

03086

2 ej

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS  
PROFESIONAL Y DE POSGRADO

REGULACION AUTONOMICA DE LA EVACUACION Y  
LA SECRECION LACTEA EN LA RATA

TESIS  
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR  
EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS  
PRESENTA

MARIA TERESA MORALES GUZMAN

DEPTO. DE FISIOLÓGIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

1990



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.

## INDICE

### RESUMEN

INTRODUCCION .....	1
I) Lactancia .....	1
II) Regulación integrativa de la evacuación láctea en la rata lactante .....	2
a) Anatomía de la glándula mamaria .....	2
b) El reflejo neuroendocrino de la evacuación láctea .....	4
c) Secreción de oxitocina y evacuación láctea .....	5
d) Regulación autonómica de la evacuación láctea .....	9
III) Secreción láctea y prolactina .....	14
a) Importancia de la prolactina en la secreción láctea .....	15
b) Acciones de la prolactina sobre la glándula mamaria .....	16
b.1) Acción de la prolactina sobre la permeabilidad epitelial de la glándula mamaria .....	17
c) Interrelación entre succión, prolactina y secreción láctea .....	19
d) Regulación de la lactancia al final del ciclo .....	21
OBJETIVO DE LA TESIS .....	24

RESULTADOS Y DISCUSION .....26

I) Factores neurales y hormonales que regulan la contractilidad de la glándula mamaria de la rata en respuesta a la oxitocina .....26

a) Estudios sobre el sistema regulador central del aparato motor de la glándula mamaria .....27

a.1) Efecto de la aplicación ICV de agonistas y antagonistas adrenérgicos .....33

a.1.1) Efecto de la aplicación ICV de isoproterenol sobre la tasa de entrada de leche a la glándula mamaria .....36

a.2) Efectos centrales de la oxitocina y la prolactina sobre el aparato motor de la glándula mamaria .....39

a.2.1) Efectos centrales de la oxitocina sobre la contractilidad de la glándula mamaria .....39

a.2.2) Efectos centrales de la prolactina sobre la contractilidad de la glándula mamaria .....41

b) Experimentos de la interacción entre el sistema regulador central y el mecanorreceptor ductal sobre la contractilidad de la glándula mamaria ....55

DISCUSION GENERAL .....58

I) Modelo de la evacuación láctea en la rata .....63

II) Líneas de investigación futura generadas a partir de los resultados obtenidos .....67

APENDICE I. (MATERIAL Y METODOS).

BIBLIOGRAFIA

## RESUMEN.

La lactancia es la última fase del ciclo reproductor de los mamíferos y se divide en dos procesos principales: la secreción y la evacuación láctea. En estos procesos de síntesis y evacuación de la leche por la glándula mamaria participan la prolactina (PRL) y la oxitocina, respectivamente y ambas fases dependen del estímulo de la succión. La inervación eferente de la glándula mamaria comprende únicamente la división simpática del sistema nervioso autónomo y se ha propuesto que dicha inervación puede intervenir en la compleja regulación del funcionamiento mamario.

En la rata lactante, la succión provoca la liberación de oxitocina a la circulación y activa al sistema simpático adrenal. Además, en la glándula mamaria existen mecanorreceptores ductales, que al activarse (por la dilatación de los conductos de la glándula) inhiben la activación fásica del sistema simpático adrenal y disminuyen el tono ductal de la glándula mamaria. Por otro lado, en esta tesis se presentan evidencias de que existen mecanismos centrales adrenérgicos que inhiben o estimulan el tono ductal de la glándula mamaria de la rata por medio de la inervación directa del órgano.

Con respecto a la secreción láctea, se sabe que al final de la lactancia, la succión, además de provocar la liberación de la PRL, activa un mecanismo periférico inhibitorio que contrarresta el efecto galactopoiético de la hormona sobre la glándula mamaria. Así, la activación simultánea de estos dos sistemas antagonísticos y su funcionamiento equilibrado pueden determinar la intensidad y duración de la producción láctea.

