



11281  
8  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

**INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA**  
*CAMPUS UNAM-UAQ, JURIQUILLA, QRO.*

**"INVESTIGACIONES SOBRE MECANISMOS  
AUTOCRINOS Y/O PARACRINOS EN LA  
SECRECION DE PROLACTINA (PRL) POR LA  
ADENOHIPOFISIS (AH) DE RATAS MACHOS Y  
HEMBRAS".**

**Tesis**  
**QUE PARA OBTENER EL GRADO  
DE DOCTOR EN CIENCIAS  
BIOMEDICAS  
(NEUROBIOLOGIA)**

**P R E S E N T A :**  
**M. en C. NESTOR FABIAN DIAZ MARTINEZ**

**DIRECTOR DEL PROYECTO : DR. FLAVIO MENA JARA**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

2003



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

**TESIS  
CON  
FALLA DE  
ORIGEN**

... General de Bibliotecas ...  
... en formato electrónico e impres. el  
... de mi trabajo excepcional.  
Diciembre  
Nestor Fabian  
31 Junio /03

**Este trabajo se realizó en el Departamento de Neurobiología Molecular y Celular del Instituto de Neurobiología, Campus UNAM, Juriquilla, Querétaro, bajo la dirección del Dr. Flavio Mena Jara.**

**Este trabajo fue apoyado por el programa de Becas para estudios de posgrado en la UNAM de la Dirección General de Estudios de Posgrado.**

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **AGRADECIMIENTOS:**

Al Dr. Flavio Mena Jara, por haberme iniciado el camino de la Investigación y por haberme aceptado en su laboratorio.

A mi comité Tutorial: Dr. Carlos Aramburo de la Hoz y Dr. Enrique Pedemera Astegiano por sus valiosas sugerencias a lo largo del proyecto de investigación.

Al jurado por sus útiles comentarios y correcciones: Dr. Arturo Hernández Cruz, Dra. Marcia Hiriart Urdanivia, Dra. Gabriela Morali de la Brena, Dr. Raúl Paredes Guerrero, Dr. Carlos Valverde Rodríguez; además del Dr. Flavio Mena Jara y Dr. Enrique Pedemera Astegiano. A ellos mi reconocimiento y gratitud.

A la M. en C. Nilda Navarro Padilla por su excelente asistencia técnica durante todo el trabajo experimental.

A la Dra. María Teresa Morales por su ayuda incondicional y sobretodo su amistad.

A la M. en C. Icnelia Huerta y al Dr. Neptalí Marina por su participación directa en el presente trabajo.

Al M.V.Z. Martín García y a su equipo de trabajo del bioterio.

A la Lic. Lourdes Lara por su ayuda en la organización de videoconferencias.

A la Lic. Pilar Galarza y a todo el personal de la biblioteca del Instituto de Neurobiología: Rafael Silva, Elsa Ruiz e Isabel Cuellar.

A la Q. en A. Leonor Casanova Rico y María del Carmen Vázquez Rodríguez por su valiosa ayuda en los trámites escolares.

Finalmente a mi Institución, la UNAM, por las grandes oportunidades que me ha brindado.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

# INDICE

<b>I. RESUMEN</b>	4
<b>II. SUMMARY</b>	6
<b>III. INTRODUCCION</b>	7
<b>IV. ASPECTOS COMPARATIVOS DE LA PROLACTINA</b>	9
a. Acciones y efectos fisiológicos de la hormona.	9
b. Secreción de la prolactina durante las fases del ciclo reproductor de la rata.	15
<b>V. ASPECTOS BIOQUIMICO-MOLECULARES Y DE BIOLOGIA CELULAR DE LA PROLACTINA .</b>	21
a. Gene y estructura química.	21
b. Estructuras intracelulares que participan en la secreción de prolactina.	23
c. Heterogeneidad molecular.	31
d. Mecanismos asociados a la transformación de prolactina	35
e. Receptores de prolactina	37
f. Activación del receptor a prolactina y transducción de señales	38
g. Prolactina extrahipofisiaria	41
<b>VI. REGULACION Y CONTROL DE LA SECRECION DE PROLACTINA.</b>	43
a. Control hipotalámico.	43
b. Importancia fisiológica de las neurohormonas implicadas en el control de la prolactina.	45
c. Influencia del lóbulo posterior de la hipófisis.	46
d. Regulación parácrina y autócrina.	48
e. Heterogeneidad regional de la secreción de prolactina	50
<b>VII. ANTECEDENTES ESPECIFICOS</b>	56
<b>VIII. HIPOTESIS</b>	59
<b>IX. OBJETIVOS</b>	59

<b>X. MATERIAL Y METODOS</b>	<b>60</b>
<b>XI. RESULTADOS</b>	<b>66</b>
<b>XII. DISCUSION</b>	<b>91</b>
<b>XIII. CONCLUSIONES</b>	<b>101</b>
<b>XIV. BIBLIOGRAFIA</b>	<b>103</b>

## **I. RESUMEN**

La secreción de prolactina (PRL) por la adenohipófisis (AH) de la rata es un fenómeno neuroendocrino complejo el cual es regulado tanto por hormonas hipotalámicas y periféricas, así como por factores autócrinos y/o parácrinos que son producidos localmente. Por otra parte, se ha descrito la existencia de una heterogeneidad anatómica y funcional dentro de la AH de ratas lactantes, la cual consiste en una diferencia en el tamaño, capacidad secretora y responsividad a los diversos secretagogos entre los lactotrofos de la región central (la cual se encuentra rodeando al lóbulo posterior y neurointermedio de la hipófisis) y lateral (resto de la glándula) de la AH. Se ha sugerido que el lóbulo posterior y el neurointermedio participan en este fenómeno de regionalización de la secreción de PRL, a través de los vasos cortos hipotalámicos.

El primer objetivo de este estudio fue determinar si existen mecanismos dentro de la región central y lateral de la AH, capaces de influenciar la secreción de PRL de dichas regiones y si el tipo de efecto ejercido varía de acuerdo a la condición fisiológica del animal (ratas lactantes no succionadas, succionadas y ratas macho). Para esto, se empleó el medio condicionado (MC) obtenido de la incubación individual de cada región de la AH de ratas lactantes no succionadas por 6h, ratas succionadas por 15 min. al término de las 6h de separación, o de ratas macho. Se determinó el efecto del MC sobre la liberación de PRL por parte de las regiones de la AH de ratas en la misma o en diferente condición fisiológica. La PRL liberada al medio fue cuantificada mediante electroforesis en condiciones nativas y densitometría. En general, los resultados obtenidos en AH de ratas lactantes muestran que el MC es capaz de estimular o de inhibir la liberación de PRL, dependiendo de la condición fisiológica y de la región de la AH del animal donador y receptor del medio. Sin embargo, vale la pena señalar que el MC proveniente de ratas macho no provocó efecto alguno sobre la liberación de PRL de ratas lactantes y macho. En cambio, el medio proveniente de ratas lactantes estimuló significativamente la secreción de PRL por parte de la AH de ratas macho. En comparación con los animales control, incubados en medio de Earle, no se observó ningún cambio en la cantidad de PRL presente en el tejido de AHS incubadas en el MC.

De esta manera, el segundo objetivo de este trabajo fue analizar si la PRL liberada por la AH de ratas macho en respuesta al MC de ratas lactantes, es secretada a través de una vía similar o distinta a la descrita en ratas lactantes, i.e., regulada. Así mismo, se investigó si el MC sobre la AH de la rata macho inducía un efecto sobre la síntesis y no solo sobre la liberación de la PRL. Así, se observó que el incremento en la concentración de PRL liberada al medio de incubación por ambas regiones de la AH de ratas macho, no se modificó por la adición al medio de cicloheximida, un inhibidor de la síntesis proteica. Por otra parte, se llevó a cabo la marca de la hormona a diferentes tiempos, tanto en condiciones *in vivo*, como *in vitro*, de ratas macho mediante el empleo de leucina tritiada y se incubaron las AHS en el medio condicionado de ratas lactantes. Los resultados muestran que las PRLs de diferentes edades marcadas tanto *in vivo*, como *in vitro*, fueron secretadas con una proporción y dinámicas similares, durante toda la incubación pero diferente a la descrita en las ratas lactantes. Por otra parte, el efecto estimulador del MC de ratas

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



lactantes del mismo sobre la secreción de PRL total no estuvo, correlacionado con la secreción de la PRL marcada *in vivo* o *in vitro*.

En conjunto, estos resultados sugieren que el MC de ratas lactantes incrementa la liberación de PRL por parte de la AH de ratas macho a través de una vía diferente a la descrita en ratas lactantes (regulada), tal vez por una vía constitutiva o de tipo semi-constitutiva que no participa la síntesis *de novo* de proteína.

TESIS CON  
FALLA DE ORDEN

## II. SUMMARY

Prolactin (PRL) secretion by the rat anterior pituitary gland (AP) is a complex neuroendocrine mechanism regulated by hypothalamic and systemic hormones, as well as by locally produced autocrine and paracrine factors. On the other hand, an anatomical and functional heterogeneity has been previously described in the lactating rat AP, consisting in different size, secretory capacity and secretagogue sensibility among lactotopes from the central AP, i.e., the region surrounding the posterior and neurointermediate lobes, and the peripheral region (rest of the gland). The regionalization phenomenon in PRL secretion is presumably regulated by the posterior and neurointermediate lobes of the gland through the hypothalamic short vessels system.

The first objective of the present study was to determine the existence of mechanisms within the AP's central and peripheral regions, capable of influencing PRL secretion by the same regions, and whether the effect exerted depends upon the physiological condition of the animal, i.e., suckled and non-suckled lactating and male rats. To this end, we employed conditioned media (CM) obtained from the individual incubation of each AP region from 6h non-suckled lactating rats, 15 min. suckled rats after 6h of separation, or male rats. The effect of CM upon AP PRL release was determined in rats in the same or in different physiological condition. The PRL concentration was quantified with native conditions electrophoresis and densitometry. The results show that depending on both, the physiological condition and the AP region of the donor and the receptor animals, the CM is capable of stimulating or inhibiting PRL secretion by the AP regions of lactating rats. However, it is worth mentioning that the CM from male rats' APs had no effect upon PRL secretion by lactating and male rats' APs. Conversely, the CM from the lateral region of lactating rats significantly increased PRL secretion by male rats' APs. As compared to control animals incubated in Earle's medium, no change whatsoever was observed in the amount of tissue PRL of APs incubated in the CM.

Therefore, the second objective of the present study was to analyze whether PRL liberated by male rats' APs in response to lactating rats' CM is released through a pathway similar or different to that observed in the lactating rat, i.e., regulated. Thus, we observed that the increased PRL concentration released into the incubation medium by both male AP regions was not modified when the protein synthesis inhibitor, cycloheximide was added to the medium. Finally, the hormone from male rats was labeled by *in vivo* and *in vitro* using tritiated leucine and the AP fragments were later incubated with CM from lactating rats. The results show that both  $^3\text{H}$ -PRLs were secreted with similar proportion and dynamics during the whole period of incubation. However, little or no correlation was observed between the increase release of total, i.e., unlabelled PRL and that *in vivo* or *in vitro* labeled hormone.

Taken together, these results suggest that the CM from lactating rats increases PRL release by male rats' APs through a pathway different to that described in lactating rats (regulated), i.e., constitutive or constitutive-like, that does not involve new synthesis of protein

### **III. INTRODUCCION**

En la naturaleza existe una estrecha relación entre los factores ambientales y los seres vivos. En los vertebrados esta relación se encuentra regulada por el Sistema Neuroinmunoendócrino (SNE) el cual comprende cuatro tipos celulares que elaboran y secretan una heterogénea familia de mensajeros intercelulares o quimiotransmisores. Los cuatro tipos celulares del SNE encargados de la comunicación intercelular son : a) células nerviosas o neuronas que participan por el Sistema Nervioso Central en la recepción, transmisión e integración de mensajes, b) células neuroendócrinas, que además de las características de las células neurales, tienen propiedades de células endócrinas y convierten el impulso neural en una respuesta endócrina, c) células endócrinas, que sintetizan y secretan hormonas, las cuales ejercen sus efectos en los diferentes órganos y d) células del sistema inmune, que establecen la comunicación intercelular por medio de moléculas solubles (citocinas) que secretan hacia la circulación sanguínea. En general, los mecanismos neuroinmunoendócrinos desempeñan un papel fundamental en la regulación de las funciones corporales reproductoras, metabólicas, conductuales e inmunes. Las estructuras que llevan a cabo estas funciones son entre otras, el hipotálamo, la hipófisis, las glándulas suprarrenales, etc. (Berczi et al 1998, Reichlin 1998)

La principal glándula endócrina que regula dichas funciones y que se halla en íntima relación con el hipotálamo es la glándula hipofisiaria o hipófisis. Utilizando diferentes métodos citoquímicos, se han distinguido las células que sintetizan y secretan las diferentes hormonas hipofisiarias, las

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

cuales de acuerdo a sus relaciones estructurales y la semejanza en su actividad biológica se agrupan en 4 familias que son: a) las hormonas neurohipofisarias (oxitocina y vasopresina), b) las corticotropinas polipeptídicas o familias de la proopiomelanocorticotropina (hormona adrenocorticotrópica, melanotropina, lipotropinas y endorfinas), c) la familia de las somatomamotropinas (hormona del crecimiento (GH) y prolactina (PRL)) y d) las glicoproteínas (hormona estimulante del tiroides (TSH), hormona foliculo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH)). En general, estas hormonas y en particular la prolactina, poseen la característica de una gran versatilidad de efectos en diferentes especies y grupos de vertebrados (Norwan y Litwack 1997, Thorner et al 1998).

El objetivo de este trabajo es el de determinar si en la adenohipófisis (AH) de la rata se producen y secretan factores estimuladores e inhibidores de la secreción de PRL que tanto por su localización regional en la glándula, como por la condición fisiológica del animal, ejercen efectos reguladores de diverso tipo sobre la secreción de la hormona.

#### **IV. ASPECTOS COMPARATIVOS DE LA PROLACTINA**

##### ***a) Acciones y efectos fisiológicos de la hormona***

La PRL es una hormona de una gran versatilidad fisiológica ya que se le han descrito más de 300 funciones biológicas, las cuales exceden el total de las acciones de todas las hormonas hipofisiarias. Los efectos conocidos se han clasificado en 6 grupos, los cuales se han caracterizado en diversos grupos de vertebrados (ver tabla 1) (Nicoll et al 1980, Bole-Feysot et al 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Tabla 1. Acciones y efectos fisiológicos de la PRL. (Bern y Nicoll 1968, Nicoll 1974, Bern 1975, Matera 1996, Bole-Feysot et al 1998, Corbacho et al 2002).

Grupo de los vertebrados	Efectos sobre el control del balance hidroelectrolítico	Acciones relacionadas con la reproducción	Efectos sobre crecimiento y desarrollo	Efectos metabólicos y endocrinológicos	Efectos conductuales	Efectos sobre el sistema inmunológico
Telcósteos	Branquias: ↓ flujo y permeabilidad de Na <sup>+</sup> y Cl <sup>-</sup> ↓ actividad Na <sup>+</sup> K <sup>+</sup> -ATPasa Riñón: ↓ excreción de Na <sup>+</sup> . ↑ filtración y tamaño glomerular Vejiga: ↓ absorción de H <sub>2</sub> O Intestino: ↓ absorción de H <sub>2</sub> O y Piel: ↑ Número y tamaño de células productoras de moco	Vesículas seminales: ↑ crecimiento y secreción	Cola dorsal: reabsorción Piel: Proliferación de melanocitos Riñón: crecimiento del epitelio tubular	↑ acumulación de lípidos Estimulación tiroidea.	Proporciona agua fresca a los huevos Construcción del nido Migración Comportamiento paternal	Melanogénesis

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN

TESIS CUL  
 FALLA DE ORIGEN

Anfibios	Branquias: ↑ absorción iónica Riñón: ↑ volumen extracelular Vejiga: ↑ transporte de $H_2O$ y $Na^+$ Piel: Intercambio de electrolitos	↑ secreción de la gelatina del oviducto	Branquias: ↑ crecimiento (larvas) Cola: ↑ crecimiento y longitud (larvas) Evita la pérdida de la cola (premetamorfosis) Patas: ↓ crecimiento (premetamorfosis) Retina: Metamorfosis de pigmentos visuales	Induce hiperglicemia o diabetogénesis Induce acumulación lipídica.	Migración de las larvas hacia el ambiente acuático
Reptiles	Acción sinérgica con corticoesteroides en la restauración de la composición normal del plasma.	Cola: regeneración Epidermis: Muda Hígado: Inducción de genes relacionados al crecimiento	Induce reducción del depósito lipídico Induce hiperfagia Acción antigonadotró-pica		
Aves	Riñón: ↑ urato en el plasma ↑ flujo urinario	↑ producción de la leche del buche	Cuerpo: ↑ peso Plumas: crecimiento y muda	Induce hiperglicemia o diabetogénesis.	Migración Construcción y mantenimiento del nido Incubación Regurgitación

Aves	Glándula nasal: ↑ secreción	Incrementa el efecto de LH al disminuir el estradiol Supresión de la fase reproductiva del ciclo sexual Desarrollo de tracto reproductivo femenino	Piel: hiperplasia epidermal en la placa de incubación Intestino: ↑ mucosa Gónadas: ↓ peso	Induce acumulación lipídica.	Alimentación Hiperfagia Comportamiento paternal	
Mamíferos	Riñón: ↑ actividad $\text{Na}^+\text{K}^+$ -ATPasa ↓ excreción de $\text{Na}^+$ y $\text{K}^+$ Glándulas sudoríparas: ↓ $\text{Na}^+$ y $\text{Cl}^-$ en el sudor Intestino: ↑ absorción de sales y $\text{H}_2\text{O}$ Glándula mamaria: ↑ excreción de $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ y $\text{H}_2\text{O}$ .	Glándula mamaria: crecimiento lóbulo-alveolar ↑ síntesis de leche Células de la granulosa: ↓ producción de estrógenos ↑ producción de progesterona ↑ receptores de LH	Cuerpo: ↑ peso Piel: proliferación de melanocitos y queratinocitos Pulmón fetal: maduración producción de factor surfactante Hígado: producción de hepatocitos inducción de genes y factores de crecimiento hipometilación del DNA	Induce acumulación lipídica (higado, adipocitos) Incremento de colesterol en testículos. Induce hiperglicemia o diabetogénesis (higado, páncreas) Induce el metabolismo esteroideo (glándulas suprarrenales)	Comportamiento maternal Aseo Respuesta adaptativa al estrés Induce analgesia Reacción psicósomática (pseudocembarazo) ↓ libido ↑ sueño REM Ciclo vigilia-sueño ↑ lordosis Maduración del sistema neuroendócrino	Bazo y timo: ↑ crecimiento Linfocitos: ↑ inmunidad hormonal y celular ↑ proliferación ↑ IgG e IgM Células Nb2: ↑ proliferación ↓ apoptosis Celulas NK: mantenimiento de la función basal

TESIS CON  
 FALTA DE ORIGEN



TESIS CCY  
FACULTAD DE CIENCIAS  
MÉDICAS

---

Mamíferos	Placenta: ↓ volumen de fluidos en el amnios	Utero: ↑ receptores a progesterona y estrógenos ↑ actividad secretora del endometrio Implantación del blastocito Células de Leydig: Mantenimiento de la morfología celular Espermatozoides y epididimo: energía Acciones luteotrópicas y luteotróficas	Intestino: a ↑ mucosa y Músculo: proliferación de vasos del Páncreas: proliferación de células β Gónadas: de ↑ peso Próstata y vesículas seminales: ↑ crecimiento Cerebro: proliferación de astrocitos Acciones anti- angiogénicas: Estimulación de la apoptosis de las células endoteliales	Macrófagos: ↑ activación ↑ protección contra infección bacterial Estimulación de la eritropoyesis
-----------	---	---	---	---

---

---

Mamíferos

Inhibición de la proliferación de cel. endoteliales, de la degradación de la matriz extracelular, de la formación de tubos de tipo capilar y de la neovascularización de la córnea.

---

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

***b) Secreción de la prolactina durante las fases del ciclo reproductor de la rata***

**Ciclo estral.** Las concentraciones de PRL circulante varían durante los distintos estados reproductivos de la rata. Durante el ciclo estral, la secreción de PRL es baja y sin cambios desde la noche del estro hasta la mañana del proestro (Butcher et al 1974); sin embargo durante la tarde del proestro, un pico preovulatorio de la hormona ocurre, el cual se sincroniza con concentraciones altas de otras hormonas como la LH, la progesterona y la FSH (Smith et al 1975). El aumento en la secreción de estas hormonas es precedido y estimulado por una elevación en los niveles de estrógenos (fig. 1). Estudios previos han mostrado que el área preóptica media del hipotálamo participa en la liberación de PRL inducida por estrógenos, ya que las lesiones de este núcleo bloquean el pico de secreción de PRL (Pan y Gala, 1985a), mientras que la administración directa de estrógenos, la facilita (Pan y Gala, 1985b). De igual forma, se ha demostrado que la administración de un antisuero de estradiol provoca un bloqueo en la secreción de PRL durante la tarde del proestro (Neill 1980). Por otra parte, el control que ejerce el hipotálamo en esta fase, no es del todo comprendido, ya que se han reportado datos contradictorios de la participación de la dopamina en la regulación de la PRL durante el proestro (revisión en Freeman et al 2000).

**Embarazo.** El estímulo de la cópula desencadena un patrón de secreción de la PRL la cual no es secretada de manera constante, sino produciendo dos elevaciones diarias. Si las ratas son expuestas a ciclos de 12 horas luz – 12 horas oscuridad, se ha observado que después de la cópula hay un pico diurno de secreción de la hormona, el cual comienza a las 13:00-15:00

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

horas, alcanzando sus valores máximos en la tarde (17:00-18:00 horas) y retornando a su nivel basal durante la media noche. El otro pico, denominado nocturno, inicia a la 1:00 horas, teniendo sus valores máximos de las 3:00-7:00 horas y regresando a su nivel basal a las 11:00 horas. Este patrón se observa durante 10 días si el apareamiento es fértil y resulta en embarazo (Butcher et al 1972, Freeman et al 1974); o persiste por 12 días si la fecundación fue estéril (Freeman y Neill 1972). Después del décimo día, este perfil desaparece, debido a que el lactógeno placentario (PL) ejerce una retroalimentación negativa a nivel hipotalámico e hipofisiario (Tankowicz et al 1983, Tankowicz y Voogt 1983), induce un aumento en la actividad de neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (Lee y Voogt 1999) y provoca un incremento en la secreción de progesterona (Neill 1980, Voogt et al 2001). De esta forma, los niveles séricos de la hormona son bajos y no se elevan de manera significativa sino hasta dos días antes del parto. Por otra parte, se considera que el aumento en la liberación de PRL hipofisiaria que ocurre al final del embarazo, se debe a la inversión en los niveles circulantes de estrógenos y de progesterona (Neill 1980).

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

En la rata la estimulación cervical provoca dos elevaciones diarias en los niveles de PRL, de igual forma que las observadas durante la gestación (fig. 2). Sin embargo, a diferencia del

embarazo, los picos de secreción terminan después de 13 días, debido a una disminución en la secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo, acoplada con un incremento de estradiol por los folículos en desarrollo (Gorospe y Freeman 1981). Se ha propuesto que el núcleo supraquiasmático es el responsable de mantener este patrón cíclico de secreción de la hormona, lo cual sugiere que la información está bajo el control de un ritmo circadiano endógeno (revisión en Freeman et al 2000).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

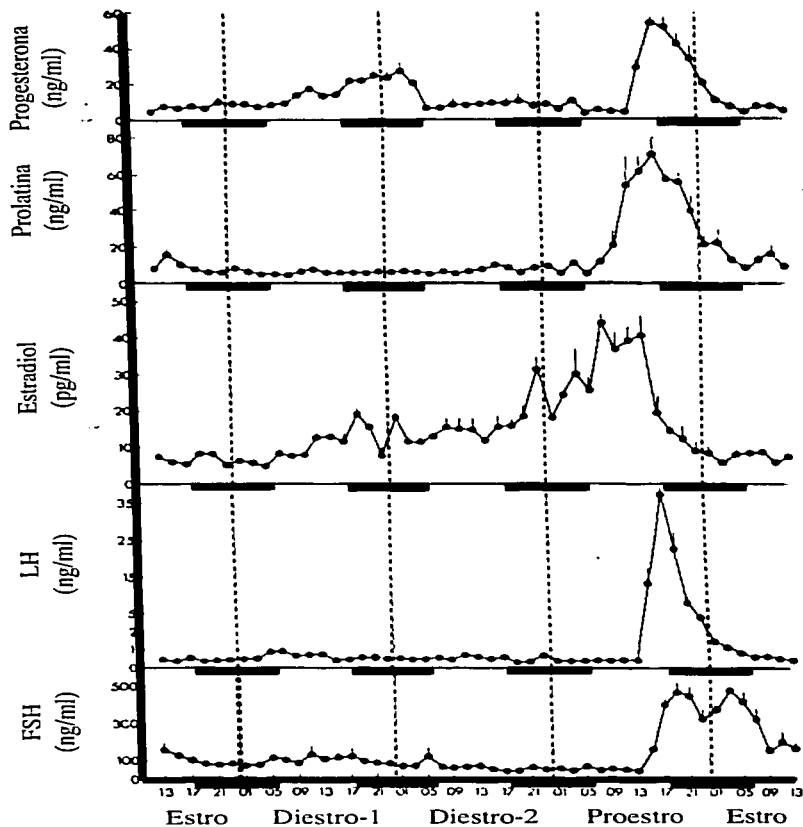


Fig. 1. Niveles plasmáticos de progesterona, prolactina, estradiol, hormona luteinizante (LH) y hormona foliculo estimulante (FSH) determinados en ratas durante los días del ciclo estrol, cada punto en la gráfica representa el promedio  $\pm$  error estandar. Las líneas punteadas horizontales indican la medianoche (24:00 hrs), las barras negras en el eje de las ordenadas señalan el periodo de obscuridad, de un ciclo de 12 horas luz-obscuridad y los números debajo del eje de las ordenadas representan el tiempo en termino de 24 horas. (Tomada de Neill 1980).

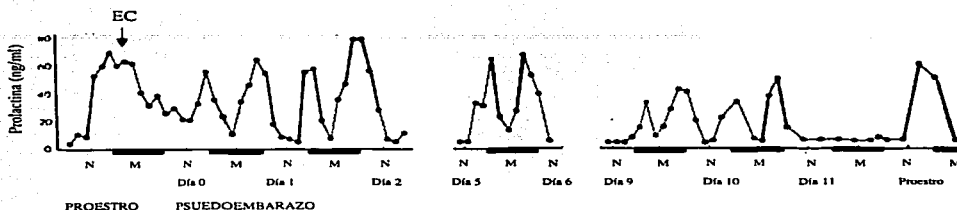


Fig. 2. Concentración de PRL en el suero de ratas pseudoembarazadas. Las barras negras en el eje de las ordenadas señalan el periodo de obscuridad, de un ciclo de 12 horas luz-obscuridad. EC = estimulación cervical, n = mediodía (12:00 hrs) y m = medioanoch. (Tomada de Neill 1980).

