Daughaday WH, Rotwei P, Insulin-like growth factor I and II: peptides, messenger ribonucleic acid gene structures, serum and tissue concentration. *Endocr Rev.* 1989; 10:68-81
117. Forsyth IA. Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function. *J Dairy Sci.* 1986; 69:886-890.
118. Francis C. Peterson and Charles L. Brooks: Identification of a motif associated with the lactogenic actions of human growth hormone. *J Biol Chemistry.* 1997; 272:21444-21448.
119. Fonseca ME, Ochoa R, Moran C. Diferentes formas moleculares de la prolactina circulante en mujeres normales. *Rev latin amer esteril fertil.* 1990; 4:6-10.
120. Hernández M. Fonseca ME, Ochoa R. Efectos metabólicos en la postmenopausia de un esteroide sintético (tibolona) con acción estrogenica característica. *Ginec Obst Mex.* 1997; 65: 504-507.
121. Fonseca ME, Cruz ML, Loustaunau E. Estrogen replacement therapy increases prolactin levels in postmenopausal Women. *Menopause.* 1997; 4:201-205.
122. Fonseca ME, Ochoa R, Gaivan RE. Increase of growth hormone and insulin-like growth factor-1 levels coinciding with a decrement of insulin concentrations in postmenopausal women treated with estrogens. *Menopause.* 1999;10:435-439.
123. Larrea F, Escorza A, Valero. Heterogeneity of serum prolactin throughout the menstrual cycle and pregnancy in hyperprolactinemic women with normal ovarian function. *J Clin Endocrinol Metab.* 1989; 68:519-522.