En suma, la lactancia es un fenómeno complejo y en su regulación intervienen mecanismos neurohumorales diversos, como son: a) las hormonas hipofisarias (PRL y oxitocina); b) el sistema nervioso autónomo (sistema simpático adrenal e inervación mamaria); c) mecanismos locales particulares de la glándula mamaria (mecanorreceptor, síntesis de leche, etc.) y d) mecanismos centrales adrenérgicos que pueden regular el funcionamiento del aparato motor de la glándula mamaria.

Considerando todo lo anterior, el propósito de la presente tesis fue analizar los mecanismos centrales adrenérgicos y peptidérgicos que regulan el funcionamiento de la glándula mamaria. Registramos la presión intramamaria (PIM) en respuesta a la oxitocina endovenosa (IV) en una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas con uretano, previamente implantadas con una cánula guía en un ventrículo lateral cerebral (ICV) o una cánula intratecal (IT).

Determinamos el efecto de aplicar agonistas y antagonistas adrenérgicos por vía ICV sobre la contractilidad de la glándula mamaria en respuesta a la oxitocina exógena. Además, determinamos si la PRL y la oxitocina que se liberan a la circulación durante la succión y supuestamente al líquido cefalorraquídeo, pueden influir directa o indirectamente en la contractilidad de la glándula mamaria y si sus efectos pueden atribuirse a mecanismos adrenérgicos.

Encontramos que la administración ICV de noradrenalina

(NA) o de isoproterenol (ISOP) aumentó o disminuyó respectivamente, la amplitud de las respuestas de la glándula mamaria a la oxitocina exógena. La sección de las raíces ventrales correspondientes a la glándula registrada bloqueó el efecto central de estos agonistas adrenérgicos.

El efecto central del ISOP sobre las respuestas de PIM se antagonizó por la administración ICV o IV del antagonista  $\beta$ -adrenérgico propranolol, por la aplicación previa de NA ICV o por la activación del mecanorreceptor ductal. Además, medimos la tasa de entrada de la leche a las glándulas mamarias de ratas anestesiadas y observamos que el ISOP ICV provocó la disminución en la tasa de entrada; lo cual sugiere una ductoconstricción como mecanismo causal de los efectos observados.

Por otra parte, observamos que la administración ICV de oxitocina provocó un aumento en la amplitud de las respuestas de PIM de la glándula a la oxitocina IV.

Con respecto a la forma molecular predominante de PRL, cuyo peso molecular es de 24,000 daltones (24Kd) encontramos que su administración ICV (20pg a 1 $\mu$ g) aumentó la amplitud de las respuestas de PIM, con una latencia de 5 a 10 min y en relación directa con la dosis. La administración IV de PRL (10  $\mu$ g) provocó un efecto similar pero con una latencia mayor (20 a 30 min). La administración ICV de 200pg del fragmento amino-terminal de 16,000 daltones (16Kd) de peso molecular de la PRL, aumentó la amplitud de las respuestas de PIM. La administración ICV (160 ng) del fragmento carboxilo-terminal de 8,000 daltones (8Kd) de la PRL no modificó la amplitud de las respuestas de PIM. La aplicación ICV de hormona de crecimiento (GH) (10pg a 1ng) tuvo sólo un efecto discreto aumentando la amplitud de las respuestas de la glándula.

Acerca de los mecanismos involucrados en el efecto central de la PRL, encontramos que la hipofisectomía o la adrenalectomía no bloquearon la acción central de la PRL; mientras que la sección espinal, la sección de las raíces ventrales correspondientes a la glándula registrada o la administración IV o ICV del bloqueador  $\beta$ -adrenérgico propranolol, si lo hicieron.

La aplicación ICV del anticuerpo anti-PRL durante el registro de la PIM provocó una activación simpática inespecífica; sin embargo, la aplicación ICV o IT (a nivel de T<sub>10</sub>-T<sub>11</sub>), del anticuerpo anti-PRL 48 horas antes del registro bloqueó el efecto central de la PRL, pero no el de la oxitocina (IT) o el de la NA (ICV o IT) sobre las respuestas de PIM.