**Lactancia.** Es un mecanismo neuroendócrino complejo que constituye la fase final del ciclo reproductor de los mamíferos. En la rata, la secreción de PRL durante la lactancia depende del estímulo de la succión por parte de las crías y de la estimulación exteroceptiva, la cual comienza a desarrollarse a mediados de la lactancia y se incrementa hacia el final de la misma. Como resultado de tal regulación, la hormona no es secretada de manera tónica como ocurre en ausencia de esos estímulos, sino fásica en respuesta a la estimulación (Grosvenor y Mena 1982). Así, en ausencia de dicha estimulación, los niveles circulantes de la hormona son bajos. Por otra parte, cuando las crías son separadas de sus madres durante varias horas, el reinicio de la succión es seguido de una liberación rápida de PRL hacia la circulación (Grosvenor et al 1967).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

El efecto de la succión sobre la secreción de PRL en la rata consiste en una disminución inicial rápida (1 a 2 minutos) y extensa (15 a 60  $\mu\text{g}$ ) de la hormona contenida en la AH. Después de ser depletada, la PRL adenohipofisiaria se reacumula lentamente, es decir, se repleta, hasta alcanzar los niveles que tenía antes de la succión. El grado de depleción<sup>1</sup> está relacionado directamente tanto con el número de animales en la camada como con la duración del intervalo previo de no succión (Grosvenor y Mena 1971). Las concentraciones máximas de PRL en la circulación (500- 600 ng/ml) se alcanzan entre los 10 a 20 minutos de haberse iniciado la succión.

Se considera que la lactancia llega a su fin debido en parte a que las crías succionan a su madre con menor frecuencia a medida que éstas van creciendo. De esta manera, la intensidad de la succión disminuye considerablemente y por ende la secreción de la hormona; además se ha observado que la tasa de disminución de los niveles sanguíneos de PRL es proporcional a la tasa de depuración metabólica de la hormona (Grosvenor et al 1979).

---

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



## V. ASPECTOS BIOQUÍMICO-MOLECULARES Y DE BIOLOGÍA CELULAR DE LA SECRECIÓN DE LA PROLACTINA

### *a) Gene y estructura química*

El gene que codifica para la PRL es único y se encuentra en todos los vertebrados. En humanos se localiza en el cromosoma 6 (Owerbach et al 1981), mientras que en la rata se encuentra en el cromosoma 17. Está compuesto de 5 exones y 4 intrones con una longitud de 10 kb (Truong et al 1984). Después de remover el péptido señal (28 aa) (Cooke et al 1981) se da lugar a la forma madura de la hormona.

La PRL es una hormona proteica que está formada por una cadena polipeptídica de aproximadamente 200 aminoácidos según la especie y un peso molecular de 23000 daltones. La forma nativa de la PRL contiene 6 residuos de cisteína, los cuales se unen entre sí formando 3 enlaces disulfuro (-S-S-) y 3 asas de aminoácidos: 2 asas menores en los extremos amino y carboxilo y un asa mayor intermedia. En la PRL de la rata los enlaces se encuentran en los residuos 4 y 9 formando el asa amino terminal, en los aminoácidos 56 y 172 en el enlace central y en los aminoácidos 189 y 197 en el asa carboxilo terminal. De esta manera, las 2 asas pequeñas amino y carboxilo terminal están formadas de 4 y 7 residuos de aminoácidos respectivamente y el asa mayor de 115 aminoácidos (fig. 3) (Shome y Parlow 1977).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Fig. 3 Representación esquemática de la secuencia lineal de aminoácidos (mostrados en los círculos) que conforman a la PRL de 23 kDa. Las líneas horizontales ilustran los tres puentes disulfuro presentes en la hormona, los círculos negros representan los aminoácidos conservados en las especies de rata, ratón, cerdo, bovino y humano (tomada de Neill y Nagy 1994).

## ***b) Estructuras intracelulares que participan en la secreción de prolactina***

### **Biosíntesis de la prolactina**

La síntesis de la PRL inicia con la transcripción del gen de PRL en RNAm, que es procesado dentro del núcleo del lactotrofo para formar un RNA maduro que es transportado hacia el citoplasma (número 1 en fig. 4). Posteriormente, el RNA se une a los ribosomas, en donde se traduce una secuencia de pre-prolactina, que es descargada hacia el lumen del retículo endoplásmico rugoso (RER) (Neill y Nagy 1994). El proceso de translocación hacia el RER inicia cuando esta secuencia señal es reconocida por una partícula reconocedora de la señal (SRP por sus siglas en inglés), que a su vez se une al ribosoma, dirigiéndolos hacia la superficie citosólica del RER (Zheng y Nicchitta 1999).

En el lumen del RER, la PRL se dobla, se oligomeriza, se forman los puentes disulfuro y se glucosila (número 2 en fig. 4) (Pellegrini et al 1990). La glucosilación indica el grado de doblez de la PRL. De esta forma, solamente las proteínas bien conformadas pueden salir del RER (Alberts et al 2002a). Una vez que es doblada y ensamblada en el RER, la PRL es empaquetada en vesículas de transporte (COPII) que se desprenden de la membrana del RER, para formar un agrupado de vesículas tubulares que se desplazan a través de los microtúbulos hacia el Complejo de Golgi (CG) (número 3 en fig. 4) (Weissman et al 2001, Beznoussenko y Mironov 2002).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

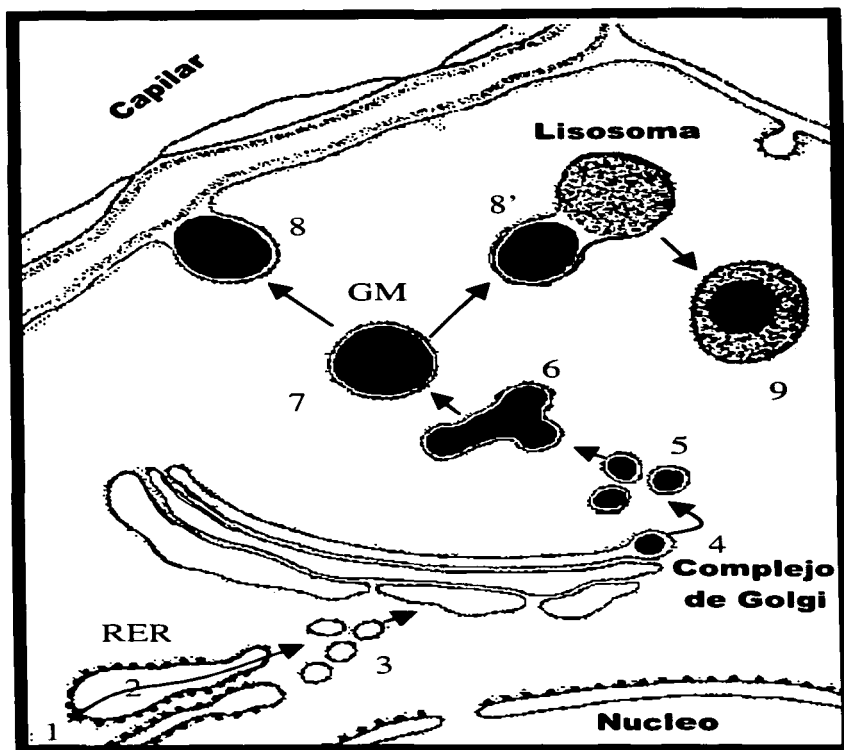


Fig 4. Representación esquemática del procesamiento intracelular de la PRL. La hormona comienza a ser sintetizada en los polirribosomas (1) de donde pasa al retículo endoplásmico rugoso (RER) (2), de aquí es transportada hacia el complejo de Golgi (CG) mediante vesículas (3) las cuales se desprenden del RER. En el CG la hormona es concentrada y empaquetada en el lado trans del CG (4). Del CG salen los gránulos inmaduros (5) los cuales se van agregando (6) hasta formar un gránulo maduro (GM) (7). Durante la secreción activa los GM se fusionan con la membrana celular (8) y son descargados mediante exocitosis. Cuando la secreción se detiene y existe un exceso de hormona, los GM se fusionan con los lisosomas (8') y de esta forma son degradados (9) (tomada de Farquhar 1985).

### **El tráfico a través del CG**

El CG es un organelo de forma sacular que se localiza cerca del núcleo. Posee un lado de entrada (*cis*) y uno de salida (*trans*), que están conectados por una serie de compartimientos, formados por redes tubulares y estructuras en forma de cisternas. Se ha observado que estas redes son importantes para la clasificación de las proteínas, ya que aquellas que entran por el lado *cis* pueden pasar por el CG o regresar al RER, mientras que las que entran por el lado *trans* se pueden dirigir hacia los lisosomas o hacia la superficie celular (ver revisión en Farquhar y Palade 1998). Los agregados de PRL son transportados a través del CG mediante un proceso llamado progresión o maduración cisternal, en el que las vesículas y los túbulos pre-golgi se fusionan para formar la cisterna *cis* del CG y de esta forma, todo el compartimiento progresa a través de las cisternas (Dannies 2001). Posteriormente, la PRL se concentra en el lado *trans* de la cisterna (Rambourg et al 1992). Se ha observado que la agregación de PRL es facilitada por diversos factores que interactúan con sitios de baja afinidad en los lactotopos, i.e., la concentración de PRL en el CG, un pH ácido y la presencia de  $Zn^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ . Además de la formación de agregados, también debe existir una localización correcta de las proteínas membranales necesarias para llevar a cabo dicha función, ya que los agregados varían en eficiencia, dependiendo de las proteínas membranales que se acumulan a su alrededor. Se piensa que existe un patrón de superficie en la hormona agregada que es reconocido por lípidos, proteínas, o por una combinación. Esto permite que las proteínas membranales necesarias para el transporte y la exocitosis del gránulo secretor, se ensamblen correctamente y en las proporciones adecuadas, en la

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

membrana alrededor del agregado. Dicho ensamblado no ocurre con la misma eficacia, alrededor de todos los agregados (Dannies 2002).

Se ha demostrado mediante técnicas de autoradiografía, inmunocitoquímica y fraccionamiento celular que la PRL es sintetizada a través de esta ruta intracelular (RER - CG - gránulos inmaduros - gránulos maduros) (números 1 al 7 en fig. 4) (Tougard et al 1980, Farquhar 1985).

#### **Secreción regulada y constitutiva de prolactina**

Se han identificado dos tipos generales de vías secretoras: En primer lugar, se encuentran las llamadas "vías reguladas" (ruta 1 en fig. 5) que son características de las células glandulares exócrinas y endocrinas, que concentran sus productos en gránulos secretores. La secreción puede ser regulada por diversos secretagogos a nivel de la exocitosis, dando lugar a una descarga rápida y masiva de las proteínas almacenadas, en el momento de su requerimiento fisiológico. En segundo lugar está la llamada "vía constitutiva" (ruta 2 en fig. 5), que es un proceso continuo, limitado solo por la disponibilidad del producto, y es regulada a nivel de la biosíntesis. Otra diferencia fundamental entre estos dos tipos de vías es su cinética de secreción, ya que la vía constitutiva ocurre esencialmente a una tasa constante. Así, el transporte de las proteínas desde el CG hasta la membrana celular tarda solamente diez minutos. En cambio, en la vía regulada las células pueden almacenar sus productos en los gránulos por un periodo de tiempo considerable (Kelly 1985, Buess y Kelly 1987, Halban y Irminger 1994).

Por lo que se refiere a la vía regulada, en células productoras de PRL se ha observado que la hormona recién sintetizada, marcada con isótopos radiactivos, es liberada preferencialmente en vez de la hormona almacenada (Swearingen 1971, Swearingen y Nicoll 1972).

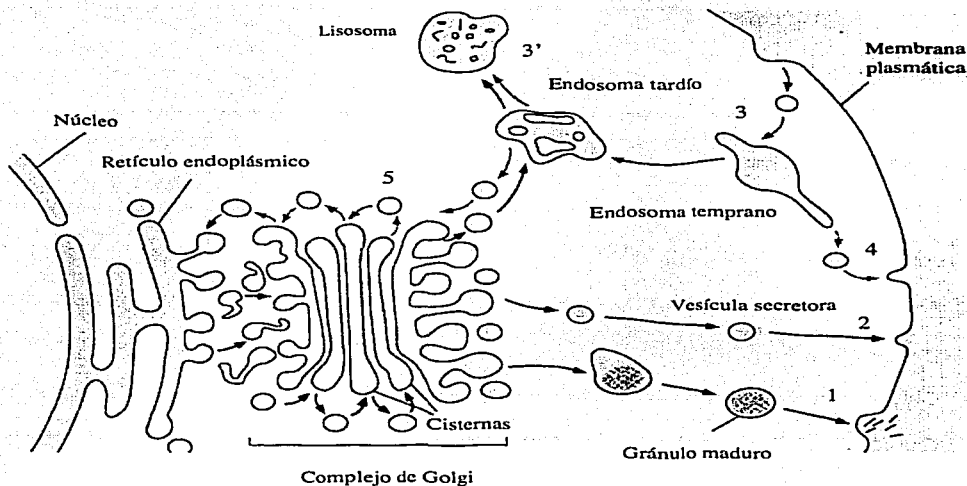


Fig. 5 Diagrama de los diferentes organelos de las células eucariotas que intervienen en las rutas biosintéticas y endocíticas. En las rutas biosintéticas (1 y 2) las moléculas son transportadas desde el retículo endoplásmico hacia la membrana plasmática o vía endosoma tardío hacia los lisosomas. En las rutas endocíticas (3) las moléculas son incorporadas en vesículas derivadas de la membrana plasmática y llevadas hacia los lisosomas (vía endosoma temprano-tardío). Muchas de las moléculas endocitadas son recuperadas desde los endosomas tardíos (5) hacia el complejo de Golgi o hacia el retículo endoplásmico para ser reutilizadas por la célula (tomada de Alberts et al 2002b)

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se ha sugerido que la heterogeneidad en los lactotropos puede explicar este fenómeno, al menos en parte, ya que existe una subpoblación muy activa que sintetiza, concentra y secreta PRL a una tasa muy rápida, y es la responsable de esta liberación preferencial (Walker y Farquhar 1980). Sin embargo, en el animal lactante se han obtenido resultados diferentes que muestran que la secreción preferencial no es de la hormona recién sintetizada sino de la PRL madura, v.gr., de 4 a 8 horas después de haber sido sintetizada (Mena et al. 1984).

Por otra parte, la evidencia de la existencia de la ruta constitutiva en los lactotropos ha sido descrita por varios grupos de trabajo, utilizando diversas metodologías, sin embargo su significado funcional no ha quedado totalmente establecido (Chen et al 1989, Pellegrini et al 1990, Larson y Wise 1994, Bollengier et al 1999, Gavier et al 1999).

La coexistencia de las 2 rutas secretoras dentro de la misma célula requiere de tanto de una organización muy precisa en el empaqueo de ambos productos de secreción, así como de la maquinaria vesicular para cada una de las vías (para revisión ver Arvan y Castle 1998, Glombik y Gerdes 2000, Moore et al 2002).

### **Exocitosis en los lactotropos**

La exocitosis es la forma de exportar productos secretores por los diversos tipos celulares. En células glandulares endócrinas y exócrinas es la ruta de transporte membranal más importante y consiste en la fusión-fisión de la membrana granular con la membrana celular y



la subsecuente descarga del contenido granular al espacio intercelular (Alberts 2002b). La exocitosis en células productoras de PRL ocurre preferencialmente en la membrana basal de la superficie celular (Castano et al 1993).

La secuencia de pasos en la exocitosis comprende varios pasos: una etapa de preparación dependiente de ATP; el movimiento físico del gránulo hacia una región de la membrana celular del lactotrofo, donde se fija al sitio de donde será liberado; la conversión del gránulo a un estado de preliberación; la fusión de la membrana del gránulo con la membrana celular; la liberación del contenido granular y finalmente, la recuperación de la membrana granular (ver revisión en Burgoyne y Morgan 2003). Además, se ha observado que la actividad secretora de los lactotrofos es influenciada por los canales de calcio del tipo T, L y P sensibles a voltaje, que se ubican en la membrana plasmática (Abraham et al 1998a, Suarez et al 2002).

#### **Endocitosis**

Las células ingieren fluidos, moléculas y partículas a través de regiones de la membrana plasmática que se invaginan y se desprenden para formar vesículas endocíticas. Muchas de las moléculas y partículas endocitadas finalizan en los lisosomas, donde son degradadas. La endocitosis puede ocurrir de manera constitutiva, o en respuesta a señales extracelulares. La mayoría de los componentes de la membrana plasmática que son endocitados son continuamente reciclados a la superficie celular a través de la exocitosis (Gonzalez-Gaitan 2003).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Muchos de los receptores de superficie celular que unen macromoléculas específicas extracelulares lo realizan mediante pozos cubiertos por clatrina. De esta forma, el complejo receptor-ligando es internalizado en vesículas cubiertas de clatrina en un proceso denominado endocitosis mediada por receptor. La mayoría de los ligandos se disocian de su receptor en el ambiente ácido del endosoma y eventualmente finalizan en el lisosoma, mientras que la mayoría de los receptores son reciclados a través del transporte vesicular hacia la superficie celular. Los destinos de la membrana (número 4 en fig. 5) y de los contenidos (número 3 en fig. 5) son diferentes, ya que la primera es usualmente reciclada y los segundos, son degradados en los lisosomas. En algunas ocasiones las vesículas entrantes se fusionan inicialmente con un compartimento prelisosomal, usualmente referido como un endosoma, el cual tiene un pH bajo (5.5) y carece de enzimas lisosomales. El ambiente ácido provoca la disociación de los ligandos de sus receptores, facilitando el reciclamiento de los receptores hacia la superficie celular y el transporte de los ligandos hacia los lisosomas o hacia otros compartimientos celulares (ruta 5 en fig. 5) (Mellman 1996). En las células productoras de PRL, se ha demostrado la existencia de esta vía por medio de trazadores electrodensos no específicos (Morel 1994).

#### **Degradación lisosomal**

Esta ruta es principalmente utilizada cuando la exocitosis se encuentra deprimida y fue descrita originalmente en la AH de ratas lactantes no succionadas por sus crías durante periodos prolongados (número 8 en fig. 4) (Smith y Farquhar 1966). Se ha observado mediante técnicas morfológicas e histoquímicas, la presencia de numerosos gránulos

maduros dentro de los lisosomas, después de un periodo de 24 a 48 horas sin succión. Se ha sugerido que este fenómeno puede servir como regulador del proceso de incorporación y disposición de los gránulos no descargados (Farquhar 1985).

c) *Heterogeneidad molecular*

La PRL es una de las hormonas hipofisarias más versátiles en términos de sus acciones biológicas. De manera similar a lo que acontece con la gran mayoría de las hormonas peptídicas, la PRL es empaquetada y almacenada en gránulos de secreción. Posteriormente, como se ha reportado, intervienen mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, en el proceso de transformación y liberación de la misma (Mena et al 1986).

Aunque la forma más abundante de la PRL es la de 23 kDa, se han descrito variantes, las cuales han sido reportadas en una gran variedad de mamíferos, incluyendo a los humanos. En general, estas pueden resultar del procesamiento alternativo del transcrito primario, rompimiento proteolítico y otras modificaciones a la cadena de los aminoácidos. A continuación se describen brevemente (fig.6):

Procesamiento alternativo El corte de los precursores de RNAm es un mecanismo común en la naturaleza, que resulta en la generación de diferentes isoformas de proteína a partir de un solo gene. En la AH se ha reportado la existencia de una variante de 137 aminoácidos producida probablemente por este mecanismo (Emanuele et al 1992).

La glucosilación se ha reportado en la AH de una gran variedad de mamíferos, anfibios y aves, asociada a la disminución en la actividad biológica de las mismas (Lewis et al 1984); el

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

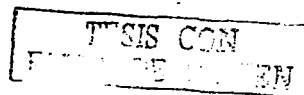
grado de glucosilación varía entre las especies y diferentes estados reproductivos desde 1% hasta el 60%.

La desamidación implica la pérdida de amonio de los residuos de asparagina y glutamina, lo cual trae como consecuencia una disminución de la actividad biológica de las prolactinas de ovino y de ratón (Haro y Talamantes 1985).

Dimerización y polimerización de la hormona o agregados con proteínas acarreadoras (como las inmunoglobulinas) por uniones covalentes y no covalentes. Teniendo como resultado formas de alto peso molecular, con una actividad biológica disminuida.

La proteólisis de las prolactinas de rata, ratón y humano relacionada con la ruptura del asa mayor, formada por uno de los puentes disulfuro de la molécula. En la rata las formas más estudiadas son la de 14, 16 y 22 kDa (Sinha 1992). Por lo que se refiere al fragmento de 22 kDa, este es producido por el corte de una proteasa de serina (calicreina). Esta enzima se encuentra en el complejo de Golgi y en los gránulos secretores de los lactotopos (Powers 1993), es inducida por los estrógenos y actúa a través de una acción dependiente de tilo (Powers y Hatala 1990). El corte se puede producir en tres sitios cercanos al grupo carboxilio terminal, los sitios son arginina 174-arginina 175, lisina 185-fenilalanina 186 y arginina 188-cisteina 189 (Powers y Hatala 1990). Por otra parte, el fragmento de 16 kDa es el resultado del corte proteolítico entre los residuos tirosina 145-leucina 146 y triptofano 148-serina 149 por un mecanismo en el cual participa la catepsina D (Andries et al 1992 y Baldocchi et al 1993).

La reducción de un puente disulfuro, dando lugar a las formas submonoméricas con actividad biológica e inmunológica diferente a la de la forma nativa (Mittra 1980).



La fosforilación, esta ocurre dentro de los gránulos de secreción de los lactotrofos justo antes de la exocitosis e implica la esterificación de los grupos hidroxil de los residuos de serina y treonina (Greenan et al 1989). Se ha descrito fosforilación de las prolactinas de rata (Mena et al 1993), pollo, pavo, (Aramburo et al 1992) ovino y bovino (Brooks et al 1990).

La PRL fosforilada tiene una actividad biológica menor.

Por otra parte, la presencia de PRL fosforilada en el tejido de la hipófisis y en medio obtenido a través del cultivo de dicho tejido, sugieren que esta forma de PRL puede ser liberada de los lactotrofos y tener un significado fisiológico específico. Resultados obtenidos a partir del análisis de hipófisis de ratas en diversos estadios del ciclo estral, muestran una liberación desproporcionada de las diferentes isoformas de carga; por ejemplo, durante la tarde del proestro no se presenta una liberación de las tres isoformas difosforiladas, durante el estro la isoforma 1 es liberada en una mayor proporción (Ho et al 1993) y durante el embarazo la proporción de PRL no fosforilada a fosforilada se incrementa (Ho y Walker 1991). Finalmente, durante la transformación inducida por la succión, así como en la liberación de la hormona, hay un aumento en la cantidad de PRL fosforilada (Mena et al 1993).

Este grado de polimorfismo de la PRL sugiere que las diferentes formas de la molécula tienen diferente potencia biológica. Dicha hipótesis propone, que la heterogeneidad molecular de la PRL es uno de los mecanismos por los cuales se genera esa gran diversidad de acciones de la misma (Sinha 1992 y 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

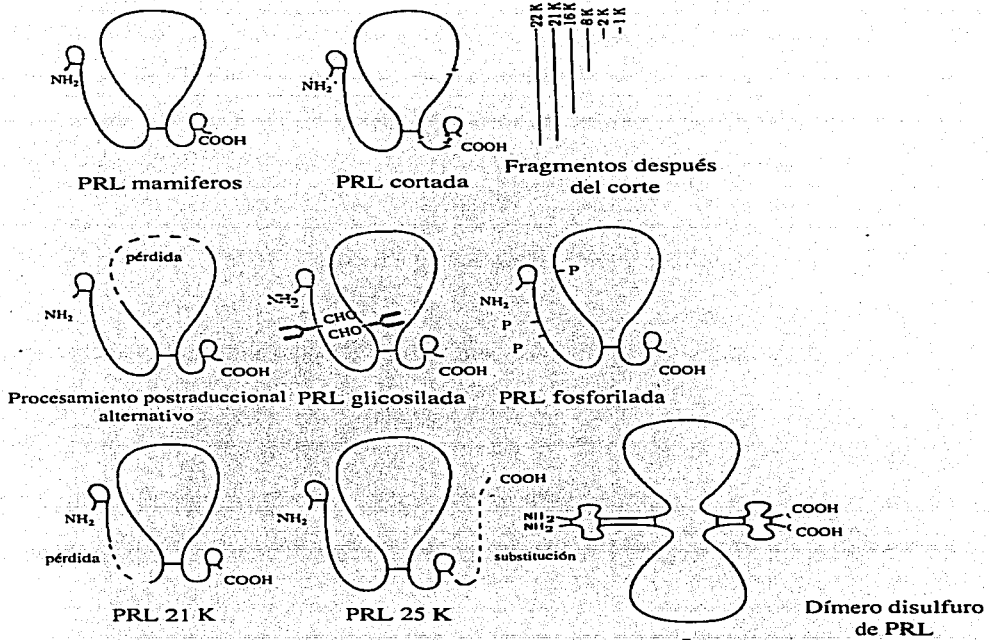


Fig. 6. Modificaciones estructurales de la PRL (tomada de Sinha 1992 y 1995)

#### ***d) Mecanismos asociados a la transformación de prolactina***

Como se ha mencionado, el proceso de secreción de la PRL en la rata lactante es un evento multifásico, en el cual la liberación de la hormona hacia la circulación o al medio de cultivo es la etapa final (Grosvenor et al 1979, Grosvenor et al 1981, Mena et al 1982). Este concepto surge de los resultados obtenidos mediante diferentes técnicas, entre las cuales podemos mencionar al bioensayo, la electroforesis y el radioinmunoensayo, del contenido y la detectabilidad de la hormona en la glándula en comparación con la hormona secretada. De esta forma, la estimulación de la secreción durante un periodo breve provoca una disminución rápida y extensa (15-60  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) del contenido de la PRL en el tejido. Sin embargo, esta no coincide cuantitativamente con la proporción de la hormona liberada (2-3  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) durante el mismo periodo de tiempo. En cambio, es seguida de una reacumulación gradual de la hormona dentro de la glándula (Grosvenor y Mena 1971; Mena et al 1980, Mena et al 1982). Estas observaciones permiten postular que la depleción del contenido glandular de PRL, no corresponde con la expulsión de la hormona del tejido sino a una pérdida reversible en la detectabilidad de la misma, la cual se recupera durante las fases de repleción y de liberación.

De esta forma, se ha propuesto que en la AH de la rata lactante, la PRL se almacena en una forma preliberable y detectable, la cual, mediante un proceso de transformación reversible, pasa de la forma detectable a una indetectable y finalmente recupera su detectabilidad durante la liberación. Según este esquema se considera que la fase de transformación corresponde a la fase de depleción e indetectabilidad de la hormona y la fase de liberación

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

propia mente dicha ocurre a partir de la hormona transformada. Dado que dicha transformación es reversible, permite explicar la recuperación de la detectabilidad tanto en la hormona que se reaccumula en la AH como en la que es liberada (revisión en Mena et al 1992).

Estos cambios en la detectabilidad de la hormona se deben al incremento en las formas poliméricas, generadas a partir de la unión de formas monoméricas por medio de puentes disulfuro (Mena et al 1986). Este intercambio tiol-disulfuro es dependiente del pH granular, ya que se ha observado que una solución con pH alcalino incrementa la detectabilidad de la PRL y un pH ácido la disminuye (Mena et al 1988). El incremento o disminución en la detectabilidad de la hormona, sugiere que el intercambio tiol-disulfuro es reversible y por tanto puede cambiar de una forma detectable a una no detectable y viceversa (Lorenson et al 1983, Martínez de la Escalera et al 1986).

Asimismo, las fases de depleción, repleción y liberación de PRL son procesos interdependientes, ya que están regulados por mecanismos hipofisarios y por influencias hipotalámicas. Tanto la fase de depleción-transformación como la repleción de la hormona son inhibidas por la dopamina y por el agonista dopaminérgico bromocriptina, mientras que la fase de liberación es incrementada por la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) (Grosvenor y Mena 1980, Grosvenor et al 1980).



En resumen, estos datos muestran que la fase de depleción-transformación es el paso limitante para la disponibilidad de la hormona liberable en la AH de la rata lactante y que el control hipotalámico es ejercido selectivamente sobre las diferentes fases.

*e) Receptores de prolactina*

La PRL y la GH pertenecen a una familia de citocinas, las cuales tienen características similares en la estructura del ligando y del receptor.

El receptor de PRL (PRL-R) pertenece a una familia de receptores hematopoyéticos (denominados receptores a citocinas clase 1) que incluyen a la GH, eritropoyetina, interleucinas 2, 3, 4, 7 y 9, trombopoyetina, factor inhibidor de leucemia y factor estimulador de la colonia de granulocitos y macrófagos (Bazan 1990a y Bazan 1990b). Todos estos receptores se caracterizan por poseer un solo dominio transmembranal hidrofóbico el cual se divide en un dominio extracelular (en el cual se une el ligando) y un dominio intracelular (Kelly et al 1991).

El dominio extracelular posee 4 residuos de cisteína y un dominio, formado por la secuencia triptofano-serina-cualquier aa-triptofano-serina. Ambas estructuras son necesarias para la formación del complejo ligando-receptor. Por lo que se refiere al dominio intracelular posee un dominio hidrofóbico, denominado box 1, el cual está compuesto por secuencias de prolina y se encuentra localizado cerca de la región transmembranal. Este arreglo es esencial para la vía de transducción de señales (Horseman y Yu-Lee 1994, Dinerstein et al 1995).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En el tejido de rata, se han descrito tres versiones del PRL-R. Una forma corta compuesta de 291 aa, una forma larga de 591 aa (ver revisión en Bole-Feysot et al 1998) y una forma intermedia de 399 aa, esta última solo se ha aislado en células provenientes de linfoma Nb2 T (Ali et al 1991) (ver fig. 7). El dominio extracelular de cada una de estas formas es idéntico y solo difieren en la región intracelular, resultado de un procesamiento alternativo del RNAm. Los PRL-R se expresan en todos los tejidos de la rata, sin embargo los órganos con mayores concentraciones son el hígado, el plexo coroideo, el ovario y la glándula mamaria (Nagano y Kelly 1994). Por lo que se refiere a la distribución, tanto la forma corta como la larga se encuentran distribuidos de manera similar.

Además de los receptores de membrana, se ha reportado la existencia de proteínas solubles, conformadas por 206 aa, que unen a la PRL (Berwaer et al 1994). Estas se hallan principalmente en las células epiteliales mamarias y en la leche.

#### *f) Activación del receptor a prolactina y transducción de señales*

El PRL-R une tres tipos de ligandos: PRL, PL y GH (Goffin et al 1996, 2002). La unión de estos ligandos al PRL-R es el primer paso de la activación del receptor. Diversos estudios proponen que el PRL-R se activa por dimerización (Goffin et al 1996), la cual es mediada por un solo ligando (Elkins et al 2000). Esto comprende dos regiones (llamadas sitios de unión 1 y 2) que interactúan con cada molécula del PRL-R (Goffin et al 1996).

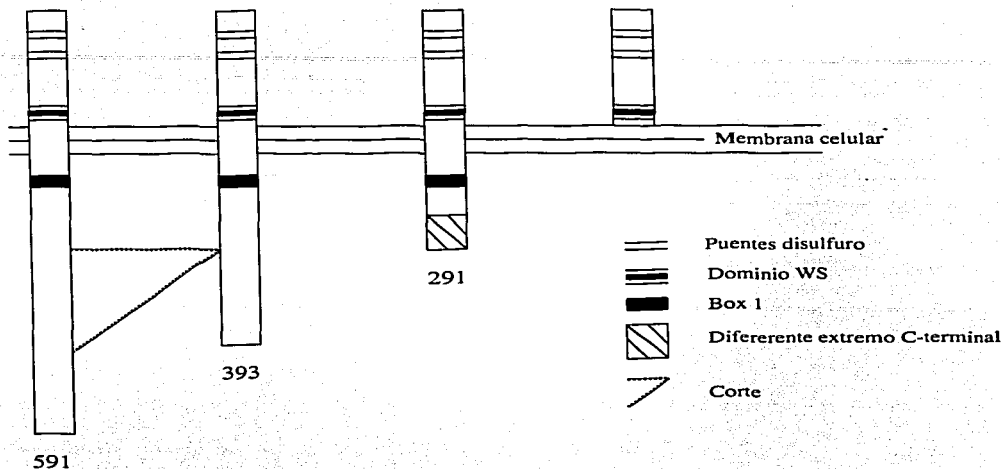


Fig.7 Diagrama de los diferentes receptores de PRL en la rata. De derecha a izquierda se muestran el tipo largo, intermedio, corto y la proteína transportadora de PRL. (tomada de Ben-Jonathan y Hnasko 2001).

Una vez que el PRL-R se une a sus ligandos, desencadena una serie de cascadas de señalización intracelular. No existe evidencia de que el tipo de ligando (PRL, GH o PL) afecte la naturaleza de la señal transmitida al interior de la célula (Goffin et al 2002). Como todos los receptores a citoquinas, el PRL-R no posee actividad enzimática intrínseca y transduce su mensaje al interior de la célula a través de diversas cinasas que, a su vez, activan a otros efectores. La principal y mejor conocida cascada de señalización comprende a la vía Jak/Stat, la vía Ras-Raf-MAPK y al de la cinasas de la tirosina Src (Bole-Feysot et al 1998; Yu-Lee et al 1998, Freeman et al 2000). La fosforilación de STAT permite su

translocación al núcleo y su unión subsiguiente a secuencias consenso en el ADN, llamadas GAS (Gamma Activation Site) las cuales activan la transcripción de diferentes genes (ver fig. 8) (Freeman et al 2000).

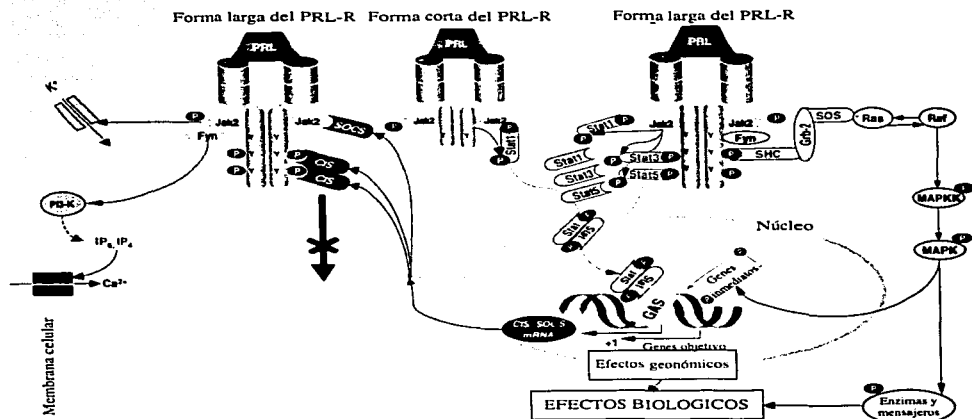


Fig. 8 Vías de transducción de señales iniciada por la activación del receptor de PRL (PRL-R). Vía JAK/STAT: los miembros de la familia de proteínas de transductor de señales y activador de la transcripción (STAT), STAT1, STAT3, STAT5a y STAT5b son las moléculas principales de la vía de transducción de señales iniciada por la activación del PRL-R. STAT contiene un sitio de unión al DNA, un dominio del tipo SH-3, SH-2 y un dominio transactivador en el extremo amino y carboxilo terminal. Un residuo de tirosina fosforilado (Y) de la isoforma larga del PRL-R activado interactúa con el dominio SH2 de una STAT. STAT es fosforilado por el receptor asociado a Jak cinasa mientras está unido al receptor. La forma fosforilada de STAT se disocia del receptor y se hetero u homodimeriza en sus residuos de fosfotirosina con el dominio SH2 de otra molécula STAT fosforilada. Finalmente, el dímero STAT se transloca hacia el núcleo y activa un sitio de unión de DNA en el promotor de un gen blanco, denominado GAS (secuencia activada por  $\gamma$ -interferon). Los residuos de tirosina de la isoforma corta del PRL-R no son fosforilados por Jak2, pero la fosfotirosina de Jak2 puede servir como sitio de anclaje para STAT1. Cascada MAPK: la activación del PRL-R también activa la cascada de cinasa de proteína activada por mitogeno (MAPK), la cual participa en la fosforilación de varios factores de transcripción y de genes tempranos. Los residuos de fosfotirosina de la isoforma larga del PRL-R sirven como sitios de anclaje para proteínas adaptadoras (Shc/Grb2/SOS) los cuales conectan con la cascada Ras/Raf/MAPK. Canales iónicos: Box 1 del dominio intracelular del PRL-R también interviene en la activación de una cinasa de tirosina activada por los canales de K<sup>+</sup> a través de Jak2. El extremo carboxil terminal del dominio intracelular del PRL-R inicia la producción de mensajeros intracelulares [inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP<sub>4</sub>) e inositol hexafosfato (IP<sub>6</sub>)] los cuales abren canales de Ca<sup>2+</sup> independientes de voltaje. Src cinasas: la PRL también activa a los miembros de la familia Src cinasa, c-src y Fyn, los cuales participan en la fosforilación de la cinasa de tirosina de 3-fosfatilinositol (PI3K). Regulación negativa: las vías Jak/Stat pueden ser inhibidas por SOCS (señal supresor de citocinas), que compete con STAT por los sitios de anclaje en el PRL-R. (Tomada de Freeman et al 2002).

### ***g) Prolactina extrahipofisiaria***

Además de ser sintetizada y secretada por los lactotrofos de la AH, la PRL también es producida por diversos tipos de células y tejidos. La expresión del gene de PRL ha sido confirmada en varias regiones del cerebro, decidua, miometrio, glándula lagrimal, timo, bazo, linfocitos circulantes, células linfoides de la médula ósea, células epiteliales y tumorales mamarias, fibroblastos de la piel y glándulas sudoríparas (ver Ben-Jonathan et al 1996, para revisión). Así, además del suero, la PRL puede hallarse en diversos compartimentos como en el líquido cerebro espinal, lágrimas, leche, líquido folicular y sudor (ver fig. 9). Se ha observado que las ratas hipofisectomizadas retienen aproximadamente el 20% de la PRL biológicamente activa en la circulación, la cual puede aumentar con el tiempo hasta un 50%. Así mismo, la neutralización de la PRL circulante con anticuerpos anti-PRL provoca una disfunción inmune e incluso la muerte (Nagy y Berczi, 1991). La PRL hipofisiaria actúa de manera endócrina, i.e., es secretada por una glándula, transportada por el sistema circulatorio y actúa a nivel periférico sobre células blanco, a través de receptores específicos localizados en la membrana plasmática. En cambio, la PRL que es producida por los diferentes tipos celulares puede actuar de manera más directa, i.e., como factor de crecimiento, neurotransmisor o inmunomodulador. Así, la PRL producida localmente puede actuar sobre células adyacentes (parácrino) o sobre la misma célula secretora de PRL (autócrino), sin afectar la concentración circulante de la hormona (Bole-Feysot et al 1998).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**Fuentes de PRL extrapituitaria**

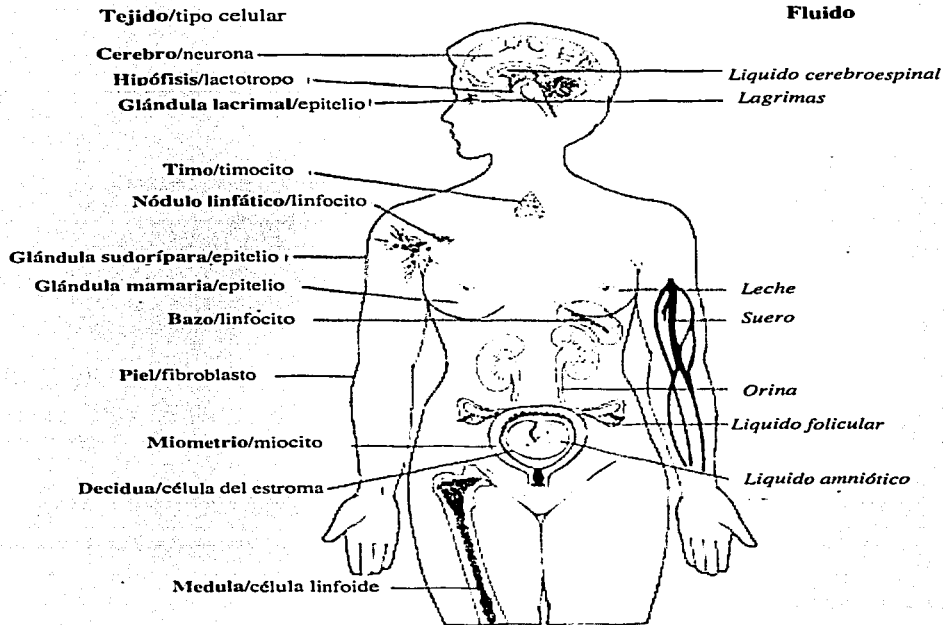


Fig. 9 Distribución de la PRL extrahipofisiaria en el cuerpo. Las estructuras enlistadas en la izquierda muestran los tejidos y las células que producen la PRL, mientras que en la derecha los fluidos que contienen PRL. Nótese la heterogeneidad de las células productoras de PRL en términos de origen embriológico, morfológico y funcional. (tomada de Ben-Jonathan et al 1996).

## **VI. REGULACIÓN Y CONTROL DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA**

### ***a) Control hipotalámico***

De los estímulos fisiológicos, los más importantes para la secreción de PRL, son la succión (Grosvenor y Mena 1971, Mena y Grosvenor 1972), el estrés (Neill 1970) y los esteroides ováricos, principalmente los estrógenos (Neill y Nagy 1994). Tales estímulos son traducidos por el hipotálamo, el cual elabora una serie de factores liberadores e inhibidores de la síntesis y secreción de la PRL. En los mamíferos, el control hipotalámico es tanto de tipo inhibitorio como estimulador, dado por la dopamina y la secreción de la hormona ocurre tanto por una inhibición de la secreción como por una facilitación de la secreción de agentes estimuladores vgr., la TRH o el péptido intestinal vasoactivo (VIP) (revisión en Lamberts and Macleod 1990; Freeman et al 2000). De esta manera la homeostasis de la PRL debe de ser vista en un contexto de un balance fino entre la acción inhibitoria de la dopamina y acciones estimuladoras de factores hipotalámicos, sistémicos y locales (vease fig. 10).

Por lo que se refiere a los lactotropos estos son únicos entre todas las células endócrinas, ya que llegan a mostrar una tasa alta de secreción basal. Por lo tanto, la regulación de PRL hipofisiaria esta dada por un tono inhibitorio hipotalámico. Esto último se basa en las siguientes evidencias: la desconexión quirúrgica de la hipófisis y del hipotálamo medio basal (lesión de la eminencia media o sección del tallo hipofisiario) tiene como consecuencia el aumento gradual en las concentraciones de PRL plasmática (Arimura et al 1972, Bishop et

TESIS CON  
FALLA DE CENSURA

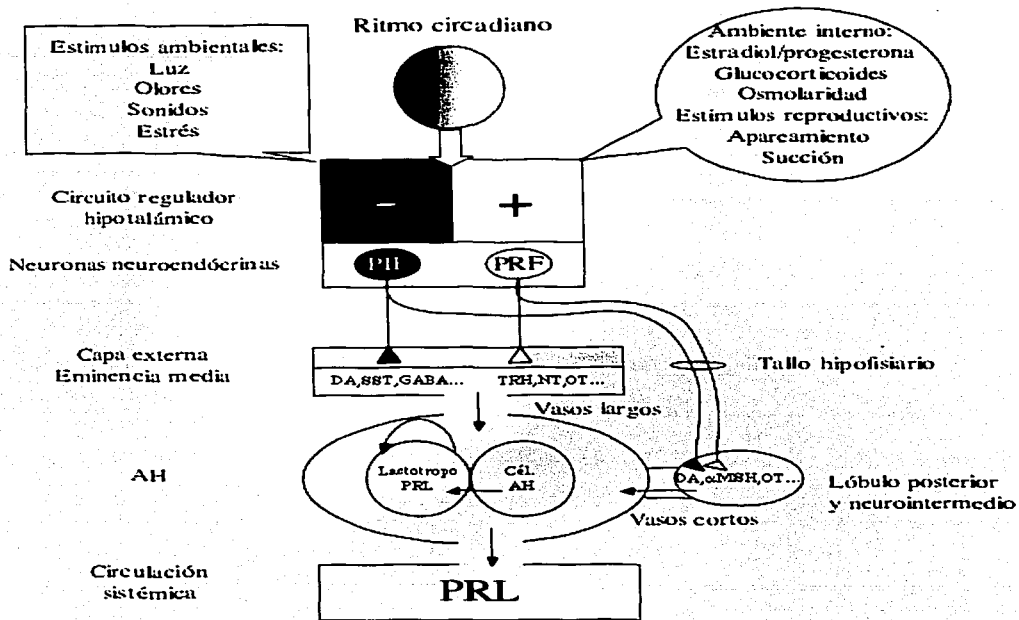


Fig. 10 Esquema de la regulación de la secreción de PRL. La secreción de PRL es controlada por un ritmo circadiano de luz-obscuridad, el cual puede ser modificado por los estímulos tanto del medio ambiente interno como externo, afectando a los elementos estimuladores o inhibidores del circuito hipotalámico. La vía final del control hipotalámico son las neuronas que producen factores inhibidores de PRL (PIF) tales como la dopamina (DA), somatostatina (SST), ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) o factores liberadores de PRL (PRF) como hormona liberadora de tirotropina (TRH), neurotensina (NT), oxitocina (OT). Las neuronas neuroendócrinas pueden liberar PIF y PRF hacia la eminencia media a través de los vasos largos hipofisarios o al lóbulo neurointermedio, el cual está conectado a la AH por medio de los vasos cortos hipofisarios. De esta manera, los lactotrofos son regulados a través de factores producidos por el sistema nervioso central o en la hipófisis. Por otra parte, los lactotrofos son regulados también por células vecinas (regulación parácrina) o de los mismos lactotrofos (regulación autócrina) (Tomada de Freeman et al 2000).



al. 1972); cuando la AH es transplantada a un sitio que no tiene vínculos vasculares o neurales con el hipotálamo (Everett 1954) o sus células son cultivadas *in vitro* (Neill 1980), los lactotrofos muestran una alta tasa de secreción.

***b) Importancia fisiológica de las neurohormonas implicadas en el control de la PRL***

Desde hace tiempo se sabe que la regulación hipotalámica de la secreción de las hormonas hipofisarias es un proceso muy complejo, en el cual es improbable que un solo estímulo inducido por estimulación sensorial o somática o por acción de retroalimentación, sea reconocido por la célula productora de PRL. Más bien, las respuestas hipofisarias son controladas por cambios simultáneos múltiples. La mayoría de los factores que participan en el ambiente neurohumoral de la célula no son selectivos de las células productoras de PRL, ya que se ha observado que también afectan a otros tipos celulares hipofisarios, lo cual significa que su señal tiene varias funciones al mismo tiempo.

La dopamina es el factor más conspicuo en la regulación de la secreción de PRL. Su capacidad de inhibir tónicamente la secreción hormonal explica el por qué cuando se bloquea su liberación o sus receptores bajo casi cualquier circunstancia, se provoca un efecto marcado de estimulación en la secreción de PRL. Por otra parte, se ha documentado que la dopamina a concentraciones bajas tiene un efecto estimulador de la secreción de PRL (Burriss et al 1991).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

La dopamina puede ser la neurohormona más importante para el control homeostático de PRL. Este papel es llevado a cabo por una interacción de retroalimentación recíproca entre la hipófisis y el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico ya que se ha demostrado que un decremento en los niveles de dopamina provoca un aumento en la secreción de PRL. Ésta, a su vez, estimula la liberación de dopamina y así antagoniza el cambio inicial en la tasa de la liberación de PRL (Kordon et al 1985).

En varios estudios se ha establecido la participación de opiáceos endógenos en la respuesta de la PRL al estrés. El estrés provoca la liberación simultánea de ACTH y  $\beta$  endorfinas; el bloqueo de los efectos opiáceos por la naloxona no afecta la respuesta de la ACTH y de las  $\beta$  endorfinas al estímulo del estrés, pero evita la respuesta de la PRL. En este caso los péptidos morfomiméticos hipotalámicos, o más probablemente, las  $\beta$  endorfinas hipotalámicas, pueden ser vistas como "mediadores parácrinos" del componente de la PRL de la respuesta de la hormona al estrés (Kordon et al 1985).

*c) Influencia del lóbulo posterior de la hipófisis*

Factores producidos por el lóbulo posterior y neurointermedio de la hipófisis, pueden alcanzar el lóbulo anterior de la AH por medio de los vasos cortos del sistema hipotálamo-hipofisiario, el cual representa una comunicación vascular entre esos lóbulos. De esta manera, la comunicación entre los lóbulos posterior y neurointermedio y la AH es neuroendocrina y endocrina.

Estudios previos han demostrado que el  $\alpha$ -MSH actúa como un factor que incrementa la responsividad de los lactotropos localizados en la región central de la AH (Nagy y Frawley 1990). Asimismo, mediante el ensayo de placa hemolítico, se ha observado que este factor ejerce una acción de reclutamiento de lactotropos de baja actividad secretora, a células con alta actividad, además de incrementar la sensibilidad de dichas células a factores hipotalámicos (Hill et al 1991, Ellerkmann et al 1992).

Por otra parte, se ha sugerido que tanto el lóbulo posterior de la hipófisis como el lóbulo neurointermedio, pueden participar en la liberación de PRL inducida por la succión (Laudon et al 1990). Así, se encontró que la liberación de oxitocina por parte del lóbulo posterior de la hipófisis en respuesta al estímulo de la succión, además de provocar la evacuación de la leche, también provoca la liberación de PRL (Frawley 1994). Estudios *in vitro* muestran que extractos del lóbulo posterior de la hipófisis de ratas lactantes estimulan la liberación de PRL en células de la AH, a diferencia de extractos hipotalámicos que, según los autores, contienen significativamente menor actividad secretora (Murai y Ben-Jonathan 1987, Hyde y Ben-Jonathan 1988). Asimismo, se ha observado que dicho factor liberador de PRL es un péptido de peso molecular menor a 5000 daltones, distinto a cualquiera de los otros secretagogos, como el TRH, la oxitocina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). De acuerdo a estos autores, este factor se requiere para la liberación de PRL estimulada por la succión (Murai y Ben-Jonathan 1987) y para la generación del pico de liberación de PRL durante el proestro. Además, se ha sugerido también que dicho factor puede estimular la liberación de PRL *in vivo* en presencia de DA, lo cual sugiere que la lobectomía posterior

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

inhibe la liberación de PRL en respuesta a la succión . Estos resultados han permitido postular que durante la succión, el lóbulo posterior de la hipófisis secreta una señal química que estimula la liberación de PRL (Murai y Ben-Jonathan 1987, Hyde et al 1987, Hyde y Ben-Jonathan 1989). Estas posibilidades, sin embargo no han sido confirmadas ya que se ha reportado que la lobectomía posterior no bloquea la liberación de PRL inducida por la succión (Mena et al 1996).

Recientemente, se ha observado que el salsolinol, un compuesto derivado de la dopamina que pertenece a la familia de las tetrahidroisoquinolinas, es capaz de regular la liberación de PRL al actuar de manera auto-sinaptócrina sobre las terminales dopaminérgicas (Toth et al 2002).

#### *d) Regulación parácrina y autócrina*

En años recientes se ha observado que existen diversos mecanismos de comunicación en los sistemas endócrinos, en los cuales las propias células endócrinas producen mensajeros, que pueden afectar tanto la actividad secretora de células vecinas como la de las mismas células que les dan origen.

La comunicación parácrina consiste en que el mensajero proveniente de una célula dada ejerza su influencia sobre células situadas fuera de la vecindad de la misma o de distinta estirpe, sin requerir que su transporte se lleve a cabo por la circulación general o local de la glándula. También puede ser el caso de que el mensajero actúe como mediador local y que afecte solamente células en el ambiente inmediato de la célula productora. Para que se lleve a

cabo este proceso, los mensajeros deben actuar en sus objetivos específicos, además de que no deben difundirse demasiado lejos de su origen, ya que en ese caso serán rápidamente capturados, destruidos por enzimas extracelulares o inmovilizados por la matriz extracelular.

Otra forma de comunicación celular es la autócrina la cual consiste en que las células de un organismo producen señales dirigidas hacia si mismas y ejercen sus efectos a través de sus propios receptores.

De acuerdo a lo anterior, la actividad secretora de las células de la hipófisis anterior no sólo depende de los factores liberadores e inhibidores hipotalámicos y de hormonas periféricas, ya que también son capaces de controlar su propia función a través de factores autócrinos y/o parácrinos producidos localmente. La afinidad topográfica existente entre los tipos celulares de la AH de la rata, así como la presencia de aminas biogénicas, neuropéptidos y factores de crecimiento de los diferentes tipos celulares sugieren la participación de mecanismos de control intraglandulares en la regulación de la secreción hormonal de la AH (revisión en Deneff 1990, Schwartz y Cherny 1992, Schwartz 2000).