En conclusión, los resultados que se presentan en esta tesis sugieren que existe una regulación adrenérgica central del tono ductal de la glándula mamaria cuya influencia llega a la glándula mamaria por medio de su inervación. Además, este sistema regulador central puede sumar sus efectos  $\alpha$ -adrenérgicos, inhibidores del tono ductal a los producidos por la activación del mecanorreceptor ductal, lo cual, durante la succión facilitaría el desplazamiento de la leche por los conductos de la glándula mamaria.

Los resultados apoyan la idea de que las PRLs (24 y 16Kd), la GH y la oxitocina pueden tener acciones centrales que influyen en la contractilidad mamaria y con ello participar en la regulación de la evacuación láctea. Las PRLs

hipofisiarias y/o neurales podrían participar en esta regulación aparentemente por medio de la inervación eferente mamaria.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis sugieren la existencia de mecanismos centrales adrenérgicos y peptidérgicos que pueden regular el funcionamiento mamario.

## INTRODUCCION.

### ID Lactancia.

La lactancia es la fase final del ciclo reproductor de los mamíferos que permite la conservación de estas especies al proveer la alimentación necesaria para la sobrevivencia de la prole después de su nacimiento. En sí, esta función es un fenómeno neuroendocrino complejo. Su inicio acontece después del parto y su desarrollo depende de los estímulos continuados de la succión y de la estimulación exteroceptiva que recibe la madre provenientes de las crías.

Entre los mecanismos neuroendocrinos específicos de la lactancia, están los relacionados con la síntesis, procesamiento y liberación a la circulación de la prolactina (PRL) y de la oxitocina por la adeno y por la neurohipófisis, respectivamente. La PRL forma parte esencial de un complejo de hormonas adenohipofisiarias que estimulan la síntesis de la leche por los alveolos mamarios, mientras que la oxitocina determina la evacuación de la leche hacia el exterior durante la succión.

Por otra parte, como componentes importantes de la regulación fisiológica de la lactancia, existen también mecanismos neurohumorales de naturaleza adrenérgica, que influyen en el funcionamiento del tejido mamario y en su responsividad a las hormonas hipofisiarias.

En esta tesis se revisan de manera general los aspectos relacionados con la regulación neuroendocrina de la lactancia, especialmente la participación que tiene el sistema nervioso autónomo en dicha regulación. Asimismo, se presenta el análisis experimental de los mecanismos centrales de diversa naturaleza que regulan la contractilidad de la glándula mamaria.



## II) Regulación integrativa de la evacuación láctea en la rata lactante.

### a) Anatomía de la glándula mamaria.

En las distintas especies de mamíferos, la glándula mamaria muestra una estructura externa diversa y se encuentra en íntima relación anatómico-fisiológica con la piel, ya que cuenta con el suministro cutáneo de nervios y de vasos sanguíneos. Por esta razón, se considera a la glándula mamaria como una de las más importantes glándulas accesorias de la piel (Cowie, 1974).

Turner (1952) y Cowie y Tindal (1971), han descrito detalladamente las variaciones de la forma, tamaño, número y ubicación de las glándulas mamarias entre las distintas especies de mamíferos.

Brevemente, la rata posee 6 pares de glándulas mamarias: 3 torácicos, 1 abdominal y 2 inguinales que a manera de sacos aplanados revisten la pared ventral del cuerpo; mientras que en el hombre solo se encuentra un par de ellas, ubicadas en la región torácica anterior. Por otro lado, la vaca, al igual que otros rumiantes, tiene 4 glándulas mamarias inguinales que se agrupan para formar la ubre (Wakerley y col, 1988).