Para el caso de los lactotrofos, las interacciones que se han descrito incluyen tanto a los gonadotrofos como a las células foliculoestrelladas. Por lo que se refiere a los primeros, existen contactos íntimos entre estos y los lactotrofos y el agente que media los efectos parece ser la angiotensina II (AII), liberada por los gonadotrofos en respuesta al tratamiento con hormona estimuladora de las gonadotrofinas (GnRH). La AII estimula la liberación de PRL y se ha observado que la administración de antagonistas bloquea este efecto. Aunado a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

esto, previamente se ha descrito la presencia tanto de AII en la AH como de receptores a AII en los lactotopos. Asimismo se ha observado que las células foliculoestrelladas inhiben la secreción de PRL cuando son cultivadas conjuntamente con lactotopos (Deneff y Andries 1983).

Por otra parte, con relación al VIP, el cual se encuentra presente en diferentes células endocrinas de la AH, se ha reportado que puede actuar como un estimulador de la liberación de PRL, tanto de manera autócrina como parácrina (Hagen et al 1986).

*e) Heterogeneidad regional de la secreción de PRL*

Estudios previos han propuesto que la liberación de la PRL inducida por la succión es un proceso multifásico que culmina con la exportación de la hormona a la circulación (Grosvenor y Mena 1980). En estudios anteriores se ha observado que dosis altas de TRH inyectadas a ratas que han sido separadas de sus crías por varias horas causan una pequeña elevación en la concentración de PRL en el plasma, pero que esta respuesta se amplía significativamente cuando las ratas son sometidas a un periodo breve de succión (Grosvenor y Mena 1980). Resultados similares se han obtenido cuando se utiliza el VIP o morfina en lugar de TRH. Esto ha sido interpretado como ya se mencionó que la succión, tras inducir cambios postraduccionales de la hormona, da lugar a la formación de una poza liberable de la misma, en la cual ejercen su efecto los secretagogos.

En la hipófisis se distinguen 2 partes, la neurohipófisis y la AH. La última está compuesta por el lóbulo anterior (pars distalis), el lóbulo intermedio (pars intermedia) y la pars

tuberalis, mientras que la neurohipófisis está compuesta por el lóbulo posterior (pars nervosa), el tallo hipofisiario y la eminencia media (ver fig. 11) (Armstrong 1995). La AH de la rata contiene más de 2,000,000 de células, de las cuales el 30-50% son lactotropos (Porter y Frawley 1992). Asimismo, en ratas lactantes, los lactotropos están distribuidos de manera no homogénea en la AH, encontrándose ubicados en una zona interna cercana al lóbulo intermedio y en una zona externa que corresponde al resto de la glándula (Papka et al 1986).

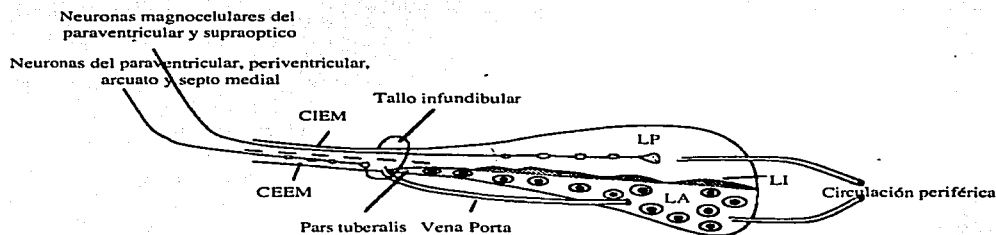


Fig. 11 Representación esquemática de la hipófisis de la rata y sus relaciones con el hipotálamo CIEM= capa interna de la eminencia media, CEEM= capa externa de la eminencia media, LP= lóbulo posterior, LI= lóbulo intermedio, LA= lóbulo anterior (tomada de Armstrong 1995).

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

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Se ha considerado también que la heterogeneidad funcional de los lactotrofos puede ser un reflejo de la susceptibilidad de subpoblaciones celulares de cambiar su funcionalidad de acuerdo a los requerimientos fisiológicos de secreción de PRL (revisión en Takahashi, 1995). Así, como ha sido mostrado recientemente, lactotrofos de diferentes regiones de la AH cambian rápidamente su funcionamiento y su responsividad a los secretagogos después de haberse aplicado un periodo de succión. (Nagy et al 1991, Nagy y Frawley 1990). Estos resultados sugieren que en paralelo con los cambios moleculares que le suceden a la hormona durante su transformación, pueden suceder cambios funcionales en los lactotrofos acordes a las situaciones fisiológicas. En apoyo de esto, está el hecho de que células de PRL en cultivo primario responden a la supresión de la inhibición por DA aumentando su secreción pulsátil y sincronizada y aumentando su responsividad a la TRH (Martínez de la Escalera y Weiner 1988). Estas posibilidades han sido apoyadas por diversos hallazgos que demuestran que posterior al estímulo de la succión ocurren cambios drásticos tanto en la proporción de células secretoras de PRL como en la responsividad de las mismas a la DA y a los diferentes secretagogos. Asimismo se ha observado que las células en cultivo primario provenientes de ratas succionadas son más sensibles al TRH y menos responsivas a la DA (Boockfor y Frawley 1987, Nagy y Frawley 1990). Por otra parte, el que estos cambios parezcan suceder de manera preferencial en lactotrofos de la región central de la AH ha llevado a los autores a sugerir que dichas células tienen mayor responsividad en los cambios agudos de secreción de la PRL inducida por la succión (Nagy et al 1991).



En apoyo a esta hipótesis, experimentos más recientes del grupo de Frawley sugieren que el lóbulo neurointermedio de la hipófisis puede participar en el fenómeno de la regionalización, ya que la región central de la AH es la más cercana al lóbulo neurointermedio. Estos autores sugieren que los vasos portales cortos que unen vascularmente al lóbulo neurointermedio con el anterior de la hipófisis pueden servir como conductos para la transmisión de una o más señales para la liberación de la PRL inducida por la succión (Frawley 1994) y se ha sugerido que la AH de la rata lactante se comporta como dos glándulas funcionalmente distintas: la región central de la AH influenciada por el lóbulo neurointermedio y las regiones laterales que dependen de señales liberadas por el sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Nagy et al 1991). Es importante mencionar que todas estas hipótesis surgieron a partir de estudios previos donde se reportó que la remoción quirúrgica del lóbulo neurointermedio resulta en la no liberación de la PRL inducida por la succión (Murai y Ben Jonathan 1987) y en la existencia de secretagogos de la PRL en el lóbulo neurointermedio (Laudon et al 1990). Cabe añadir, sin embargo, que en un estudio posterior no se confirmó la no liberación de PRL por la succión en ratas lobectomizadas (Mena et al 1996).

Se ha sugerido la existencia de heterogeneidad regional funcional de la AH de rata lactante; es decir, la glándula en su totalidad no responde de manera homogénea a los reguladores hipotalámicos. Se ha propuesto que existe una responsividad diferencial a los secretagogos que está asociada al estímulo de la succión y que la regionalización de la secreción de PRL está regulada por el lóbulo posterior y/o neurointermedio. Por otra parte, resultados obtenidos acerca de la secreción basal de la PRL por la AH de ratas no succionadas y

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

succionadas muestran que la secreción de la PRL por la AH de ratas no succionadas fue mayor en los fragmentos de tejido provenientes de la parte central de la glándula que en los de la región periférica. Esta diferencia no se hizo evidente en tejido proveniente de ratas succionadas, donde no hubo diferencia significativa en la secreción de PRL de ambas regiones. Estos resultados sugieren que el estímulo de la succión determina que los lactotrofos de ambas regiones se sincronicen para tener una capacidad secretora similar, es decir, que los lactotrofos con alta capacidad secretora (localizados principalmente en la región central) se sincronicen con los de baja capacidad secretora para liberar la hormona (Mena et al 1996).

Finalmente, la actividad secretora de las células de la hipófisis anterior no sólo depende de los factores hipotalámicos y de las hormonas periféricas. Como ya se mencionó previamente, estas células también son capaces de controlar su propia función a través de factores parácrinos o autócrinos producidos localmente. Se ha observado que el VIP y la calcitonina pueden regular la secreción de PRL en forma autócrina (Hagen et al 1986), mientras que la angiotensina II lo hace de manera parácrina (Denef y Andries 1983). Esta lista de posibles factores implicados va en aumento.

Incluso, existen diversos factores de crecimiento capaces de regular la liberación de PRL en forma parácrina. Así, se ha observado que el factor de crecimiento epidérmico (EGF) provoca un aumento en la síntesis y secreción de PRL (Aanestad et al 1993), así como en el número de células secretoras de PRL (Felix et al 1995); el factor de crecimiento tipo insulínico I (IGF-I) aumenta la secreción de PRL (Lara et al 1994); el factor de crecimiento

neural (NGF) aumenta la secreción de PRL (Missale et al 1994) e incrementa la captura de timidina en los lactotopos (Proesmans 1997). Finalmente, el factor de crecimiento transformante  $\alpha$  (TGF  $\alpha$ ) provoca un aumento en la proliferación de lactotopos (Mc Andrew et al 1995) mientras que el TGF  $\beta$  disminuye la síntesis y secreción de PRL (Ying et al 1986; Murata y Ying 1991; De et al 1996; Tan et al 1997; Abraham et al 1998b).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VII. ANTECEDENTES ESPECIFICOS

A partir de resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Mena et al, 1996), se propuso que a través de acciones autócrinas y/o parácrinas se ejercen influencias regionales en la secreción basal de PRL por la AH de ratas lactantes, ya que la actividad secretora de las células de la AH no sólo depende de factores hipotalámicos y de las hormonas periféricas, sino que estas células también son capaces de controlar su propia función a través de dichos factores, producidos localmente. Se ha descrito que los diversos tipos celulares secretores de la AH (gonadotropos, tirotropos, lactotropos y corticotropos) pueden verse como posibles fuentes y objetivos de estos factores intercelulares (revisión en Schwart y Cherny 1992). Con el fin de probar dicha hipótesis se realizaron los siguientes experimentos :

### Determinación de la secreción de PRL en las regiones central y lateral de la AH de ratas lactantes no succionadas, separadas anatómicamente o incubadas conjuntamente

Las regiones central y lateral de la AH de ratas lactantes no succionadas, se incubaron individualmente en medio de Earle por un periodo de dos horas en condiciones control y cada treinta minutos el medio se reemplazó con medio fresco. Por otra parte, los grupos experimentales quedaron conformados de la siguiente manera: en el primero de ellos se incubaron conjuntamente las regiones individuales central y lateral de la glándula, mientras que en otro grupo, se incubaron ambas porciones de la AH sin haber hecho la disección quirúrgica.

Los resultados obtenidos (ver fig. 12) mostraron que las porciones de la región central del grupo control secretaron una mayor cantidad de hormona que las de la región lateral control, mientras que, con relación a los grupos experimentales, ambos grupos tuvieron una secreción de PRL al medio de incubación similar a la de la región central control y mayor que la de la región lateral control. Estos resultados no fueron concluyentes, ya que podría deberse a la acción de una influencia estimuladora de la región central sobre la región lateral o a un efecto estimulador de la propia región lateral sobre si misma, por lo que se realizo un segundo experimento:

Regionalización de la secreción de PRL en diversos estados fisiológicos de la rata

Los tejidos provenientes de la región lateral y central de la AH de ratas lactantes no succionadas, ratas gestantes en la segunda semana de embarazo y ratas macho adultas se incubaron por treinta minutos en medio de Earle.

La región central de ratas lactantes no succionadas y ratas macho secretaron una cantidad de PRL mayor que la región lateral; sin embargo la cantidad de PRL secretada por las ratas macho fue menor en comparación a la de las ratas lactantes. Por lo que se refiere a las ratas gestantes ambas regiones secretaron una cantidad similar de PRL al medio de incubación (ver fig.13).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

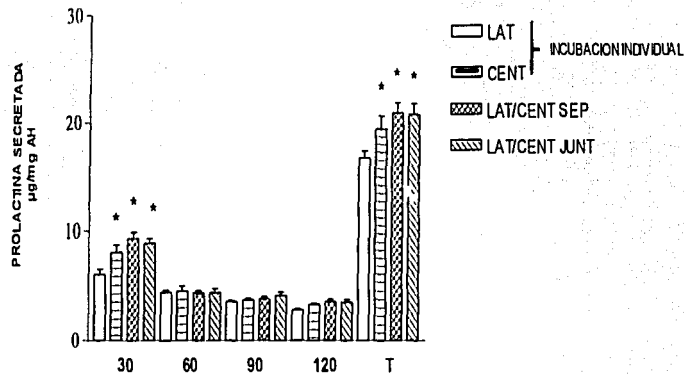


Figura 12. PRL secretada ( $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) durante 2 horas de incubación de fragmentos de tejidos derivados de la región lateral, central, lateral-central separadas anatómicamente o incubadas sin disección. T= suma de la cantidad de PRL secretada al medio de incubación. \* Diferente significativamente de la región lateral ( $p < 0.05$ ).

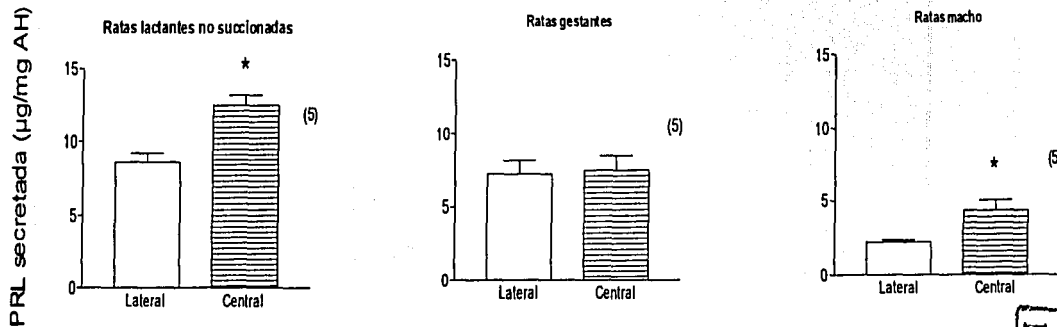


Figura 13. PRL secretada durante la incubación por 30 minutos de las porciones lateral y central de AH, obtenidas de ratas lactantes no succionadas y gestantes (2 semana de embarazo) y ratas macho. \* Diferente significativamente con relación a la región lateral ( $p < 0.05$ ).

## **VIII. HIPOTESIS**

I. En la adenohipófisis de ratas lactantes se producen y secretan al medio de incubación factores capaces de influir sobre la secreción de PRL por la propia glándula tanto de ratas lactantes como de ratas macho.

## **IX. OBJETIVOS**

### *Experimento 1*

1.1 Determinar el efecto del medio condicionado proveniente de la región central y lateral de ratas lactantes en una determinada condición fisiológica, vgr., no succionadas y succionadas, sobre la secreción de la hormona en regiones de AH de animales en la misma condición fisiológica o en una diferente a la del animal de donde haya provenido el medio condicionado.

1.2 Determinar el efecto de incubar las regiones AH de ratas macho en el medio condicionado proveniente de la región lateral de ratas lactantes succionadas y no succionadas.

### *Experimento 2 y 3*

2.1 Determinar si el perfil de secreción de PRL AH de ratas macho incubadas en el medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas, es similar al observado en ratas lactantes.

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

## X. MATERIAL Y METODOS

### *Material biológico*

Se utilizaron ratas primíparas lactantes de la cepa Wistar de 7 a 14 días post-parto (pp) y con 8-10 crías por camada y ratas macho de 330 a 350 grs. Todos los animales fueron mantenidos en jaulas individuales en un cuarto con temperatura controlada ( $24^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ ) y con un periodo de 14 hrs. luz y 10 hrs. oscuridad (luz : 0700-2100 h). Las ratas fueron alimentadas con alimento para roedor (Ralston Purina Co., Chicago IL) y agua *ad libitum*.

### *Obtención de muestras*

Grupo de ratas lactantes. Las madres fueron separadas de sus crías durante 6 horas. Al cabo de dicho periodo las ratas fueron anestesiadas con éter y sacrificadas por decapitación. A otros grupos de animales se les reunió con sus crías para un periodo de succión de 15 minutos y posteriormente fueron sacrificadas.

Grupo de ratas macho. Las ratas fueron anestesiadas con éter y se les sacrificó por decapitación.

Diseción de la AH. Se extrajo la hipófisis, y la AH se dividió, de acuerdo al esquema mostrado en la figura 14, en una porción central y dos laterales; la porción central corresponde a la región interna de la glándula que rodea al lóbulo neurointermedio de la hipófisis y las porciones laterales al resto de la glándula.



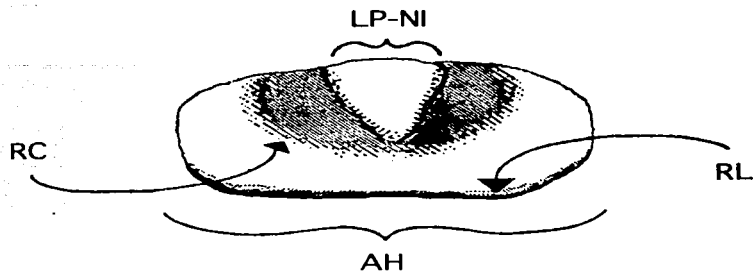


Fig 14. Localización de la región central y lateral de la AH de la rata lactante (tomado de Papka et al 1986) y del corte que se realiza para separar ambas regiones. LP = Lóbulos posterior y neurointermedio, RL = región lateral, RC = región central.

Procedimiento de incubación para la obtención de medios condicionados. Las regiones centrales y laterales de cada animal (ratas lactantes no succionadas y succionadas y ratas macho) fueron incubadas individualmente en 300  $\mu$ l de medio Earle, (pH 7.3) en un agitador metabólico a 37° C (125 rpm, American Optical Corp. Modelo 0256) durante 30 a 240 minutos, bajo una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>. Se tomó el medio de incubación de cada porción de tejido cada media hora durante dos horas, el cual fue reemplazado con la misma cantidad de medio fresco y al finalizar el periodo de cuatro horas. Al final de la incubación las porciones de la AH fueron pesadas y mantenidas a -18 °C. El medio fue ultrafiltrado por medio de tubos Centricon 10 durante cinco ciclos de 30 minutos a 4000 rpm en un rotor de ángulo fijo, con una temperatura de 4° C; utilizándose agua desionizada. Las moléculas de peso molecular superior al corte (10 kDa) fueron liofilizadas por medio de un evaporador centrífugo (Savant) y reconstituidas con medio de Earle al doble

de su concentración original. La concentración de PRL en los medios de incubación se determinó por electroforesis en geles de poliacrilamida con el método de Nicoll et al (1969) y se cuantificó en curvas estándar de PRL 23K al 7.5% en condiciones nativas. Se utilizó un sistema de geles de tubo (75-80 mm x 5 mm).

La electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante aproximadamente 45 minutos. Los geles fueron teñidos con Amido-Black al 7.5% y se destiñeron electroforéticamente con ácido acético al 7.5%. La concentración de PRL se obtuvo a partir de la lectura densitométrica de la banda de PRL (previamente identificada su posición mediante su comparación con una preparación del estándar de PRL de rata obtenido del National Hormone and Pituitary Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases) utilizando un video densitómetro (modelo 620, Bio-Rad). Finalmente, la cantidad de PRL presente en los medios condicionados fue determinada y su valor fue restado de la cantidad total de hormona secretada después de la incubación con regiones de la AH.

### Condiciones experimentales

#### Experimento 1

Se realizaron una serie de experimentos para determinar el efecto sobre la secreción de PRL de incubar las regiones central y lateral de la AH de ratas lactantes no succionadas, succionadas y macho por un periodo de 30 minutos en el medio condicionado obtenido de la incubación de las regiones central y lateral provenientes de animales en la misma o diferente situación fisiológica (no succionadas, succionadas y machos). Por lo que se refiere a los

grupos control estos se incubaron en medio Earle. De esta forma se realizaron los siguientes grupos:

<i>Donador</i>	<i>Receptor</i>
Región lateral de ratas lactantes no succionadas	Ratas no succionadas Ratas succionadas Ratas macho
Región central de ratas lactantes no succionadas	Ratas no succionadas Ratas succionadas
Región lateral de ratas lactantes succionadas	Ratas no succionadas Ratas succionadas Ratas macho
Región central de ratas lactantes succionadas	Ratas no succionadas Ratas succionadas
Región lateral de ratas macho	Ratas no succionadas Ratas macho

### Experimento 2

Para determinar si la incubación con el MC estimula sola la liberación o también la síntesis de PRL, se analizó el efecto de un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida) en la secreción de PRL por parte de las regiones central y lateral de la AH de ratas macho incubadas en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas, se integraron los siguientes grupos:

Grupos controles: Las porciones de AH correspondientes a la región central y lateral de ratas macho se incubaron durante una hora en forma individual en medio de Earle adicionado o no con cicloheximida a una dosis de 50 µg/ml. El medio de incubación de cada porción de

tejido se recolectó cada media hora durante una hora, el cual fue reemplazado con la misma cantidad de medio fresco en el cambio.

**Grupos experimentales:** Se integraron dos grupos experimentales con las respectivas regiones AH de ratas macho, las cuales fueron incubadas en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas, a uno de los cuales se les adicionó cicloheximida a una dosis de 50 µg/ml.

### Experimento 3

Con el propósito de definir el perfil de secreción de PRL de las regiones de la AH de ratas macho incubadas en el medio condicionado de las ratas lactantes, se llevó a cabo la marca de la hormona, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro* mediante el empleo de leucina tritiada, de acuerdo al siguiente procedimiento.

**Marcaje *in vivo* de PRL con <sup>3</sup>H-leucina:**

La PRL AH de las ratas macho fue marcada *in vivo*, 10 minutos y 6 horas antes de sacrificar a los animales, mediante la administración IV, bajo anestesia ligera con éter, de <sup>3</sup>H-leucina (3 µg/Ci gr peso corporal, 45-60 Ci/mmol). Los grupos control se incubaron durante 4 horas en medio Earle. El medio de incubación de cada grupo se recolectó cada media hora durante las primeras dos horas y al finalizar el periodo de cuatro horas. Durante las primeras dos horas el medio fue reemplazado con la misma cantidad de medio fresco. Con relación a los grupos experimentales, éstos se incubaron de la manera antes descrita en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas. Después de la detección de la PRL total por

electroforesis en gel, las bandas de PRL fueron cortadas de la columna, colocadas en viales de centelleo y disueltas en 1.0 ml de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% a 50° C (Tishler y Epstein, 1968). Posteriormente se les adicionó líquido de centelleo y la hormona marcada fue contada mediante un espectrómetro de líquido de centelleo (Packard Tri-Carb 2660, Packard Instruments Co., Downers Grove, Il).

#### Marcaje *in vitro*.

Las regiones de la AH de ratas macho fueron incubadas en buffer Krebs-Ringer bicarbonato conteniendo 250 mCi/ml de <sup>3</sup>H-leucina, por 30 minutos a 37°C. Posteriormente, en el caso de los grupos control, éstos se incubaron en medio 199, mientras que los grupos experimentales se incubaron en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas disuelto en medio 199. Después de lavar con medio 199, se reemplazó el medio de incubación con medio fresco cada 30 minutos durante un tiempo total de incubación de 1 hora. En estos experimentos se determinó tanto la secreción de las <sup>3</sup>H-PRLs secretadas al medio de incubación, como la acumulada en el tejido de ambas regiones hipofisarias.

#### Análisis estadístico

Todos los datos son expresados como promedio  $\pm$  EE. La concentración de PRL en el medio de incubación se expresa en  $\mu$ g/mg de AH. Las diferencias entre las medias de los grupos son comparadas por análisis de varianza (ANOVA) de una vía y seguidos por una prueba de Tukey. Los valores de  $p < 0.05$  son considerados como estadísticamente significativos.

TESIS CON  
FALLA LE CUBREN

## **XI. RESULTADOS**

### **1.1 Experimentos en adenohipófisis de ratas lactantes**

*Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas sobre la secreción de PRL por adenohipófisis provenientes de ratas lactantes no succionadas y succionadas*

La incubación en medio condicionado obtenido de la región lateral de ratas no succionadas, inhibió la secreción de PRL por la propia región lateral de animales en la misma condición (ratas no succionadas), mientras que no tuvo efecto en el tejido de la misma región obtenido de ratas en una condición diferente (ratas succionadas).

En el caso de la región central incubada en el mismo tipo de medio, no se observó ningún efecto significativo, tanto en las regiones de los animales no succionados como de succionados (véase figura 15).

*Efecto de la incubación en medio condicionado de la región central de ratas no succionadas sobre la secreción de PRL por adenohipófisis provenientes de ratas no succionadas y succionadas*

Al emplear el medio condicionado de la región central de ratas no succionadas no se observaron efectos en la región lateral de ratas no succionadas aunque si ocurrió un incremento en la región central de animales en la misma condición.

En el caso de animales succionados se observó una disminución en la cantidad de PRL secretada por la región lateral, sin observarse ningún efecto en la región central en comparación al control (véase figura 16).

*Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas succionadas sobre la secreción de PRL por adenohipófisis provenientes de ratas no succionadas y succionadas*

Al utilizar el medio condicionado de la región lateral de ratas succionadas se obtuvo una menor secreción de PRL por la región lateral y un incremento por la región central de animales no succionados.

Por otra parte, se observó que la incubación en el mismo tipo de medio provocó un incremento en la secreción de la hormona tanto por la región lateral como por la central de animales succionados (véase figura 17).

*Efecto de la incubación en medio condicionado de la región central de ratas succionadas sobre la secreción de PRL por AH de ratas no succionadas y succionadas*

El medio condicionado de la región central de ratas succionadas no tuvo efecto en ninguna de las regiones de la AH en ratas lactantes no succionadas. En cambio, en animales succionados, el mismo tipo de medio provocó una disminución en la cantidad de PRL secretada por la región lateral y un incremento por la región central (véase figura 18).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

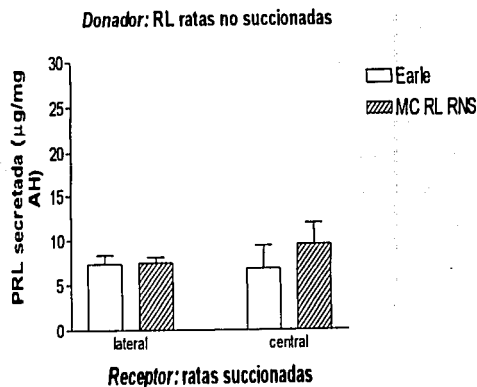
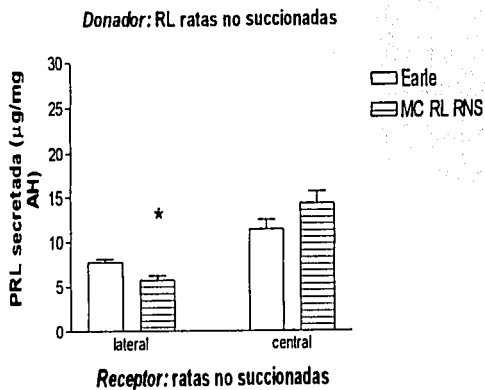


Fig. 15 Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas sobre la secreción de PRL por la AH de ratas lactantes no succionadas y succionadas. MC= medio condicionado RL = región lateral, RNS= ratas no succionadas (n = 5) (\*  $p < 0.05$  vs grupo control).