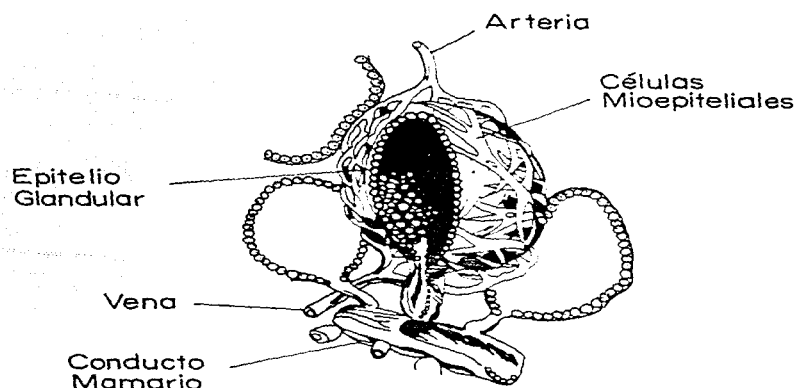
Sin embargo, no obstante que la morfología externa de la glándula mamaria es muy diversa en las distintas especies de mamíferos, los aspectos histológicos de la misma son similares en todas las especies estudiadas. En general, la glándula mamaria está formada por parénquima y estroma. El parénquima está constituido por numerosos alveolos (aparato secretor) que son drenados por conductos, los cuales se unen entre sí para formar conductos mayores que desembocan en el pezón. Cada alveolo está formado por una capa de células epiteliales secretoras de leche rodeadas por células

contráctiles especializadas llamadas células mioepiteliales, las cuales rodean también a los conductos de menor calibre.

El arreglo de los conductos varía entre las especies, de acuerdo a si el conducto de cada lóbulo se une a otro antes de abrirse al pezón ó si permanece separado. Así, en la rata los conductos mamarios convergen en un solo conducto principal o galactóforo, mientras que en el hombre y el conejo son varios los galactóforos que desembocan al pezón. Además, en algunos mamíferos la glándula mamaria puede tener estructuras particulares para el almacenaje de la leche. En el hombre, el almacenamiento de leche se lleva a cabo en las dilataciones de los galactóforos cercanas al pezón, mientras que en los rumiantes, los conductos grandes desembocan en un reservorio o cisterna glandular que se comunica con la cisterna del pezón, la cual a su vez desemboca en el conducto del pezón (Cowie, 1974).

El parénquima mamario está revestido por tejido conectivo (estroma), el cual posee numerosos vasos sanguíneos y fibras de músculo liso dispuestas longitudinalmente en los conductos menores y longitudinal y circularmente en los de calibre mayor (Cross, 1961; Findlay y Grosvenor, 1969) (Fig. 1).

El tejido contráctil de la glándula mamaria (aparato motor) lo constituyen las células mioepiteliales y el músculo liso que rodea a los conductos mamarios y a los vasos sanguíneos de la glándula (Fig. 1). Fibras sensoriales provenientes de receptores ubicados principalmente en el pezón, la piel cercana al mismo y el parénquima mamario constituyen la inervación aferente de la glándula mamaria (Cross, 1961; Findlay, 1966). Estos receptores son sensibles a la presión y al tacto. La inervación eferente de la glándula mamaria es de naturaleza simpática y llega al tejido conectivo y al músculo liso (Cross, 1961; Findlay y Grosvenor, 1969).



#### ALVEOLO MAMARIO

Fig. 1. Diagrama de vasos sanguíneos y células mioepiteliales rodeando al alveolo mamario. (Tomado de Mayer y Klein, 1961; original de Turner, 1952).

#### b) El reflejo neuroendocrino de la evacuación láctea.

El reflejo de evacuación láctea es el mecanismo neuroendocrino principal por el cual la leche sintetizada y almacenada en la glándula mamaria es expulsada hacia el exterior durante la succión o la ordeña (Cowie y col, 1951). Este reflejo se activa en su rama aferente neural por la estimulación de receptores localizados en la zona del pezón, durante la succión o la ordeña. Dichos receptores son sensibles a la estimulación táctil y de presión. Los impulsos generados por esa estimulación, se transmiten por los nervios segmentarios y por vías específicas dentro del sistema nervioso central (SNC) hasta los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo (Harris, 1948; Cross y Harris, 1952; Cross, 1961). Las neuronas de estos núcleos constituyen la vía final común del reflejo de evacuación. En ellas se lleva a cabo la síntesis, procesamiento y finalmente, a partir de sus terminales axónicas, la liberación de la

oxitocina a la circulación. Esta hormona, al llegar a la glándula mamaria se une a receptores específicos localizados en las células mioepiteliales (Soloff, 1985). El acoplamiento de la oxitocina con su receptor induce la contracción del mioepitelio que rodea a los alveolos y conductos pequeños de la glándula mamaria. La presión intraalveolar aumenta y se expelle la leche de los alveolos hacia los conductos mayores o, en su caso, hacia la cisterna glandular mamaria (Grosvenor y Mena, 1974).