TESIS CON  
 FALLA DE ORIGEN



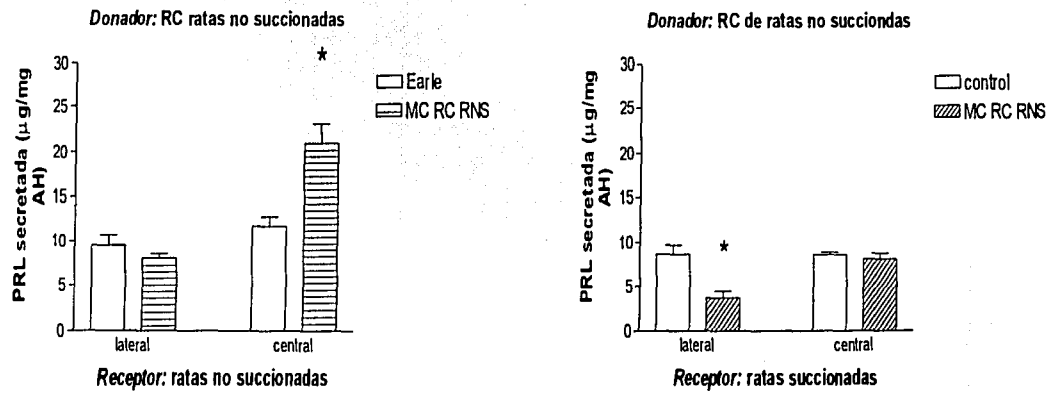


Fig. 16 Efecto de la incubación en medio condicionado de la región central de ratas no succionadas sobre la secreción de PRL por la AH de ratas lactantes no succionadas y succionadas (n= 5) (\* p< 0.05 vs grupo control).

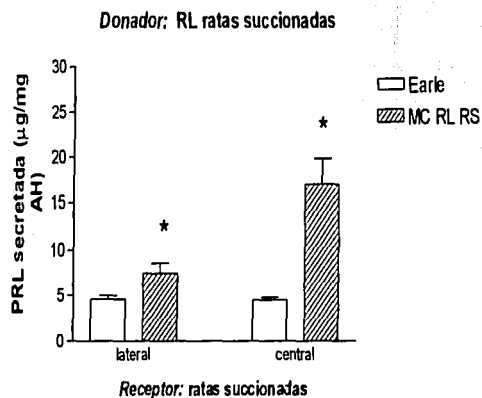
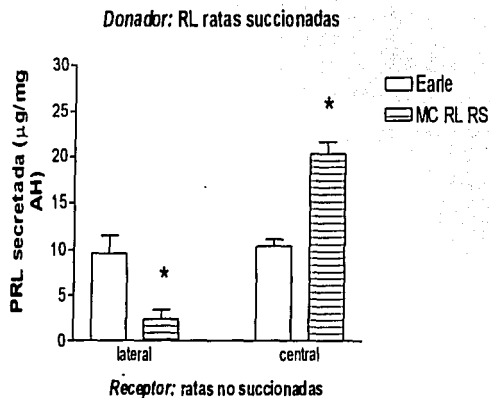


Fig. 17 Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas succionadas sobre la secreción de PRL por la AH de ratas lactantes no succionadas y succionadas.

MC= medio condicionado RL= región lateral, RNS=ratas succionadas (n = 5) (\*  $p < 0.05$  vs grupo control).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

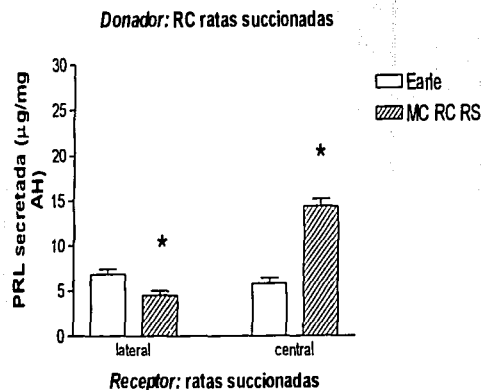
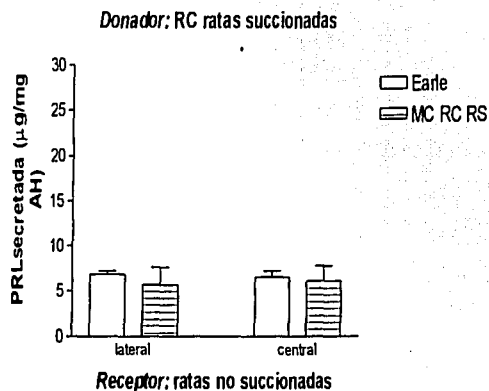


Fig. 18 Efecto de la incubación en medio condicionado de la región central de ratas succionadas sobre la secreción de PRL por la AH de ratas lactantes no succionadas y succionadas. MC = medio condicionado, RC= región central, RS= ratas succionadas (n = 5) (\* $p < 0.05$  vs control).

## 1.2 Experimentos en adenohipófisis de ratas macho

*Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas y succionadas sobre la secreción de PRL por adenohipófisis de ratas macho*

El medio condicionado de la región lateral de ratas tanto no succionadas como de succionadas provocó un incremento en la secreción de PRL por cada región de la AH de ratas macho, siendo aun mayor el incremento en la región central (véase figura 19).

*Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas macho sobre la secreción de PRL por AH de ratas lactantes no succionadas*

El medio condicionado de la región lateral de ratas macho, tanto al doble como al cuatro veces concentrado, no tuvo efecto en ninguna de las regiones de la AH de ratas no succionadas (véase figura 20).

*Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas macho sobre la secreción de PRL por AH de ratas macho*

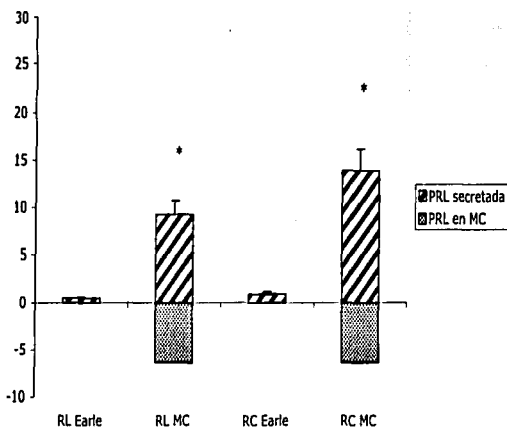
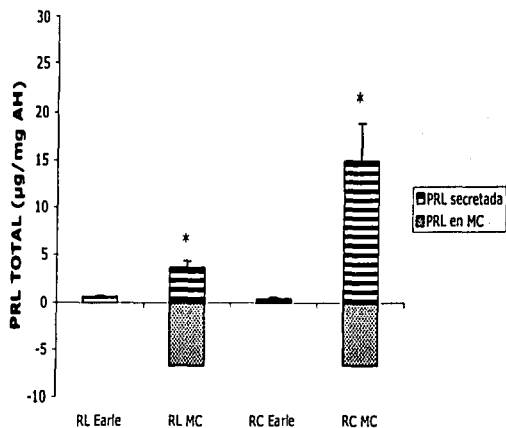
El medio condicionado de la región lateral de ratas macho no tuvo efecto en ninguna de las regiones de la AH de ratas macho (véase figura 21).

*Concentración de PRL en tejido de AH de ratas macho incubadas con medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas*

La concentración de PRL en la AH de ratas macho no cambió en comparación al control incubado en medio Earle o después de la incubación durante treinta minutos en medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas (véase figura 22).

**Donador: RL ratas no succionadas**

**Donador: RL ratas succionadas**



**Receptor: Ratas macho**

**Receptor: Ratas macho**

Fig. 19 Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas y succionadas sobre la secreción de PRL por la AH de ratas macho. En el eje de las ordenadas se muestra la cantidad de hormona contenida en el medio condicionado (parte inferior), la cual se sustrae de la cantidad de hormona secretada al medio (parte superior del eje). MC= medio condicionado, RL= región lateral, RC= región central (n=5) ( $p < 0.05$  vs grupo control).

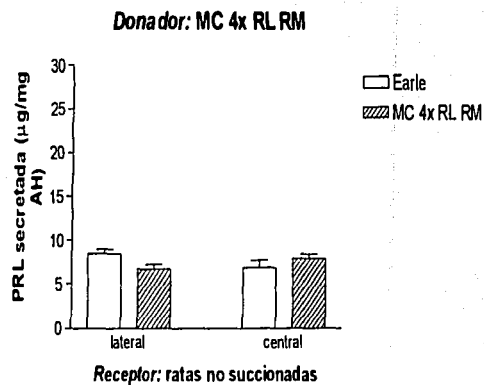
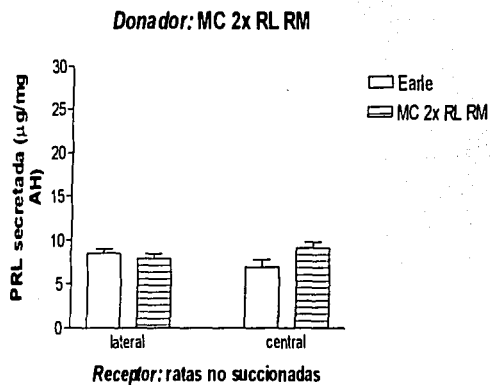


Fig. 20 Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral y de ratas macho sobre la secreción de PRL por la AH de ratas lactantes no succionadas. MC = medio condicionado, RL = región lateral, RM = ratas macho (n=5).

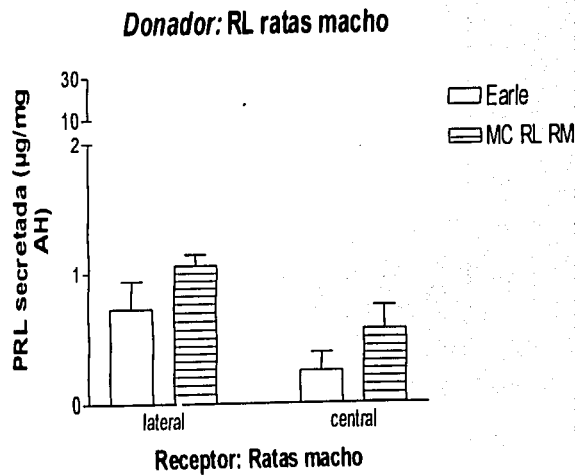


Fig.21 Efecto de la incubación en medio condicionado de la región lateral de ratas macho sobre la secreción de PRL por la AH de ratas macho. MC = medio condicionado, RL = región lateral, RM = ratas macho (n = 5).

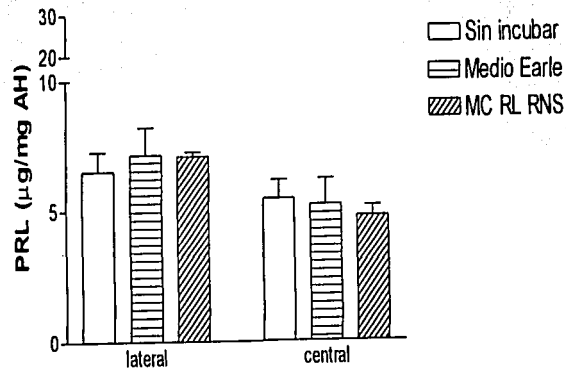


Fig. 22 Concentración de PRL en tejidos de ratas macho sin incubar y después de incubar en medio Earle y en medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas. MC = medio condicionado, RL = región lateral, RNS = ratas no succionadas (n = 5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



### Resumen de resultados del experimento I

A continuación se presenta el resumen de los datos obtenidos de las incubaciones con medio condicionado obtenido de la AH de ratas lactantes no succionadas o succionadas y macho, sobre la secreción de PRL AH de ratas en la misma condición fisiológica o diferente a la del animal de donde se haya obtenido el medio condicionado.

		Donador					
		Ratas no succionadas		Ratas succionadas		Ratas macho	
		RL	RC	RL	RC	RL	RC
Ratas no succionadas	RL	-	0	-	0	0	¿?
	RC	0	+	+	0	0	¿?
Ratas succionadas	RL	0	-	+	-	¿?	¿?
	RC	0	0	+	+	¿?	¿?
Ratas macho	RL	+	¿?	+	¿?	0	¿?
	RC	+	¿?	+	¿?	0	¿?

Simbología: RL = región lateral, RC = región central, + = efecto estimulador, - = efecto inhibitor, 0 = no efecto, ¿? = no se realizó el grupo experimental.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Cuando se consideran los efectos en las ratas lactantes, se observa que el medio condicionado proveniente de la AH de ratas lactantes succionadas tuvo un mayor número de efectos estimuladores en comparación al medio proveniente de la AH de las ratas lactantes no succionadas, esto es, cuatro efectos del medio condicionado de la AH de ratas lactantes fueron estimuladores y dos inhibidores, mientras que un efecto del medio condicionado de la AH de ratas lactantes no succionadas fue estimulador y dos inhibidores. Además, no hubo efecto en cinco condiciones de ratas no succionadas y dos de las ratas succionadas.

Por otra parte, cabe señalar el hecho de que la secreción de PRL de ratas macho fue incrementada en respuesta a la incubación con el medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas o succionadas, mientras que la incubación de las regiones de la AH de ratas macho y de ratas lactantes no succionadas en el medio condicionado de la región lateral de ratas macho no tuvo efecto, esto sugiere que la AH de ratas macho es capaz de responder a los efectos estimuladores en el medio condicionado de las ratas lactantes, mientras que el medio de ratas macho no tiene la capacidad de influir en la secreción de PRL. AH de ratas lactantes no succionadas o macho.

## Experimento II

*Efecto de añadir cicloheximida al medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas, sobre la secreción de PRL por AH de ratas macho*

Al incubar las regiones AH de ratas macho en medio condicionado proveniente de la región lateral de ratas lactantes no succionadas, adicionado o no con cicloheximida, se observó que el incremento en la concentración de PRL liberada al medio de incubación por ambas regiones de la AH de ratas macho, no se modificó por la presencia de cicloheximida (véase figura 23 a). Asimismo, con relación a la cantidad de hormona presente en los tejidos de las ratas macho, no hubo tampoco diferencias significativas entre los grupos (véase figura 23 b).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

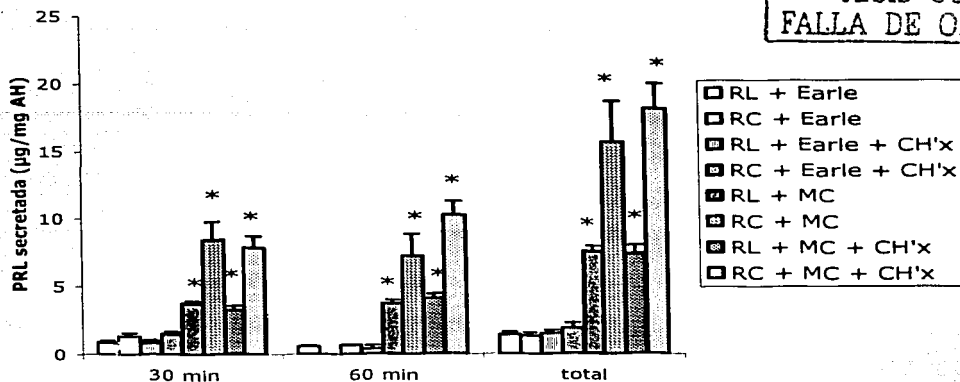


Figura 23 a. Efecto de la incubación en medio Earle sin o con cicloheximida (CH'x), medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes succionadas (MC) y MC adicionado con cicloheximida (50 µg/ml) (MC + CH'x) sobre la secreción de PRL por la AH de ratas macho durante un periodo de una hora. RL= región lateral, RC= región central (n = 5) (\* p < 0.05 vs grupo control).

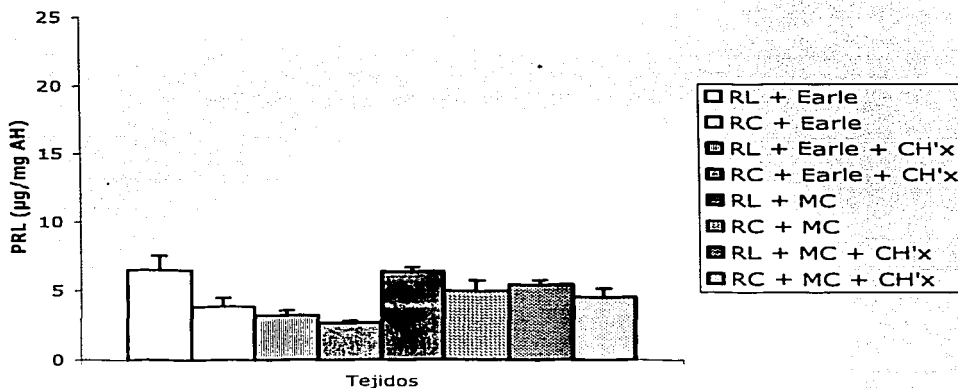


Figura 23 b. Efecto de la incubación en medio Earle sin o con cicloheximida (CH'x), medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes succionadas (MC) y MC adicionado con cicloheximida (50 µg/ml) (MC + CH'x) sobre la cantidad de PRL en tejidos de AH de ratas macho durante un periodo de una hora. RL= región lateral, RC= región central (n = 5).

### **Experimento III**

*Perfil de secreción de PRL AH total y [<sup>3</sup>H]-PRL de ratas macho incubadas en el medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas*

#### **Marca *in vivo***

Al incubar el tejido de ratas macho en el medio Earle se muestra (véase figs. 24 a y 25 a) que ambas regiones de la AH secretan la hormona total al medio de incubación solamente durante 60-90 minutos. Sin embargo, al incubar en el medio condicionado se observa que ambas regiones incrementan significativamente su secreción durante las 4 horas del experimento, siendo mayor la cantidad de PRL secretada por la región central que por la región lateral.

Por otra parte, con relación a la [<sup>3</sup>H]-PRL marcada 10 minutos, i.e., hormona recién sintetizada, o 6 horas antes de la incubación, i.e., hormona madura, se observó que la PRL recién sintetizada comienza a ser liberada desde los primeros 30 minutos de incubación y mantiene su nivel de secreción durante todo el experimento (fig. 24 b). Sin embargo, cuantitativamente este perfil de secreción se observa tanto para el grupo incubado con el medio Earle como el incubado con medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas. Por lo que respecta a la hormona marcada 6 horas antes (fig. 25 b), el grupo control comienza a secretar dicha hormona en una mayor proporción durante la primera media hora de incubación que la observada para la hormona recién sintetizada, para posteriormente liberarla en una menor cantidad. Por otra parte, en los grupos incubados con el medio condicionado, la <sup>3</sup>H-PRL también es detectada durante los primeros 30 minutos en una baja cantidad y mantiene estos niveles durante todo el experimento. Sin embargo, es

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

importante mencionar que las diferencias entre los grupos no fueron estadísticamente significativos.

Finalmente, con relación a la actividad específica tanto de la hormona recién sintetizada (fig. 24 c), como de la hormona madura (fig. 25 c) se observó que excepto en el caso de los grupos incubados con medio Earle, durante los primeros 30 minutos de incubación, la hormona marcada 6 horas antes mostró una alta actividad específica, para después decaer rápidamente.

Sin embargo, cabe señalar que a pesar de la gran diferencia entre la hormona total secretada entre los grupos controles y experimentales, al observar los perfiles de secreción de las [<sup>3</sup>H]-PRLs de diferentes edades no existe ninguna correlación entre la hormona total y la marcada, en el caso de los grupos incubados con medio condicionado de ratas no succionadas.

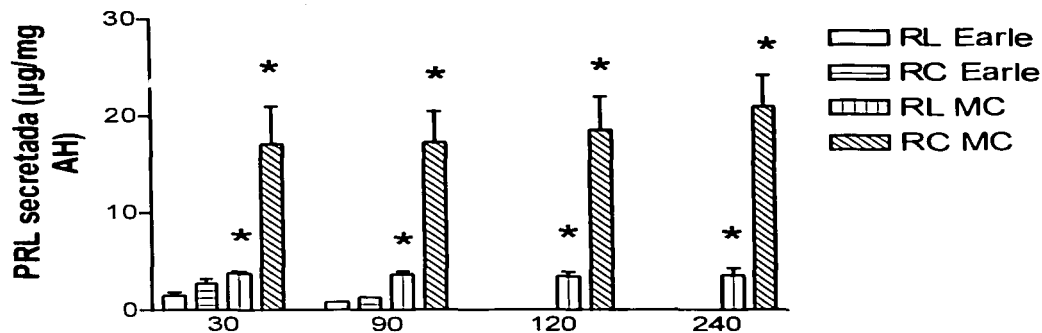


Fig. 24 a. Secreción de PRL total por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes no succionadas (MC).  $^3\text{H}$ - leucina fue administrada intravenosamente 10 minutos antes de sacrificar a la rata (n=5) (\* p < 0.05 vs grupo control).

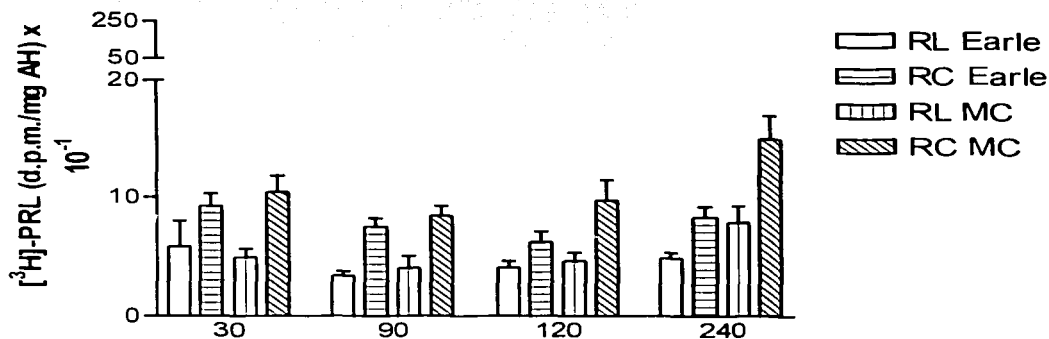


Fig. 24 b. Secreción de  $^3\text{H}$ - PRL por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes no succionadas (MC).  $^3\text{H}$ - leucina fue administrada intravenosamente 10 minutos antes de sacrificar a la rata (n=5).

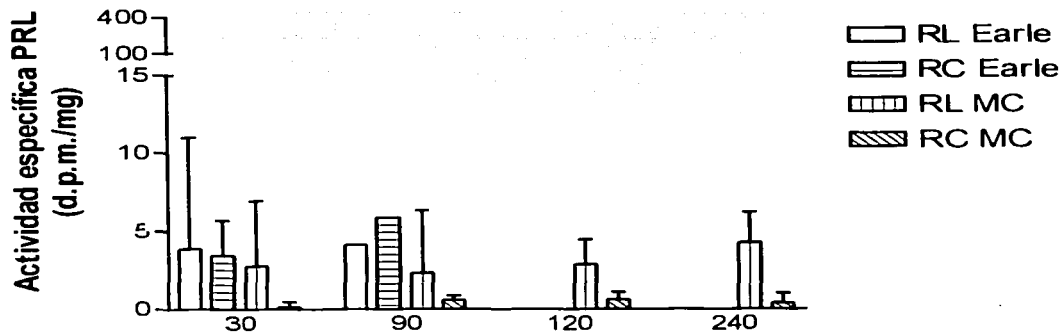


Fig. 24 c Actividad específica (d.p.m./ $\mu$ g) de  $^3\text{H}$ -PRL secretada por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de la AH de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes no succionadas (MC).  $^3\text{H}$ -leucina fue administrada intravenosamente 10 minutos antes de sacrificar a la rata (n=5).



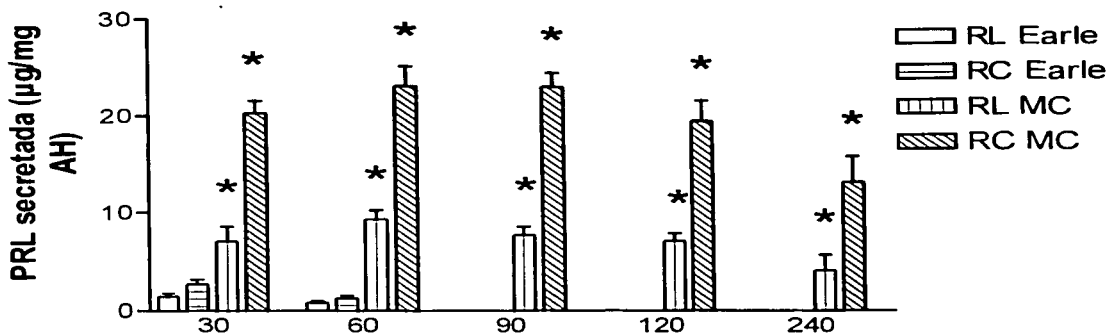


Fig. 25 a. Secreción de PRL total por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes no succionadas (MC).  $^3\text{H}$ - leucina fue administrada intravenosamente 6 horas antes de sacrificar a la rata (n=5) (\* p < 0.05 vs grupo control)

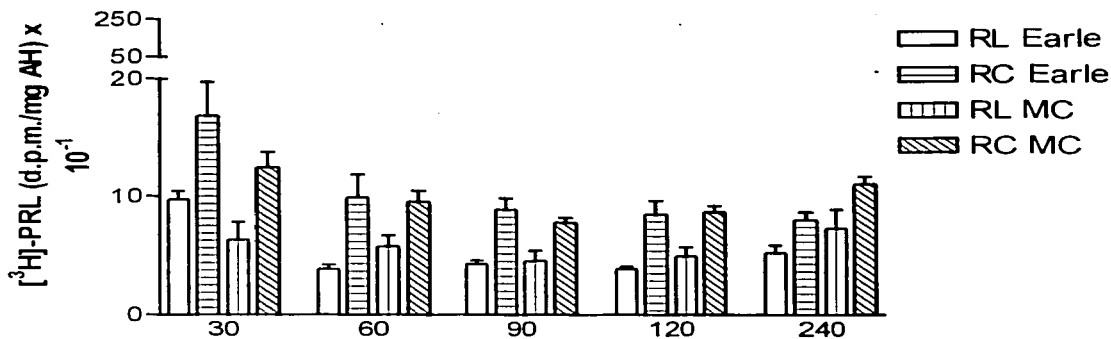


Fig. 25 b. Secreción de  $^3\text{H}$ -PRL por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes no succionadas (MC).  $^3\text{H}$ - leucina fue administrada intravenosamente 6 horas antes de sacrificar a la rata (n=5).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

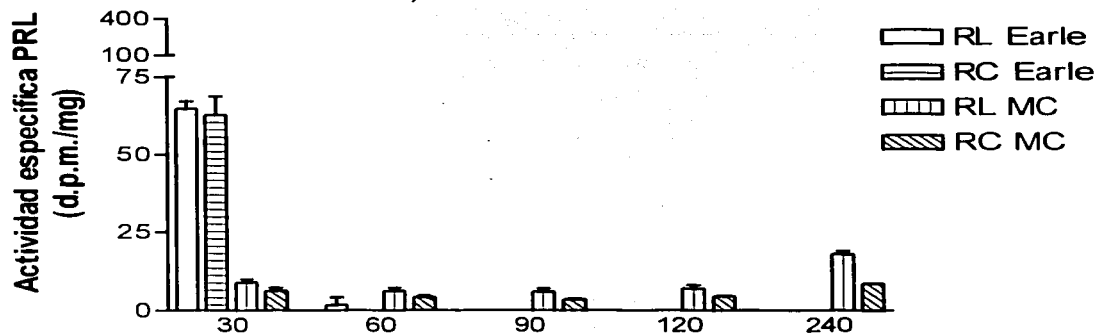


Fig. 25 c. Actividad específica (d.p.m./ $\mu$ g) de  $^3\text{H}$ -PRL secretada por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes no succionadas (MC).  $^3\text{H}$ -leucina fue administrada intravenosamente 6 horas antes de sacrificar a la rata (n=5).

### Marca *in vitro*

Al igual que con los experimentos con la  $^3\text{H}$ -leucina administrada *in vivo*, la cantidad de hormona total secretada por los grupos incubados en medio Earle, solamente ocurrió durante los primeros 30 minutos de la incubación, mientras que los grupos incubados con el medio condicionado de ratas no succionadas secretaron una mayor cantidad de hormona y esta secreción incrementada se mantuvo durante todo el tiempo de incubación (véase fig. 26 a).

Por otra parte, después de los primeros 30 minutos de incubar con [ $^3\text{H}$ ]-leucina, (fig. 26 b) se observó que la PRL marcada fue secretada al medio de incubación desde los primeros 30 minutos y mantuvo niveles constantes durante todo el experimento, sin que se manifestara diferencia significativa entre los grupos control y los experimentales.

Finalmente la actividad específica de la PRL liberada al medio en los grupos incubados con medio Earle no varió significativamente desde el inicio del pulso hasta los 30 minutos, para finalmente no ser detectada; en cambio en los grupos incubados con el medio condicionado de ratas lactantes no succionadas, la actividad específica mantuvo un nivel bajo durante todo el experimento (fig. 26 c).

Estos patrones de secreción de la actividad específica de los grupos incubados en medio condicionado de ratas lactantes, tanto de la marca *in vivo* como *in vitro*, sugieren la existencia de una dinámica de secreción diferente a la descrita en ratas lactantes (Mena et al 1984, Mena et al 1989), tal vez por una vía constitutiva o semi-constitutiva (Chen et al 1989, Larson y Wise, 1994). Sin embargo, es necesario enfatizar que el efecto estimulante del MC proveniente de ratas lactantes sobre las regiones AH de la rata macho se manifestó principalmente sobre la secreción de la hormona total, vgr., no marcada y muy escasamente

sobre la hormona madura y sobre la recién sintetizada. Así mismo, el hecho de que tanto el contenido de hormona total y de hormona marcada en el tejido (figura 26 d) no se modificaran en comparación a los grupos control, después de la incubación en el MC de ratas lactantes, sugiere, no obstante la ausencia de efecto de la cicloheximida (figuras 23 a y b), que a través de un mecanismo aun no conocido, bajo la influencia del MC de ratas lactantes, se lleva a cabo un acoplamiento de la síntesis y liberación de la PRL hacia el medio de incubación, por la AH de ratas macho. (Véase la sección de DISCUSION de la presente tesis, para mayores comentarios sobre estos efectos).

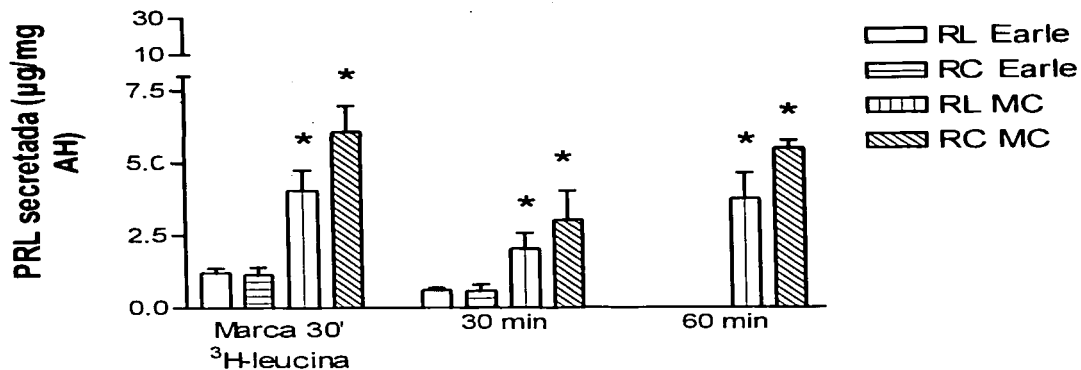


Fig. 26 a. Secreción de PRL total por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes succionadas (MC). Se dio un pulso de  $^3\text{H}$ -leucina durante 30 minutos ( $n=5$ ) (\*  $p < 0.05$  vs grupo control).

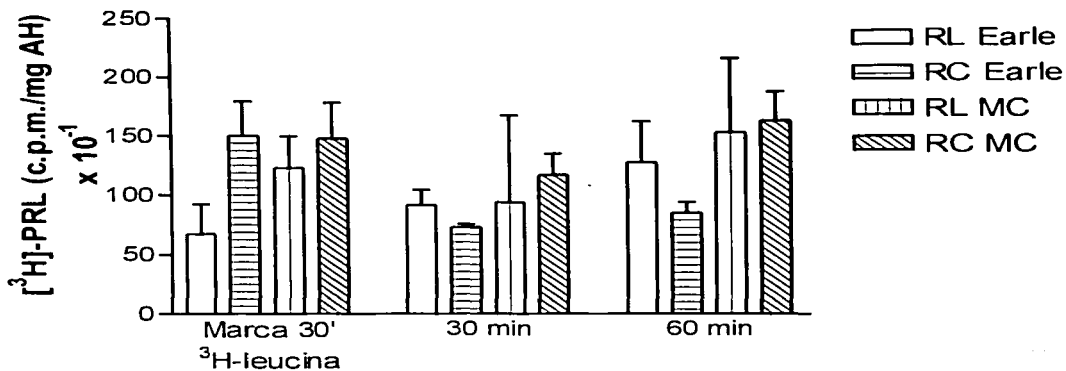


Fig. 26 a. Secreción de  $^3\text{H}$ -PRL por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes succionadas (MC). Se dio un pulso de  $^3\text{H}$ -leucina durante 30 minutos ( $n=5$ ).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

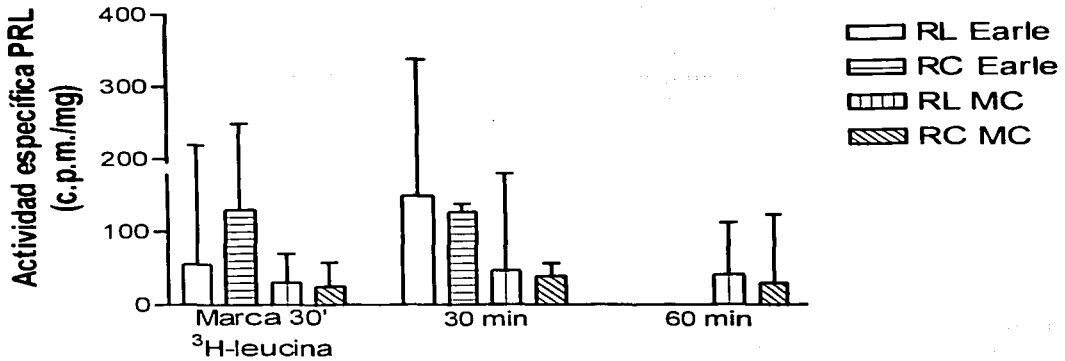


Fig. 26 c. Actividad específica (c.p.m./ $\mu$ g) de  $^3\text{H}$ -PRL secretada por parte de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho incubadas en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes succionadas (MC). Se dio un pulso de  $^3\text{H}$ -leucina durante 30 minutos (n=5).

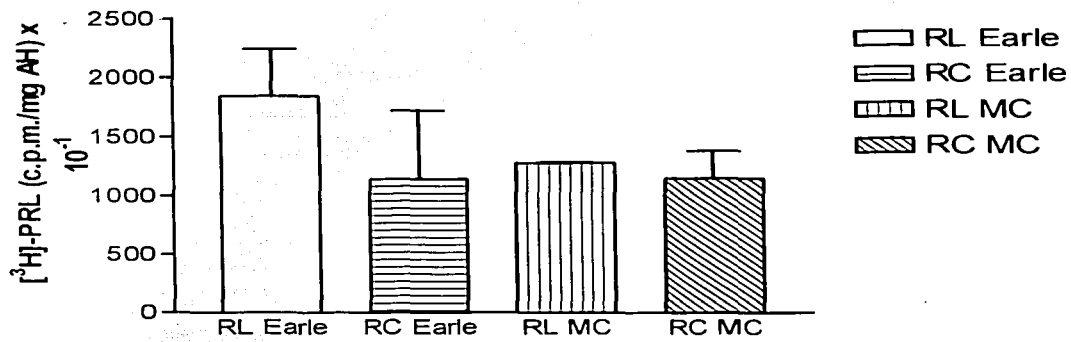


Fig. 26 d. Concentración de  $^3\text{H}$ -PRL en tejidos de adenohipófisis de la región lateral (RL) y central (RC) de ratas macho después de ser incubados en medio Earle y en medio condicionado de la RL de ratas lactantes succionadas (MC).

## XII. DISCUSION

Desde hace tiempo se ha considerado que la secreción de hormonas por la AH es regulada por los péptidos y aminos biogénicas, conocidas como hormonas estimuladoras e inhibitoras, que son liberadas por el hipotálamo hacia el sistema porta-hipofisiario y por las hormonas circulantes que son liberadas por las gónadas, las glándulas suprarrenales o la tiroides (revisión en Lamberts y Macleod 1990, Freeman et al 2000). Así mismo, estudios recientes han aportado evidencias que muestran la existencia de mecanismos autócrinos y parácrinos que también participan en la regulación funcional de la hipófisis. Esta regulación local se ejerce en varios niveles, i.e., algunos factores regulan las acciones de las hormonas hipotalámicas o periféricas sobre la hipófisis y algunos otros ejercen un control tónico en la liberación basal de las hormonas pituitarias. Además, se han descrito factores autócrinos y/o parácrinos que participan en el desarrollo de los distintos tipos celulares de la AH (revisión en Deneff 1990, Schwartz y Cherny 1992, Schwartz 2000). Por otra parte, dado que la mayor parte de estas evidencias fueron observadas *in vitro*, esta aún por conocerse el papel fisiológico que, en un contexto integral, puedan tener dichas influencias.

Considerando estos antecedentes, así como el hecho de que existen diferencias regionales, estructurales y funcionales en la AH (revisión en Takahashi, 1995), el propósito de la presente tesis fue el de investigar si influencias o factores de origen zonal o regional podrían influir o regular la secreción de PRL por las diferentes regiones adenohipofisiarias de la rata lactante. Para este fin, se llevaron a cabo experimentos en los que se emplearon medios condicionados obtenidos mediante la incubación individual de cada región de la AH de ratas

lactantes en diferentes condiciones fisiológicas, i.e., no succionadas y succionadas, y se determinaron sus efectos sobre la secreción de PRL en las mismas regiones hipofisarias, también de ratas lactantes, no succionadas o succionadas; así como en regiones hipofisarias de ratas macho.

Los resultados obtenidos muestran que el medio condicionado de la región lateral de la AH de ratas lactantes no succionadas, solo tuvo efecto en tejidos de ratas en la misma condición, provocando una disminución en la secreción de PRL al medio de incubación. En cambio, el medio proveniente de la región central de ratas lactantes no succionadas, produjo aumento en la secreción de PRL por parte de la región central de ratas no succionadas, pero cuando se probó el mismo medio en tejido de ratas succionadas, se observó un efecto inhibitorio sobre la región central (véase fig.27 a).

Al utilizar el medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes succionadas en ratas no succionadas ocurrió una inhibición en la liberación de PRL por parte de la región lateral y una estimulación por la región central. Sin embargo, cuando se probó el mismo medio en la AH de ratas de la misma condición fisiológica, se obtuvo un incremento en la secreción de PRL en ambas regiones (véase fig. 27 c).

Finalmente, al emplear el medio condicionado de la región central de ratas lactantes succionadas, solamente se observaron efectos en animales succionados, i.e., una disminución en la cantidad de hormona secretada por la región lateral y un aumento por parte de la región central (véase fig. 27 d).



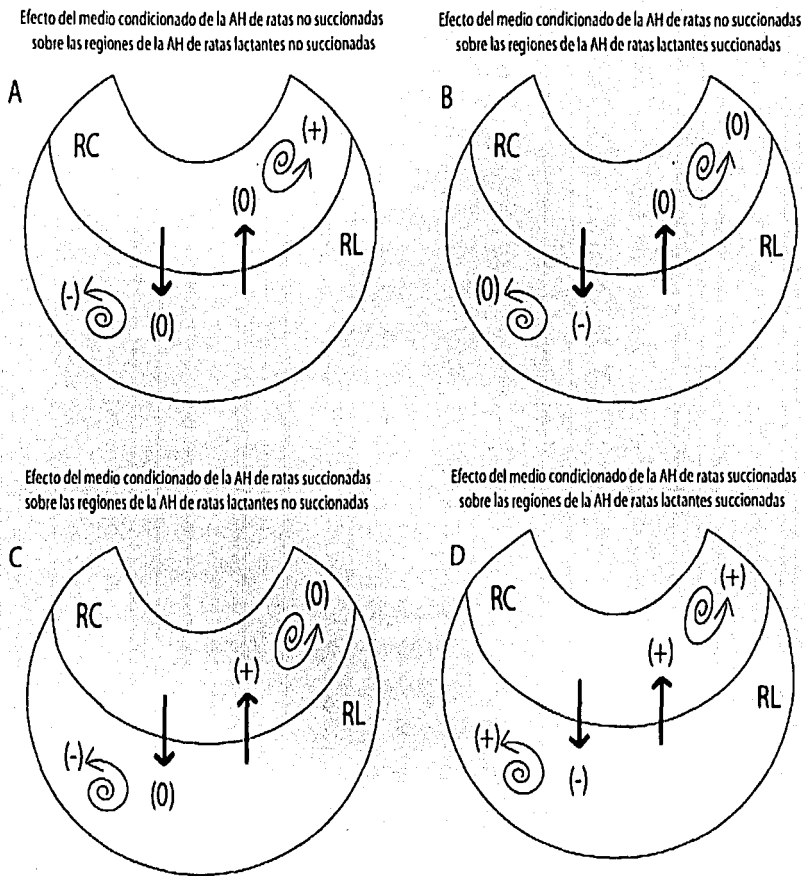


Figura 27. Representación esquemática de los datos obtenidos, mostrando los efectos del medio condicionado de la región central (RC) y lateral (RL) de la AH de ratas lactantes no succionadas por 6 horas o succionadas por 15 minutos sobre la secreción de PRL AH de ratas en la misma condición fisiológica o diferente. Las flechas indican el origen y el sitio de acción del medio condicionado, (+), (-) y (0) indican efectos estimuladores, inhibidores o sin efecto respectivamente.

A partir de estos resultados se puede considerar la existencia de influencias regionales en las regiones respectivas lateral y central de la AH de ratas lactantes, capaces de regular la secreción de PRL de acuerdo a la situación fisiológica del donador y del receptor. De particular interés, resultó el hecho de que el medio condicionado de la región central de ratas lactantes no succionadas provocara una estimulación de la secreción de PRL sobre la propia región central, mientras que el medio condicionado de la región lateral de ratas no succionadas tuvo un efecto inhibitorio sobre la secreción de PRL de la región lateral. De esta forma, cabe la posibilidad de que dichas influencias den lugar al fenómeno de regionalización de la secreción de PRL en la AH de ratas lactantes no succionadas, en el que la región central secreta una mayor cantidad de hormona que la región lateral (Mena et al, 1993).

Asimismo, los resultados sugieren que la succión es capaz de activar la producción de factores en ambas regiones de la AH ya que los medios provenientes de la región lateral y central de animales succionados provocaron efectos sobre ambas zonas de la AH, mientras que el medio de animales no succionados sólo afectó a una de las regiones (véase figura 27).

Por otra parte, se investigó si este tipo de factores se encuentran exclusivamente en ratas lactantes o en animales en distinta condición fisiológica. Así, se observó que los medios condicionados provenientes de la región lateral de ratas lactantes no succionadas o succionadas provocaron un incremento en la secreción de PRL en ambas regiones de la AH de ratas macho. En cambio, al utilizar como donador el medio condicionado de la región lateral de ratas macho tanto en tejidos de ratas lactantes no succionadas como de macho, no se observó efecto alguno. Esto sugiere que los tejidos de ratas macho poseen la capacidad de

responder a acciones estimuladoras, presentes en los incubados de las AHs de ratas lactantes no succionadas. Sin embargo, las AH de ratas macho no tienen la capacidad de producir factores regionales que influyan sobre la secreción de PRL de ratas lactantes no succionadas o macho.

Hasta la fecha no se conoce la naturaleza bioquímica de el (los) factor (es) que podrían estar participando en este tipo de regulación regional. Sin embargo, en la literatura se ha descrito un gran número de sustancias que pueden influir sobre el funcionamiento de lactotropos en cultivo, a través de mecanismos autócrinos y/o parácrinos. La acción de varios de estos péptidos requieren la presencia de hormonas tales como glucocorticoides, estrógenos y hormonas tiroideas.

Algunos de estos factores u hormonas y su efecto en la regulación de PRL se enlistan a continuación:

Grupo de investigación	Factor u hormona	Efecto
Denef y Andries 1983	GnrH	Estimulación
Hagen et al 1986	VIP	Inhibición
Kanycska et al 1998	Endotelina	Estimulación
Cai et al 1998	Galanina	Inhibición
Balsa et al 1998	Serotonina	Estimulación
Wynick et al 1998	Galanina	Inhibición

En relación a los resultados obtenidos en el presente trabajo, es importante señalar que los péptidos antes mencionados tienen un peso molecular por debajo de los 10 kD y que el filtro utilizado para la concentración del medio condicionado tiene como límite los 10 kD. Esto sugiere que los efectos observados no fueron debidos a dichos péptidos, sino a factores de mayor peso molecular.

Por otra parte, para determinar el origen de la gran cantidad de hormona secretada por las AHs de ratas macho bajo la influencia del medio condicionado de ratas lactantes, i.e., sintetizada de novo o previamente almacenada, se analizó en paralelo el contenido de hormona presente en las AHs. Así, los resultados mostraron que el contenido glandular de PRL en las AHs post-incubadas de ratas macho, que en condiciones normales es muy bajo, no sufrió ningún cambio en comparación a los niveles observados antes de la incubación. Esto sugiere, que el o los factores contenidos en el MC de ratas lactantes provocan un acoplamiento de la síntesis y la secreción rápida de la hormona, la cual también implicaría la liberación de la PRL a través de una vía constitutiva o semi-constitutiva.

Como una primera aproximación para determinar si la PRL secretada por parte de los tejidos de ratas macho en medio condicionado de ratas lactantes, provenía de la síntesis *de novo* de la hormona, se realizó el experimento de incubar las AH's de ratas macho en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas adicionado con el inhibidor de la síntesis de proteína cicloheximida. Los grupos controles, los cuales no tenían medio condicionado, mantuvieron una cantidad baja de PRL secretada al medio de

incubación durante todo el experimento. En cambio los grupos con medio condicionado adicionado con cicloheximida mostraron una cantidad alta de hormona secretada al medio de incubación que no fue diferente a la secretada por el grupo control incubado con medio condicionado sin cicloheximida. Estos resultados, si bien sugieren que el medio condicionado producido por la región lateral de ratas lactantes no succionadas provocó la secreción de PRL por parte de la AH de ratas macho por una vía diferente a la descrita en la literatura para las ratas lactantes, no fue suficiente para indicarnos el origen de la hormona secretada bajo la acción del medio condicionado.

Por otra parte, estos resultados son consistentes con estudios previos en los que se ha mostrado que la transcripción del gen de PRL en el núcleo de los lactotropos de ratas macho, es estimulada por el  $17\beta$ -estradiol, a través de un mecanismo que no requiere la síntesis de nueva proteína (Shull y Gorski, 1984). De esta manera, la administración de una inyección intraperitoneal de  $17\beta$ -estradiol produjo un incremento en la transcripción de PRL 30 minutos después de ser aplicada la hormona, y se mantuvo elevada hasta 72 horas después. Además, la adición de cicloheximida no bloqueaba el efecto estimulador durante un periodo de tres horas (Shull y Gorski, 1984). Así, estos autores proponen que las rutas de secreción constitutiva y regulada no son mutuamente exclusivas para estos tipos de células. Asimismo, mediante el empleo de inmunoensayos de placa, Chen y colaboradores (1989) examinaron la liberación basal de GH y PRL por parte de células individuales previamente tratadas con inhibidores de la síntesis de proteínas. Los resultados mostraron una disminución en la liberación basal de PRL solamente en la mitad de los lactotropos, ya que el

resto de las células continuaron secretando hormona a través de una vía constitutiva.

Además, se observó que la adición de TRH al medio estimuló la secreción en aquellos lactotrofos que no mostraban liberación hormonal en condiciones basales. Finalmente, Larson y Wise (1994) también mostraron en ratas tratadas con estrógenos, que existe una relación directa entre la cantidad de PRL liberada por un solo lactotrofo y el nivel de RNAm de PRL en la misma célula, y que además, la secreción de PRL inducida por estradiol no es inhibida mediante la administración de bloqueadores de canales de calcio. Estos datos indican que el estradiol aumenta la proporción de hormona que es liberada a través de una vía constitutiva.

Para apoyar esta hipótesis, se analizó el perfil de secreción de PRL por parte de la AH de ratas macho incubadas en el medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas. Los resultados mostraron que en el grupo control, las hormonas marcadas *in vivo* 10 minutos o 6 horas o antes e *in vitro* comienzan a ser liberadas con un perfil de secreción semejante al descrito en las ratas lactantes. En cambio, en las AH de ratas macho incubadas en el medio condicionado de ratas lactantes, la secreción de ambas hormonas se manifestó desde el principio de la incubación y se mantuvo durante las 4 horas. Estos resultados sugieren que bajo la acción del medio condicionado, sucede un acoplamiento entre la síntesis y la liberación de la hormona por la AH del macho y que la liberación rápida que se observa puede ser de tipo constitutivo o semi-constitutivo, es decir, no sólo a través de gránulos sino mediante vesículas, en donde la hormona se encontraría en forma soluble.

Este perfil de secreción contrasta claramente con la vía regulada de la secreción de PRL observada en las ratas lactantes. Estudios *in vivo* sobre la dinámica secretora de las PRLs de diversas edades (marcadas con  $^3\text{H}$ -leucina, 10 minutos a 24 horas antes de la incubación de la AH) muestran la existencia de un patrón de secreción secuencial de las PRLs de diferentes edades. De esta manera, las PRLs de 10 minutos, 1 y 16-24 horas son secretadas con una dinámica diferente y en menor proporción que la PRLs de 4-8 horas de edad. Al considerar en conjunto los períodos de dicha actividad alta de cada PRL se puede calcular que la duración de este periodo es de 6-8 horas. Este periodo de secreción máxima es precedido por un periodo de 2 horas durante el cual la actividad específica de la PRL aumenta gradualmente y es seguido por un periodo de alrededor de 16 horas durante el cual, la hormona solamente muestra una actividad específica baja (Mena et al 1984, Mena et al 1989).

Por otra parte, con relación a la posibilidad de que los efectos observados fuesen debidos a que la hormona contenida en el MC hubiese sido captada por las regiones AH del macho y posteriormente hubiese sido secretada, esta posibilidad es poco probable ya que la cantidad de hormona en dicho medio fue siempre restada de la cantidad total de PRL presente en el medio después de la incubación en los MC (véase la sección de MATERIAL Y METODOS de la presente tesis y la figura 19). Así mismo, como fue reportado por Kadowaki, et al, 1984, en células provenientes de la AH de ratas, incubadas en medio adicionado con PRL a diferentes concentraciones, se observó no una estimulación sino una inhibición en la secreción de PRL, la cual era proporcional a la cantidad de la hormona en el medio así como el tiempo de duración de la incubación.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En resumen, estos resultados sugieren la funcionalidad de una vía adicional a la regulada, vgr., constitutiva en la secreción de PRL. Sin embargo su significado funcional *in vivo* no ha sido del todo establecido.

En conclusión, es ampliamente aceptado que la heterogeneidad celular es una función relevante de las células endócrinas. Además, el concepto original de heterogeneidad sigue evolucionando y expandiéndose al incluir aspectos dinámicos y complejos de la función celular endocrina. Estos han cambiado nuestra perspectiva estática de la concepción de la heterogeneidad clásica hacia un proceso más dinámico que podría ser llamado plasticidad secretoria, el cual podría ser definido como una característica de las células endócrinas para cambiar drásticamente sus respuestas en la síntesis y secreción de acuerdo a las demandas fisiológicas del animal, a través de transformaciones funcionales a múltiples niveles, tanto celular como molecular.



### XIII. CONCLUSIONES

1. Los resultados obtenidos con medios condicionados de la adenohipófisis de ratas lactantes sugieren la existencia de factores que regulan la secreción de prolactina y que sus efectos dependen de la condición fisiológica del animal tanto donador como receptor.
2. La aplicación del medio condicionado de la región central de ratas lactantes no succionadas aplicado en la misma región provocó un incremento en su secreción, mientras que el medio condicionado de la región lateral tuvo un efecto inhibitorio sobre sí misma. Esto sugiere que la regionalización de la secreción basal pudiera estar regulada por tales influencias.
3. Las adenohipófisis de ratas macho responden a factores estimuladores del medio condicionado proveniente de ratas lactantes, pero no producen dichos factores.
4. La adenohipófisis de ratas machos incubadas en medio condicionado proveniente de ratas lactantes, la hormona no se acumula, sino es sintetizada y liberada de una forma rápida.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

5. El perfil de secreción de las adenohipófisis de ratas macho incubadas en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes no succionadas, es distinto al descrito en ratas lactantes, caracterizado por la liberación preferencial de prolactina madura empaquetada en gránulos de secreción. Estos datos mediante el marcaje isotópico de la hormona apoyan que la secreción de la hormona en el macho estimulada por el medio condicionado es a través de una vía rápida de tipo constitutivo.
  
6. Estos resultados y los obtenidos previamente apoyan la hipótesis de que existen factores regionales capaces de regular la síntesis y secreción de prolactina.

#### **XIV. BIBLIOGRAFIA**

1. Aanestad M, Rotnes JS, Torjesen PA, Haug E, San O, Bjoro T 1993 Epidermal growth factor stimulates the prolactin synthesis and secretion in rat pituitary cells in culture (GH4c1) cells by increasing the intracellular concentration of free calcium. *Acta Endocrinologica (Copenhagen)*, 128: 361-366.
2. Abraham EJ, Villalobos C, Frawley LS 1998a Effects of cellular interactions on calcium dynamics in prolactin-secreting cells. *Endocrinology*, 139: 2988-2993.
3. Abraham EJ, Faught WJ, Frawley LS 1998b Transforming growth factor 1 is a paracrine inhibitor of prolactin gene expression. *Endocrinology*, 139: 5174-5181.
4. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P 2002a Intracellular compartments and protein sorting. In: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, USA, pp 711-766.
5. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P 2002b Intracellular vesicular traffic. In: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science, USA, pp 711-766.
6. Ali S, Pellegrini I, Kelly PA 1991 A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) express a mutant form of prolactin receptor. *Journal of Biology and Biochemistry*, 266: 20110-20117.
7. Andries M, Tilemans D, Denef C 1992 Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochemical Journal*, 281: 393-400.
8. Aramburo C, Montiel JL, Proudman JA, Bergham LR, Scanes CG 1992 Phosphorilation of prolactin and growth hormone. *Journal of Molecular and Endocrinology*, 8: 183-191.
9. Arimura A, Dunn JD, Schally AV 1972 Effect of infusion of hypothalamic extracts on serum prolactin levels in rats treated with nembutal, CNS depressant or bearing hypothalamic lesions. *Endocrinology*, 90: 378-383.
10. Armstrong WE 1995 Hypothalamic Supraoptic and Paraventricular Nuclei. In: Paxinos G Ed. *The Rat Nervous System*. Academic Press, USA, pp 377-390.
11. Arvan P, Castle D 1998 Sorting and storage during secretory granule biogenesis: looking forward and looking backward. *Biochemical Journal*, 332: 593-610.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

12. Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS 1993 Mass spectrometric analysis of the fragments produced by the cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology*, 133: 935-938.
13. Balsa JA, Sánchez-Franco F, Pazos F, Lara JJ, Lorenzo MJ, Maldonado G, Caciado L 1998 Direct action of serotonin on prolactin, growth hormone, corticotropin and luteinizing hormone release in cocultures of anterior and posterior pituitary lobes: autocrine and/or paracrine action of vasoactive intestinal peptide. *Neuroendocrinology*, 68: 326-333.
14. Bazan JF 1990a Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunology Today*, 11: 350-354.
15. Bazan JF 1990b Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceeding of the National Academic of Science USA*, 87: 6934-6938.
16. Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW 1996 Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, 17: 639-669.
17. Ben-Jonathan N, Hnasko R 2001 Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews*, 22: 724-763.
18. Berczi I, Chow DA, Sabbadini ER 1998 Neuroimmunoregulation and natural immunity. *Domestic Animal Endocrinology*, 15: 273-281.
19. Bern HA, Nicoll CS 1968 The comparative endocrinology of prolactin. *Recent Progress in Hormone Research*, 24: 681-720.
20. Bern HA 1975 Prolactin and osmoregulation. *American Zoologist*, 15: 937-948.
21. Berwaer M, Martial JA, Davis JR 1994 Characterization of an up-stream promoter directing extrapituitary expression of the human prolactin gene. *Molecular Endocrinology*, 8: 635-642.
22. Beznoussenko GV, Mironov AA 2002 Models of intracellular transport and evolution of the Golgi complex. *Anatomical Records*, 268: 226-238.
23. Bishop W, Fawcett CP, Krulich L, McCann SM 1972 Acute and chronic effects of hypothalamic lesion on release of FSH, LH and prolactin in intact and castrated rats. *Endocrinology*, 91: 643-656.

24. Bole-Feyston C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA 1998 Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 19: 225-268.
25. Bollengier F, Mahler A, Vanhaelst 1999 Routing, processing and export of rat pituitary prolactin: identification of a 36 kDa disulphide-bridged oligomeric preprolactin. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 107: 312-322.
26. Boockfor FR, Frawley LS 1987 Functional variations among prolactin cell from different pituitary regions. *Endocrinology*, 120: 874-879.
27. Brooks CL, Kim BG, Aphale P, Kleeman BE, Johnson GC 1990 Phosphorylated variant of bovine prolactin. *Molecular and Cell Endocrinology*, 71: 117-123.
28. Bruhn TO, Rondeel JM, Jackson IM 1998 Thyrotropin-releasing hormone gene expression in the anterior pituitary. IV. Evidence for paracrine and autocrine regulation. *Endocrinology*, 139: 3416-3422
29. Burgess TL, Kelly RB 1987 Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual Reviews of Cell and Biology*, 3: 243-293.
30. Burgoyne RD, Morgan A 2003 Secretory granule exocytosis. *Physiological Reviews*, 83: 581-623.
31. Burris TP, Stringer LC, Freeman ME 1991 Pharmacological evidence that a D<sub>2</sub> receptor subtype mediates dopaminergic stimulation of prolactin secretion from the anterior pituitary gland. *Neuroendocrinology*, 54: 175-183.
32. Butcher RL, Fugo NW, Collins WE 1972 Semicircadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rats. *Endocrinology*, 90: 1125-1127.
33. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW 1974 Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704-1708.
34. Cai A, Bowers RC, Moore JP, Hyde JF 1998 Function of galanin in the anterior pituitary of estrogen-treated Fischer 344 rats: autocrine and paracrine regulation of prolactin secretion. *Endocrinology*, 139: 2452-2458.
35. Castano JP, Ruiz-Navarro A, Torronteras R, Malagon MM, Gracia-Navarro F 1993 Different exocytosis morphology in amphibian prolactin and growth hormone cells stimulated in vitro with TRH. *Tissue Cell*, 25: 165-172.

36. Chen TT, Kineman RD, Betts JG, Hill JB, Frawley LS 1989 Relative importance of newly synthesized and stored hormone to basal secretion by growth hormone and prolactin cells. *Endocrinology*, 125: 1904-1909.
37. Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA 1981 Human prolactin: cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *Journal of Biology and Chemistry*, 256: 4007-4016.
38. Corbacho AM, Martinez de la Escalera G, Clapp C 2002 Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology*, 173: 219-238.
39. Cota G, Hiriart M, Horta J, Torres-Escalante JL 1990 Calcium channels and basal prolactin secretion in single male rat lactotropes. *American Journal of Physiology*, 259: C949-C959.
40. Dannies PS 2001 Concentrating hormones into secretory granules: layers of control. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 177: 87-93.
41. Dannies PS 2002 Mechanism for storage of prolactin and growth hormone in secretory granules. *Molecular Genetics and Metabolism*, 76: 6-13.
42. De A, Morgan TE, Speth RC, Boyadjieva N, Sarkar DK 1996 Pituitary lactotrope expresses transforming growth factor  $\beta$  type II receptor mRNA and protein and contains  $^{125}\text{I}$ /TGF-1. *Journal of Endocrinology*, 149: 19-27.
43. Deneff C, Andries M 1983 Evidence for paracrine interactions between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cells aggregates. *Endocrinology*, 112: 813-822.
44. Deneff C 1990 Autocrine/paracrine intermediates in hormonal actions and modulation of cellular responses to hormones. In: Conn MC (ed) *Handbook of Physiology*, Section 7 The endocrine system. Oxford University Press, New York, pp 461-514.
45. Dinerstein H, Lago F, Goujon L, Ferrag F, Esposito N, Finidori J, Kelly PA, Postel-Vinay MC 1995 The proline-rich region of the GH receptor is essential for JAK2 phosphorylation, activation of cell proliferation and gene transcription. *Molecular Endocrinology*, 9: 1701-1707.
46. Ellerkmann E, Nagy GM, Frawley LS 1992  $\alpha$ -Melanocyte-stimulating hormone is a mammotrophic factor released by the neurointermediate lobe cells after estrogen treatment. *Endocrinology*, 130: 133-138.

47. Elkins PA, Christinger HW, Sandowski Y, Sakai E, Gertler A, de Vos AM, Kossiakoff AA 2000 Ternary complex between placental lactogen and the extracellular domain of the prolactin receptor. *Nature Structural Biology*, 7: 808-815.
48. Emanuele NV, Jurges JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR 1992 The rat prolactin gene is expressed in the brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Molecular Endocrinology*, 6: 35-42.
49. Everett JW 1954 Luteotropic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology*, 54: 685-690.
50. Farquhar MG 1985 Membrane traffic in prolactin and other secretory cells. In: MacLeod RM, Scapagnini U, Thormer MO (eds) *Prolactin basic and clinical correlates volume 1*. Liviana press, Italy, pp 3-16.
51. Farquhar MG, Palade GE 1998 The Golgi apparatus: 100 years of progress and controversy. *Trends in Cell Biology*, 8: 2-10.
52. Felix R, Meza U, Cota G 1995 Induction of classical lactotropes by epidermal growth factor in rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 136: 936-946
53. Frawley LS 1994 Role of the hypophyseal neurointermediate lobe in the dynamic release of prolactin. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 5: 107-112.
54. Freeman ME, Neill JD 1972 The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge. *Endocrinology*, 90: 1292-1294.
55. Freeman ME, Smith MS, Nazian SJ, Neill JD 1974 Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology*, 94: 875-882.
56. Freeman ME, Kanyieska B, Lerant A, Nagy G 2000 Prolactin: structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80: 1523-1631.
57. Gavier M, Aoki A, Orgnero de Gaisan E 1999 Prolactin secretory bypath exposed in cultered lactotrophs. *Histochemical Journal*, 31: 661-670.
58. Glombik MM, Gerdes HH 2000 Signal-mediated sorting of neuropeptides and prohormones: secretory granule biogenesis revisited. *Biochimie*, 82: 315-326.
59. Goffin V, Shiverick KT, Kelly PA, Martial JA 1996 Secuence-function relationships within the expanding family of prolactin, growth hormone, placental lactogen and related proteins in mammals. *Endocrine Reviews*, 17: 385-410.

60. Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelly P 2002 Prolactin: The new biology of an old hormone. *Annual Reviews of Physiology*, 64: 47-67.
61. Gonzalez-Gaitan M 2003 Signal dispersal and transduction through the endocytic pathway. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 4: 213-224.
62. Gorospe WC, Freeman ME 1981 An ovarian role in prolongating and terminating the two surges of prolactin in pseudopregnant rats. *Endocrinology*, 108: 1293-1298.
63. Greenan JR, Balden E, Ho TW, Walker AM 1989 Biosynthesis of the secreted 24 k isoforms of prolactin. *Endocrinology*, 125: 2041-2048.
64. Grosvenor CE, Mena F, Schaeffgen DA 1967 Effect of nonsuckling interval and duration of suckling on the suckling-induced fall pituitary concentration in the rat. *Endocrinology*, 81: 449-453.
65. Grosvenor CE, Mena F 1971 Effect of sucking upon the secretion and release of prolactin from the pituitary of the lactating rat. *Journal of Animal Science*, 32: 115-136.
66. Grosvenor CE, Mena F, Whitworth NS 1979 The secretion rate of prolactin in the rat during suckling and its metabolic clearance rate after increasing intervals of nonsuckling. *Endocrinology*, 104: 372-376.
67. Grosvenor CE, Mena F 1980 Evidence that thyrotropin-releasing hormone and a hipotalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology*, 107: 863-868.
68. Grosvenor CE, Mena F, Whitworth NS 1980 Evidence that the dopaminergic prolactin-inhibiting-factor mechanism regulates only the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. *Endocrinology*, 106: 481-485.
69. Grosvenor CE, Whitworth NS, Mena F 1981 Evidence that depletion and release phases of prolactin secretion in the lactating rat have different activation thresholds in response to exteroceptive stimulation from rat pups. *Endocrinology*, 108: 820-824.
70. Grosvenor CE, Mena F 1982 Regulating mechanism for oxytocin and prolactin secretion during lactation. In: Muller EE, McLeod RM (eds) *Neuroendocrine perspectives*. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, pp 62-69.



71. Hagen TC, Arnaout MA, Scherzer WJ, Martinson DR, Garthwaite TL 1986 Antisera to vasoactive intestinal peptide inhibit basal prolactin release from dispersed anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology*, 43: 641-645.
72. Halban PA, Irminger JC 1994 Sorting and processing of secretory proteins. *Biochemical Journal*, 299: 1-18.
73. Haro LS, Talamantes FJ 1985 Secreted mouse prolactin (PRL) and stored ovine PRL. I. Biochemical characterization, isolation, and purification of their electrophoretic isoforms. *Endocrinology*, 116: 346-352.
74. Hill JB, Nagy GM, Frawley LS 1991 Suckling unmask the stimulatory effect of dopamine on prolactin release: possible role for  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone as a mammatrope responsiveness factor. *Endocrinology*, 129: 843-847.
75. Horseman ND, Yu-Lee LY 1994 Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: growth hormone, prolactin, and hematopoietic cytokines. *Endocrine Reviews*, 15: 627-649.
76. Ho TW, Walker AM 24 Kd rat prolactin isoform profile during pregnancy. Program of the 73<sup>rd</sup> Annual Meeting of the Endocrine Society, Washington, DC, June 1991, p 214 (Abstract).
77. Ho TW, Leong FS, Olaso CH, Walker AM 1993 Secretion of specific nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrous cycle. *Neuroendocrinology*, 58: 160-165.
78. Hyde JF, Mura I, Ben-Jonathan N 1987 The rat posterior pituitary contains a potent prolactin-releasing factor: studies with perfused anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 121: 1531-1539.
79. Hyde JF, Ben-Jonathan N 1988 Characterization of prolactin-releasing factor in the rat posterior pituitary. *Endocrinology*, 122: 2533-2539.
80. Hyde JF, Ben-Jonathan N 1989 The rat posterior pituitary contains a potent prolactin-releasing factor: in vivo studies. *Endocrinology*, 125: 736-741.
81. Kadowaki J, Ku N, Oetting WS, Walker AM 1984 Mammatroph autoregulation: uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion. *Endocrinology*, 114: 2060-2067.
82. Kanyicska B, Lerant A, Freeman ME 1998 Endothelin is an autocrine regulator of prolactin secretion. *Endocrinology*, 139: 5164-5173.

83. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M 1991 The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocrine Reviews*, 12: 235-251.
84. Kelly RB 1985 Pathways of protein secretion in eukaryotes. *Science*, 230: 25-32.
85. Kordon C, Wandscheer D, Shu C, Rotten D, Drouva SV, Enjalbert A, Epelbaum J, Bockaert J, Hubert C 1985 Neural control of prolactin secretion. In: MacLeod RM, Scapagnini U, Thorner MO (eds) Prolactin basic and clinical correlates volume 1. Liviana press, Italy, pp 61-71.
86. Lamberts SW, Macleod RM 1990 Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews*, 70: 279-318.
87. Lara JI, Lorenzo MJ, Cacicedo L, Tolon RM, Balsa JA, Lopez-Fernández J, Sánchez Franco F 1994 Induction of vasoactive intestinal peptide gene expression and prolactin secretion by insulin like growth factor I in rat pituitary cells: evidence for an autocrine regulatory system. *Endocrinology*, 135:2526-2532.
88. Larson GH, Wise PM 1994 Constitutive and regulated prolactin secretion: effects of estradiol. *Biology of Reproduction*, 50: 357-362.
89. Laudon M, Grossman DA, Ben-Jonathan N 1990 Prolactin-releasing factor: Cellular origin in the intermediate lobe of the pituitary. *Endocrinology*, 126: 3185-3192.
90. Lee Y, Voogt JL 1999 Feedback effects of placental lactogens on prolactin levels and Fos-related antigen immunoreactivity of tuberoinfundibular dopaminergic neurons in the arcuate nucleus during pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 140:2159-2166.
91. Lewis UJ, Singh RN, Lewis LJ, Seavey BK, Sinha YN 1984 Glycosylated ovine prolactin. *Proceedings of the National Academic Science*, 81: 385-389.
92. Lorenson MY, Robson DL, Jacobs LS 1983 Divalent cation inhibition of hormone release from isolated adenohypophyseal secretory granules. *Journal of Biology and Biochemistry*, 258: 8618-8622.
93. Luque EH, Muñoz de Toro M, Smith PF, Neill JD 1986 Subpopulations of lactotrophs detected with the reserve hemolytic plaque assay show differential responsiveness to dopamine. *Endocrinology*, 118: 2120-2124.
94. Mc Andrew J, Paterson AJ, Asa SL, McCarthy KJ, Kudlow JE 1995 Targeting on transforming growth factor  $\alpha$  expresión to pituitary lactotrophs in transgenic mice

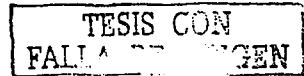
results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology*, 136: 4479-4488.

95. Martínez de la Escalera G, Clapp C, Morales MT, Lorenson MY, Mena F 1986 Reversal by thiols of dopamine, stalk median-eminence, and zinc-induced inhibition of prolactin transformation in adenohypophyses of lactating rats. *Endocrinology*, 118: 1803-1807.
96. Martínez de la Escalera G, Weiner RI 1988 Mechanism(s) by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing action of thyrotropin-releasing hormone. *Neuroendocrinology*, 47: 186-193.
97. Matera L 1996 Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sciences*, 59: 599-614.
98. Mellman I 1996 Endocytosis and molecular sorting. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 12: 575-625.
99. Mena F, Grosvenor CE 1972 Effect of suckling and of exteroceptive stimulation upon PRL release in the rat during late lactation. *Journal of Endocrinology*, 52: 11-22.
100. Mena F, Pacheco P, Grosvenor CE 1980 Effect of the electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma prolactin concentrations in anesthetized lactating rats. *Endocrinology*, 106: 458-462.
101. Mena F, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Aguayo D, Forray C, Grosvenor CE 1982 A solubility shift occurs during depletion-transformation of prolactin within the lactating rat pituitary. *Endocrinology*, 111: 1086-1091.
102. Mena F, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Grosvenor CE 1984 In-vivo and in-vitro secretion of prolactin by lactating rat adenohypophyses as a function of intracellular age. *Journal of Endocrinology*, 101: 27-32.
103. Mena F, Clapp C, Aguayo D, Lorenson MY, Martínez de la Escalera G 1986 Thiol regulation of depletion-transformation and release of prolactin by pituitary of the lactating rat. *Endocrinology*, 118: 1795-1802.
104. Mena F, Morales MT, Clapp C, Hummelt G, Martínez de la Escalera G Effect of pH and thiols on polymerization and proteolytic processing of pituitary prolactin. Program of the Annual Meeting of the Endocrine Society, New Orleans, Louisiana, June 1988, p171 (abstract).

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

105. Mena F, Clapp C, Aguayo D, Martínez de la Escalera G 1989 Differential effects of Thyrotropin-Releasing Hormone on in vitro release of in vivo or in vitro newly synthesized and mature prolactin by lactating rat adenohypophyses. Further evidence for a sequential pattern of hormone release. *Neuroendocrinology*, 49: 207-214.
106. Mena F, Aguayo D, Hummelt G, Morales MT 1992 Regulación y control de la secreción de prolactina en la rata. *Revista de la Facultad de Medicina UNAM*, 35: 115-122.
107. Mena F, Montiel JL, Aguayo D, Morales MT, Arámburo C 1993 Recent findings on prolactin transformation by the lactating rat pituitary. *Endocrine Regulations*, 27: 105-113.
108. Mena F, Aguayo D, Viguera M, Quintanar-Stephano A, Perera G, Morales T 1996 Effect of posterior pituitary lobectomy on in vivo and in vitro secretion of prolactin in lactating rats. *Endocrine*, 5: 285-290.
109. Missale CS, Boroni F, Sigala S, Zanellato A, Dal Toso R, Balsari A, Spano P 1994 Nerve growth factor directs differentiation of the bipotential cell line GH-3 into the mammoth phenotype. *Endocrinology*, 135: 290-298.
110. Mitra I 1980 A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: part 1. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 95: 1750-1759.
111. Moore HP, Andresen JM, Eaton BA, Grabe M, Haugwitz M, Wu MM, Machen TE 2002 Biosynthesis and secretion of pituitary hormones: Dynamics and regulation. *Archives of Physiology and Biochemistry*, 110: 16-25.
112. Morel G 1994 Internalization and nuclear localization of peptide hormones. *Biochemical Pharmacology*, 47: 63-76.
113. Murai I, Ben-Jonathan N 1987 Posterior pituitary lobectomy abolishes the suckling-induced rise in prolactin (PRL): Evidence for a PRL-releasing factor in the posterior pituitary. *Endocrinology*, 121: 205-211.
114. Murata T, Ying SY 1991 Transforming growth factor- $\beta$  and activin inhibit basal secretion of prolactin in a pituitary monolayer culture system. *Proceedings of the Society of Experimental Biology and Medicine*, 198: 599-605.
115. Nagano M, Kelly PA 1994 Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *Journal of Biology and Biochemistry*, 269: 13337-13345.

116. Nagy E, Berczi I 1991 Hypophysectomized rats depend on residual prolactin for survival. *Endocrinology*, 128: 2776-2784.
117. Nagy GM, Frawley LS 1990 Suckling increases the proportions of mammotropes responsive to various prolactin-releasing stimuli. *Endocrinology*, 127: 2079-2984.
118. Nagy GM, Boockfoor FR, Frawley LS 1991 The suckling stimulus increase the responsiveness of mammotropes located exclusively within the central region of the adenohypophysis. *Endocrinology*, 128: 761-764.
119. Neill JD 1970 Effect of the stress on serum prolactin and luteinizing hormone level during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 87: 1192-1197.
120. Neill JD 1980 Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. In: Martini L, Ganong WF (eds) *Frontiers in Neuroendocrinology*. Raven Press, New York, pp 129-155.
121. Neill JD, Nagy GM 1994 Prolactin secretion and its control. In: Knobil E, Neill JD (eds) *The physiology of reproduction volume 1*. Raven Press, New York, pp 1833-60.
122. Nicoll CS, Parsons JA, Fiorindo RP, Nichols CW 1969 Estimation of prolactin and growth hormone levels by polyacrylamide disc electrophoresis. *Journal of Endocrinology*, 45: 183-196.
123. Nicoll CS 1974 Physiological actions of prolactin. In: Knobil E, Sawyer WH (eds) *Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology*. American Physiological Society, Washington, DC, pp 253-292.
124. Nicoll CS, White BA, Leung FC 1980 Evolution of prolactin, its functions, and its receptors. In: MacLeod RM, Scapagnini U (eds) *Central and Peripheral Regulation of Prolactin Functions*. Raven Press, New York, pp 11-22.
125. Norwan AW, Litwack G 1997 Anterior pituitary hormones. In: *Hormones*. Academic Press, USA, pp 133-168.
126. Owerbach D, Rutter WJ, Cooke NE, Martial JA, Shows TB 1981 The prolactin gene is located in chromosome 6 in humans. *Science*, 212: 815-816.
127. Pan JT, Gala RR 1985a Central nervous system regions involved in the estrogen-induced afternoon prolactin surge. I. Lesion studies. *Endocrinology* 117: 382-387.



128. Pan JT, Gala RR 1985b Central nervous system regions involved in the estrogen-induced afternoon prolactin surge. II. Implantation studies. *Endocrinology* 117: 388-395.
129. Papka RE, Yu SM, Nikitovitch-Winer MB 1986 Use of immunoperoxidase and immunogold methods in studying prolactin secretion and application of immunogold labelling for pituitary hormones and neuropeptides. *American Journal of Anatomy*, 175: 289-306.
130. Pellegrini I, Gunz G, Grisoli F, Jaquet P 1990 Different pathways of secretion for glycosylated and non glycosylated human prolactin. *Endocrinology*, 126: 1087-1095.
131. Porter TE, Frawley LS 1992 Neurointermediate lobe peptides recruit prolactin-secreting cell exclusively within the central region of the adenohypophysis. *Endocrinology*, 131: 2649-2652.
132. Powers CA, Hatala MA 1990 Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: in vitro reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin in vivo. *Endocrinology* 127: 1916-1927.
133. Powers CA 1993 Anterior pituitary glandular kallikrein: a putative prolactin processing protease. *Molecular and Cell Endocrinology*, 90: C15-C20.
134. Proesmans M, Van bael A, Andries M, Denef C 1997. Mitogenic effects of nerve growth factor on different cell types in reaggregate cell cultures of immature rat pituitary. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 134: 119-127.
135. Rambourg A, Clermont Y, Chretien M, Oliver L 1992 Formation of secretory granules in the Golgi apparatus of prolactin cells in the rat pituitary gland: a stereoscopic study. *Anatomical Records*, 232: 169-179.
136. Reichlin S 1998 Neuroendocrinology. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds) *Williams Textbook of Endocrinology*. W. B. Saunders Company, USA, pp 165-248.
137. Schwartz J, Cherny R 1992 Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocrine Reviews*, 13: 453-475.
138. Schwartz J 2000 Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocrine Reviews*, 21: 488-513.
139. Shome B, Parlow AF 1977 Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 45: 1112-1115.

140. Shull JD, Gorski J 1984 Estrogen stimulates prolactin gene transcription by a mechanism independent of pituitary protein synthesis. *Endocrinology*, 114: 1550-1557.
141. Sinha YN 1992 Prolactin variants. *Trends in Endocrinology and Metabolism*, 3: 100-106.
142. Sinha YN 1995 Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews*, 16: 354-369.
143. Smith MS, Freeman ME, Neill JD 1975 The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*: 219-226.
144. Smith RE, Farquhar MG 1966 Lysosome function in the regulation of the secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *Journal of Cell Biology*, 31: 319-347.
145. Suarez C, Garcia-Tornadu I, Cristina C, Vela J, Gonzalez-Iglesias A, Libertum C, Diaz-Torga G, Becu-Villalobos 2002 Angiotensin and calcium signaling in the pituitary and hypothalamus. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 22: 315-333.
146. Swearingen KC 1971 Heterogeneous turnover of adenohipophysial prolactin. *Endocrinology*, 89: 1380-1388.
147. Swearingen KC, Nicoll CS 1972 Prolactin turnover in the rat adenohipophyses in vivo: its evaluation as a method for estimating secretion rates. *Journal of Endocrinology*, 53: 1-15.
148. Takahashi S 1995 Development and heterogeneity of prolactin cells. *International Review of Cytology*, 157: 33-98.
149. Tan SK, Wang FF, Pu HF, Liu TC 1997 Differential effect of age on Transforming growth factor- $\beta$ 1 inhibition of prolactin gene expression vs secretion in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology*, 138: 878-8852.
150. Thorner MO, Vance ML, Laws ER, Horvath E, Kovacs K 1998 The anterior pituitary. In: Wilson JD, Foster DW, Kronenberg HM, Larsen PR (eds) *Williams Textbook of Endocrinology*. W. B. Saunders Company, USA, pp 249-340.
151. Tishler PV, Epstein CJ 1968 A convenient method of preparing polyacrylamide gels for liquid scintillation spectrometry. *Annals of Biochemistry*, 22: 89-98.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

152. Tonkowicz P, Robertson M, Voogt JL 1983 Secretion of rat placental lactogen by the fetal placenta and its inhibitory effect on prolactin surges. *Biology and Reproduction*, 28: 707-716.
153. Tonkowicz P, Voogt JL 1983 Termination of prolactin surges with development of placental lactogen secretion in the pregnant rat. *Endocrinology*, 113: 1314-1318.
154. Toth BE, Bodnar I, Homicsko KG, Fulop F, Fekete MI, Nagy GM 2002 Physiological role of salsolinol: Its hypophysiotrophic function in the regulation of pituitary prolactin secretion. *Neurotoxicology and Teratology*, 24: 655-666.
155. Tougard C, Picart R, Tixer-Vidal A 1980 Electron-microscopic cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary culture. *American Journal of Anatomy*, 158: 471-490.
156. Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA 1984 Isolation and characterization of the human prolactin gene. *European Molecular Biology Organization Journal*, 3: 429-437.
157. Voogt JL, Lee Y, Yang S, Arbogast L 2001 Regulation of prolactin secretion during pregnancy and lactation. *Progress in Brain Research*, 133: 173-85.
158. Walker AM, Farquhar MG 1980 Preferential release of newly synthesized prolactin granules is the result of functional heterogeneity among mammatrophs. *Endocrinology*, 107: 1095-1104.
159. Weissman JT, Plutner H, Balch WE 2001 The mammalian guanine nucleotide exchange factor mSec 12 is essential for activation of the Sar 1GTPase directing endoplasmic reticulum export. *Traffic*, 2: 465-475.
160. Wynick D, Small CJ, Bacon A, Holmes FE, Norman M, Ormandy CJ, Kilic E, Kerr NC, Ghatei M, Talamantes F, Bloom SR, Pachinis V 1998 Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. *Proceedings of the National Academic Science*, 95: 12671-12675.
161. Ying SY, Becker A, Baird A, Ling N, Ueno N, Esch F, Guillemin R 1986 Type  $\beta$  transforming growth factor (TGF  $\beta$ ) is a potent stimulator of the basal secretion of follicle stimulating hormone (FSH) in a pituitary monolayer system. *Biochemistry and Biophysics Research Community*, 135: 950-956.
162. Yu-Lee LY, Luo G, Book ML, Morris SM 1998 Lactogenic hormone signal transduction. *Biology and Reproduction*, 58: 298-301.



163. Zheng T, Nicchitta CV 1999 Structural determinants for signal sequence function in the mammalian endoplasmic reticulum. *Journal of Biological Chemistry*, 274: 36623-36630.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## Regional Mechanisms Within Anterior Pituitary of Lactating Rats May Regulate Prolactin Secretion

TESIS COM  
FALLA DE ORIGEN

Nestor Diaz, Icnelia Huerta, Nephtali Marina, Nilda Navarro, and Flavio Mena

*Department of Cellular and Molecular Neurobiology, Institute of Neurobiology, National University of Mexico, Campus UNAM, Juriquilla, Queretaro, Mexico*

**Prolactin (PRL) release was compared after incubating the central and peripheral regions of the anterior pituitary of lactating rats, either nonsuckled or suckled in conditioned medium obtained by incubating medium with the same anterior pituitary regions from nonsuckled or suckled rats. To collect conditioned media, anterior pituitary regions were incubated in Earle's medium for 4 h, and conditioned medium was filtered and employed double concentrated. Each anterior pituitary was incubated in conditioned medium for 30 min. PRL released in vitro was determined by polyacrylamide gel electrophoresis. As a control, anterior pituitary regions from lactators were incubated in medium conditioned by male rat anterior pituitary regions, and they showed no changes of PRL release compared with those cultured in Earle's medium. In general, conditioned media from both anterior pituitary regions of nonsuckled and suckled rats inhibited PRL release in peripheral anterior pituitary regions, whereas PRL release was stimulated in central regions of both nonsuckled and suckled rats. A higher number of stimulatory effects was provoked by conditioned media from suckled than from nonsuckled rats, and most of these effects were from conditioned media of the peripheral region of suckled rats. Together, these results suggest the existence within anterior pituitary regions of factors that regulate PRL secretion and that their action depends on the physiologic condition of the animal.**

**Key Words:** anterior pituitary; prolactin; lactation; regionalization.

### Introduction

The secretion of prolactin (PRL) by the anterior pituitary is a complex neuroendocrine phenomenon whose regulation is systemic, hypothalamic, and locally produced; that

is, autocrine and paracrine factors participate (see refs. 1 and 2 for reviews). Regional and lactotroph heterogeneity has been documented (3-5) regarding cell size, secretory capacity, responsiveness to secretagogues, as well as the influences of other PRL secretagogues from the posterior and/or neurointermediate lobes of the pituitary (PNIL), which, reaching the anterior pituitary via the short portal vessels, may physiologically stimulate PRL release and may influence PRL regionalization (6-8); see ref. 5 for review).

In a previous study, we analyzed the effect of removing the PNIL of the pituitary gland of lactating rats on the suckling-induced transformation and release of PRL and on regionalization of its secretion (9). The results of this and other studies (10-13) suggested that the PNIL may play a complementary role on *in vivo* and *in vitro* PRL release, and it may influence PRL regionalization, even though factors from the PNIL showed no effect on suckling-induced PRL transformation (9).

In the present study, we used a different approach to determine whether within the central (i.e., the region of the anterior pituitary surrounding the neurointermediate and posterior lobes of the pituitary) and the rest of the gland of lactating rats there exist mechanisms capable of influencing each others' secretion of PRL and whether the type of effect exerted varied according to the physiologic condition of the animal (i.e., suckled or nonsuckled). Conditioned media obtained by incubation of each region of anterior pituitaries from rats previously nonsuckled 6 h or from rats nonsuckled 6 h and then suckled for 15 min were employed to incubate anterior pituitary regions from animals in the same (i.e., nonsuckled and suckled) physiologic condition, and their effects were determined on PRL release.

### Results

#### *Effect of Conditioned Media from Incubation of Anterior Pituitary Regions of Male Rats on PRL Release from Anterior Pituitary Regions of Lactating (nonsuckled and suckled) Rats*

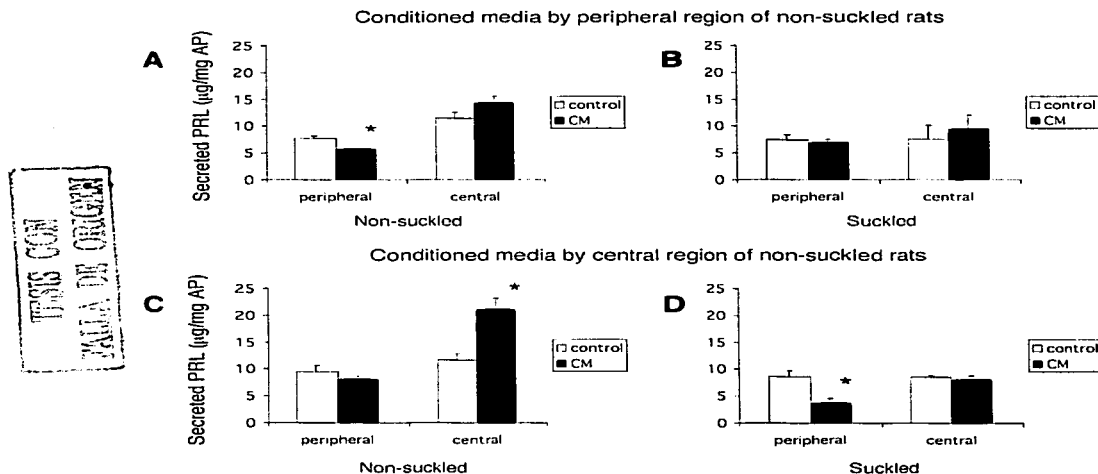
As shown in Table 1, conditioned media from anterior pituitary regions of male rats had no effect on PRL release from anterior pituitary regions of either nonsuckled or suckled rats.

Received March 14, 2002; Revised April 24, 2002; Accepted April 24, 2002.  
Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed:  
Dr. Flavio Mena, Institute of Neurobiology, National University of Mexico,  
Campus UNAM, Juriquilla, Queretaro, 76001, Mexico. E-mail: fmena@  
servidor.unam.mx

**Table 1**  
Effect on PRL Release ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  of Anterior Pituitary) of Incubating Anterior Pituitary Regions from Male and Lactating (nonsuckled and suckled) Rats in Media Conditioned from Incubation of Anterior Pituitary Regions of Male Rats<sup>a</sup>

Incubated anterior pituitary region	Male rats		Nonsuckled rats		Male rats		Suckled rats	
	Control	Conditioned medium	Control	Conditioned medium	Control	Conditioned medium	Control	Conditioned medium
Peripheral	0.72 $\pm$ 0.32	1.06 $\pm$ 0.18	8.47 $\pm$ 0.51	7.84 $\pm$ 0.56	1.02 $\pm$ 0.22	1.26 $\pm$ 0.06	9.61 $\pm$ 1.93	8.25 $\pm$ 1.05
Central	0.24 $\pm$ 0.15	0.57 $\pm$ 0.17	6.87 $\pm$ 0.86	9.09 $\pm$ 0.69	0.94 $\pm$ 0.15	1.07 $\pm$ 0.37	10.42 $\pm$ 0.71	9.25 $\pm$ 0.85

<sup>a</sup>Control incubations were made in Earle's medium.



**Fig. 1.** Effect on PRL release of incubating nonsuckled and suckled rat anterior pituitary regions in conditioned media (CM) obtained from incubations of (A,B) peripheral and (C,D) central anterior pituitary regions of nonsuckled rats ( $n = 5$ ). \* $p < 0.05$  vs control.

#### Effect of Conditioned Media from Anterior Pituitary Regions of Nonsuckled and Suckled Rats on PRL Release

##### Effect of Conditioned Media from Peripheral and Central Anterior Pituitary Regions of Nonsuckled Rats on Corresponding Anterior Pituitary Regions of Nonsuckled and Suckled Rats

As shown in Fig. 1A,B, when incubated in conditioned media from the peripheral region of nonsuckled rats, PRL secretion decreased in the peripheral anterior pituitary region of nonsuckled rats, but no effect was observed in the central anterior pituitary region of nonsuckled rats, nor in either region of anterior pituitaries from suckled rats. As shown in Fig. 1C,D, PRL secretion was unchanged when either the peripheral region of nonsuckled rats or the central

region of suckled rats was incubated in media from the central region of nonsuckled rats. However, when incubated in media conditioned by the same tissue region, significant changes in PRL secretion occurred, namely increased secretion in the central region of nonsuckled rats and decreased PRL secretion in the peripheral region of suckled rats.

##### Effect of Conditioned Media from Peripheral and Central Anterior Pituitary Regions of Suckled Rats on Respective Regions of Nonsuckled and Suckled Rats

As shown in Fig. 2A,B, a clear stimulation of PRL secretion occurred when the central region of nonsuckled rats and both regions of suckled rats were incubated in conditioned media from the peripheral region of suckled rats.

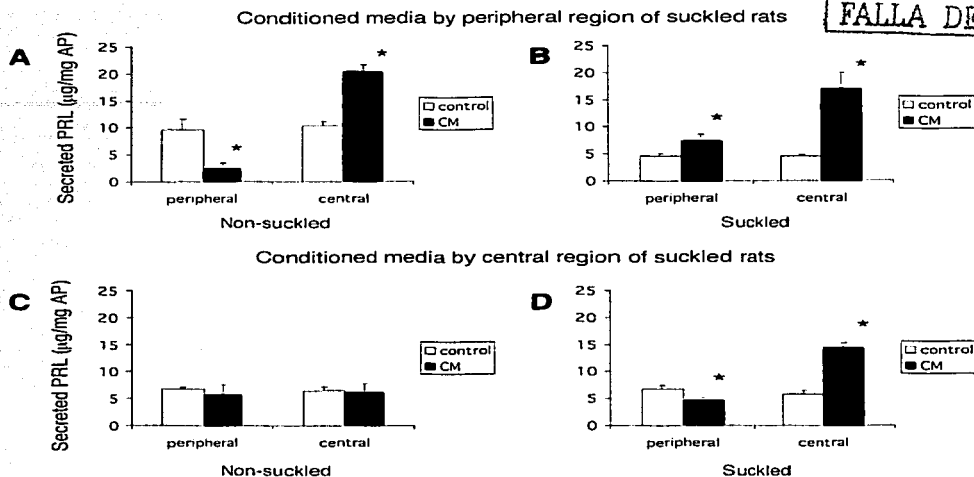


Fig. 2. Effect on PRL release of incubating nonsuckled and suckled rat anterior pituitary regions in conditioned media (CM) obtained from incubations of (A,B) peripheral and (C,D) central anterior pituitary regions of suckled rats ( $n = 5$ ). \* $p < 0.05$  vs control.

However, inhibition of PRL secretion resulted from incubation of the peripheral region of nonsuckled rats in the same medium. On the other hand, as shown in Fig. 2C,D, no effect of conditioned media from the central region of suckled rats was observed on either anterior pituitary region of nonsuckled rats, but incubation in this same medium resulted in a significant decrease or increase in PRL secretion in the peripheral and central anterior pituitary regions of suckled rats, respectively.

### Discussion

The results obtained in the present study using media conditioned by different anterior pituitary regions suggest that regional influences within the lactating rat anterior pituitary may regulate PRL secretion, and that the type of effect varies according to the physiologic condition of the animal. The fact that incubation of anterior pituitary regions from lactating rats in media from male rat anterior pituitary regions had no effect on PRL secretion indicates that the effects observed were specific for lactating rats. Incubations with conditioned media from lactating rats caused either stimulation, inhibition, or no effect on hormone release from each region, which suggests either that the conditioned media from male rats lack the factors existing in lactating female

anterior pituitaries, or that lactating female anterior pituitaries lack receptors for factors from male anterior pituitaries.

When considering the stimulatory and inhibitory effects observed, it is clear that the conditioned media from both anterior pituitary regions of suckled rats showed a higher number of effects than the conditioned media of nonsuckled rats; that is, four effects of conditioned media from suckled rats were stimulatory and two were inhibitory, whereas one effect of conditioned media from nonsuckled rats was stimulatory and two were inhibitory. In addition, no effects occurred in five conditions from nonsuckled rats and in two from suckled rats. Regarding the regions from which these conditioned media were obtained and those where they provoked the effects, for the suckled rats, four of the effects, three stimulatory and one inhibitory, were exerted by conditioned media from the peripheral anterior pituitary region of suckled rats, and its stimulatory effects were manifested both in anterior pituitary regions of suckled rats and in the peripheral region of nonsuckled rats. With respect to the effects shown by the conditioned media from the central region of nonsuckled rats, it inhibited PRL secretion from the peripheral region of suckled rats but stimulated it in the central region of nonsuckled rats. Finally, in contrast to conditioned media from the peripheral region of suckled rats, the conditioned media from the same region of nonsuckled

rats showed only an inhibitory effect on the same region of nonsuckled rats. A scheme showing the effects of conditioned media on anterior pituitary regions and those regions from which conditioned media were obtained is shown in Fig. 3.

Thus, within an integrative frame of PRL secretion by the lactating rat anterior pituitary, these results suggest that suckling may preferentially activate secretion and release of factors that stimulate rather than inhibit PRL release, whereas, in the absence of suckling stimulation, either no effects are manifested or only one of inhibitory and another of stimulatory type are expressed. Additionally, with respect to the action of suckling, it was clear that the origin of these factors was the peripheral, and not the central anterior pituitary region.

Previous studies have focused on the role that factors from the PNIL may exert, via the short portal vessels, on PRL secretion by the lactating rat anterior pituitary (*3,4*; see ref. *5* for review), and in particular on the influence of  $\alpha$ -melanocyte-stimulating hormone ( $\alpha$ -MSH) on the central anterior pituitary region (*5, 10, 11, 14, 15*). In addition, the well-established hypothalamic mechanisms regulating PRL transformation and release (i.e., dopamine and secretagogues such as thyrotropin-releasing hormone [TRH]) (*16, 17*), were found to occur in response to suckling only in the central and not in the peripheral region of the anterior pituitary, and the occurrence of these mechanisms was not affected by the absence of the PNIL (*9*). Taken together, the results of the present and previous studies suggest that suckling activates a complex series of interacting and perhaps sequential events involving hypothalamically activated PRL transformation and release, as well as activation and release of  $\alpha$ -MSH and of secretagogues, presumably from the posterior lobe, all of them impinging on the central region of the pituitary gland for PRL secretion. In this context, the results of the present study suggest that in addition to or interacting with other sources of regulation, the pituitary of the lactating rat produces factors capable of either stimulating or inhibiting PRL release, according to whether the rat has been suckled or not. Moreover, the findings that the number of stimulatory influences was found to increase in both regions of suckled rats and that most of those influences increased secretion from the central anterior pituitary region are consistent with the importance of this region for PRL secretion in the lactating rat.

At present not much can be said regarding the nature of the agents responsible for these effects, except that their size should be  $>10$  kDa, which was the limit employed for ultrafiltration and desalination of the conditioned media. Thus, based on size, the vast majority of known pituitary factors with autoerine-paracrine activity that have been reported (e.g., TRH, vasointestinal polypeptide [VIP], angiotensin II [AII], neurotensin, substance P,  $\alpha$ -MSH) (see refs. *1* and *2* for review) could be excluded. However, this would not imply that, under particular physiologic conditions, interactions of these and other PRL regulators may not occur.

Much work will be required to characterize the nature and mechanisms involved in the effects that were observed, and to define the role that these influences may have in the overall regulation of PRL secretion by the lactating rat anterior pituitary.

## Materials and Methods

### Animals

Primiparous lactating rats of the Wistar strain were used. They were kept in individual cages in a room with controlled light (light on from 7:00 AM to 9:00 PM) and temperature (23–25°C). Purina chow (Ralston Purina, Chicago, IL) and tap water were given ad libitum. Litter size was adjusted to 8–10 pups, and rats were used 7–10 d postpartum.

Some groups of mothers were killed by decapitation 6 h after their pups had been removed. These comprised a nonsuckled group. Other groups were suckled by their litters for 15 min at the end of the nonsuckling period, then killed.

All the animals were sacrificed after light ether anesthesia, and the anterior pituitary of each rat was rapidly removed and dissected into a central region, surrounding the neuro-intermediate lobe of the pituitary gland (*3, 9*), and the rest of the gland (i.e., the peripheral region) (see Fig. 4). All efforts were made to minimize the suffering and number of animals, and all our experiments conformed to local and international guidelines on the ethical use of animals.

### Conditioned Media

The conditioned media were obtained from 4-h incubations of anterior pituitary regions of nonsuckled and suckled rats. Incubations were made in a metabolic shaker in Earle's medium, pH 7.3, under 95% O<sub>2</sub>–5% CO<sub>2</sub>, at 37°C for 4 h. During incubation, media samples were collected at 30, 60, 90, 120, and 240 min. At each time, the media were collected and fresh Earle's medium was added. The collected media were pooled, ultrafiltered, and desalted in a Centricron microconcentrator with a 10-kDa cutoff at 4°C at 2055g in a Sorvall RC5C centrifuge (five cycles each for 30 min). Finally, the media were diluted with Earle's medium in a 2:1 concentration.

### PRL Determination and Data Analysis

The media samples were analyzed with the nondenaturing, nonreducing polyacrylamide disc gel electrophoresis densitometry procedure of Nicoll et al. (*18*) as previously described (*9, 17, 19, 20*). Since monomeric (i.e., 23-kDa) PRL appears as a single band and the monomeric form is the main form released by the lactating rats, both in vivo and in vitro (*21*), this method can be used to quantitate changes in the PRL released. By contrast, radioimmunoassay measurements of PRL include not only the monomeric, but also other variants of PRL (see ref. *21* for review). The amount

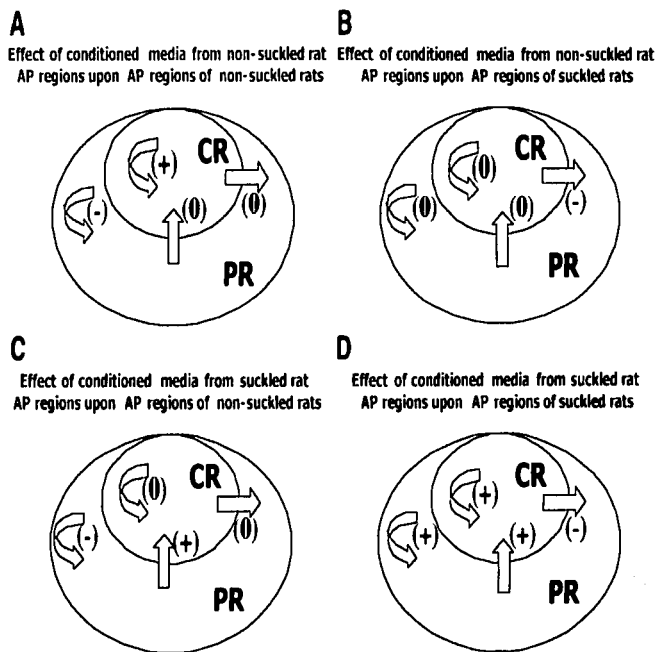


Fig. 3. Schematic representation of data in Figs. 1 and 2 showing effects of conditioned media by central (CR) and peripheral (PR) anterior pituitary (AP) regions from 6-h nonsuckled or from 15-min suckled rats on PRL release from anterior pituitary regions of rats in same (A,D) or opposite (B,C) physiologic condition from which conditioned media was obtained. Arrows indicate the origin and site of action of conditioned media (+), (-), and (0) indicate stimulatory, inhibitory, or no effects, respectively. Note that the highest number of stimulatory effects was exerted by medium conditioned from incubations of suckled rat anterior pituitaries, particularly from the peripheral region.

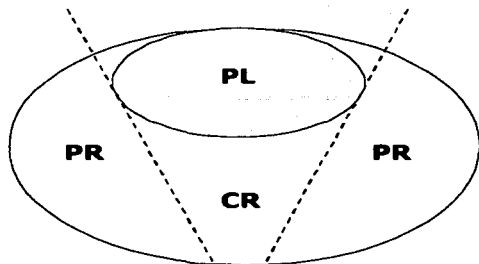


Fig. 4. Scheme of pituitary of rats indicating posterior (PL), central (CR), and peripheral (PR) regions of anterior pituitary. Dashed lines indicate the site at which dissection of each region is made, after the posterior and neurointermediate lobes have been removed.

of PRL present in the conditioned media was determined, and its value was subtracted from the total amount of hormone secreted after incubation with anterior pituitary regions.

Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Differences between experimental groups were analyzed using a one-way analysis of variance and Tukey HSD test. Differences with a  $p$  value of 0.05 or less were considered statistically significant.

#### Experimental Design

A series of experiments was made to determine the effect on PRL secretion of incubating anterior pituitary regions from nonsuckled and suckled rats for 30 min in media conditioned from incubations of anterior pituitary regions of animals in the same conditions (i.e., nonsuckled and suckled).

Control incubations of anterior pituitary regions were made both in Earle's medium and in media conditioned from incubating anterior pituitary regions of male rats for 4 h, following the same procedure used to obtain conditioned media from lactating rats. Control incubations in Earle's medium were made in parallel with each experiment in which conditioned media from lactating rat anterior pituitaries were used.

#### Acknowledgments

We gratefully acknowledge Dr. A. F. Parlow and the National Hormone and Pituitary Program of the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases for the gift of rat PRL, and Drs. Dorothy D. Pless and Gonzalo Martínez de la Escalera for the critical reading and correcting of the manuscript. We also thank M. C. Leopoldo González for expert image assistance, Pilar Galarza for valuable support of bibliographic material, and M. C. Martín García for animal care. This work was supported by a grant from DGEP-UNAM.

#### References

- Schwartz, J. and Cherny, R. (1992). *Endocr. Rev.* **13**, 453-475.
- Schwartz, J. (2000). *Endocr. Rev.* **21**, 488-513.
- Boockfor, F. R. and Frawley, L. S. (1987). *Endocrinology* **120**, 874-879.
- Mena, F., Montiel, J. L., Aguayo, D., Morales, M. T., and Arámburo, C. (1993). *Endocr. Regul.* **27**, 105-113.
- Frawley, L. S. (1994). *Trends Endocrinol. Metabol.* **5**, 107-112.
- Murai, I. and Ben-Jonathan, N. (1987). *Endocrinology* **121**, 205-211.
- Hyde, J. F. and Ben-Jonathan, N. (1998). *Endocrinology* **122**, 2533-2539.
- Landon, M., Grossman, D. A., and Ben-Jonathan, N. (1990). *Endocrinology* **126**, 3185-3192.
- Mena, F., Aguayo, D., Viguera, M., Quintanar-Stephano, A., Perera, G., and Morales, T. (1996). *Endocrine* **5**, 285-290.
- Hill, J. B., Nagy, G. M., and Frawley, L. S. (1991). *Endocrinology* **129**, 843-847.
- Hill, J. B., Lacey, E. R., Nagy, G. M., Gores, T. J., and Frawley, L. S. (1993). *Endocrinology* **133**, 2991-2997.
- Nagy, G. M., Boockfor, F. R., and Frawley, L. S. (1991). *Endocrinology* **128**, 761-764.
- Porter, T. E. and Frawley, L. S. (1992). *Endocrinology* **131**, 2649-2652.
- Ellerkmann, E., Nagy, G. M., and Frawley, L. S. (1991). *Endocrinology* **129**, 838-842.
- Ellerkmann, E., Nagy, G. M., and Frawley, L. S. (1992). *Endocrinology* **130**, 133-138.
- Grosvenor, C. E., Goodman, G. T., and Mena, F. (1984). In: *Prolactin secretion: a multidisciplinary approach*. Mena, F. and Valverde, C. M. (eds.). Academic: New York.
- Mena, F., Clapp, C., Aguayo, D., and Martínez-Escalera, G. (1989). *Neuroendocrinology* **49**, 207-214.
- Nicoll, C. S., Parsons, J. A., Fiorindo, R. P., and Nichols, C. W. (1969). *J. Endocrinol.* **45**, 183-197.
- Mena, F., Martínez-Escalera, G., Clapp, C., Aguayo, D., Forray, C., and Grosvenor, C. E. (1982). *Endocrinology* **111**, 1086-1091.
- Mena, F., Hummelt, G., Aguayo, D., Clapp, C., Martínez-Escalera, G., and Morales, M. T. (1992). *Endocrinology* **130**, 3365-3377.
- Sinha, Y. N. (1995). *Endocr. Rev.* **16**, 354-369.