#### c) Secreción de oxitocina y evacuación láctea.

Por su acción contráctil sobre el mioepitelio mamario, se puede determinar indirectamente la oxitocina secretada, ya sea mediante el registro de la presión intramamaria (PIM) en el animal anestesiado, o bien por la cantidad de leche evacuada de la glándula durante un periodo de succión, tanto en animales concientes como anestesiados. En años recientes, se han medido mediante el radioinmunoanálisis (RIA) específico los niveles circulantes de oxitocina secretados en respuesta a la succión o la ordeña en diversas especies.

Las especies estudiadas mediante el RIA incluyen a la rata, el conejo, la oveja, la vaca, el puerco, la cabra, el cobayo y el hombre (Mena y col, 1985). Las concentraciones circulantes de oxitocina que se han detectado son muy variables. En general, la concentración de la hormona en la circulación aumenta rápidamente después de iniciarse la estimulación mamaria. Tal aumento, sin embargo, es de corta duración y a menudo decae aun y cuando la estimulación de la glándula mamaria continúe. La magnitud de los incrementos de la hormona en el plasma varía entre los individuos (hasta 10 veces por encima del nivel testigo), y los niveles previos a la estimulación tienden a ser mayores que los observados en animales no lactantes.

En todas las especies estudiadas existe una marcada uniformidad del proceso de evacuación láctea en cuanto a la responsividad del mioepitelio a la oxitocina y a la

liberación refleja de la hormona por la estimulación mamaria. Esto sugiere que la liberación de oxitocina es esencial para la evacuación láctea en todas las especies.

Sin embargo, con el empleo de diversas técnicas experimentales, se sabe que el reflejo es esencial para la evacuación láctea normal en la rata, el conejo, el gato, el perro, el puerco y el hombre; y no lo es en los rumiantes domésticos como la cabra, la oveja y la vaca (Cowie y Tindal, 1971; Cross, 1961; Grosvenor y Mena, 1974). La causa principal de esta diferencia reside en las variaciones anatómicas de la glándula mamaria entre las especies. Así, la existencia de cisternas con gran capacidad de almacenamiento de leche en los rumiantes y la ausencia de las mismas en las otras especies, establece la principal diferencia ya que la salida de la leche cisternal no requiere de la acción de la oxitocina (Cowie y Tindal, 1971; Cross, 1961). Razones de menor peso, que se aplican a otras especies y no solo a los rumiantes, son la falta de correlación temporal entre la liberación de oxitocina y la evacuación láctea, así como algunas características funcionales de las glándulas mamarias que permiten la evacuación de leche sin la intervención de la oxitocina. Estas características son la capacidad de contracción de las células mioepiteliales por su estimulación mecánica directa y/o por la distensión alveolar, la densidad y potencia de los receptores mamarios a la oxitocina; y la existencia, especialmente en rumiantes, de kininas plasmáticas capaces de provocar la contracción del mioepitelio mamario (Peeters y col, 1972).

El hecho de que la oxitocina no sea esencial para la evacuación láctea normal en algunas especies, aunado a la existencia de mecanismos alternativos capaces de potenciar y/o inducir la evacuación láctea, así como a la presencia de una influencia autonómica reguladora del proceso de evacuación, hacen evidente la necesidad de revisar conceptos tradicionales y plantear hipótesis integrales del fenómeno para las diferentes especies.

El estudio del reflejo de evacuación láctea en especies de laboratorio como la rata y la coneja lactantes ha

permitido caracterizar algunos aspectos relevantes de la fisiología del fenómeno. Fuchs y colaboradores (1984) mostraron que la liberación de oxitocina en la coneja lactante está íntimamente relacionada con la eficiencia de la evacuación láctea, con la intensidad y características de la succión y con la fase del ciclo de lactancia. Asimismo, mostraron que la succión provocó la liberación de PRL, pero no de oxitocina, en condiciones de estrés. Este dato apoya el concepto de inhibición central selectiva del reflejo de evacuación láctea propuesto por Cross (Cross, 1955) hace muchos años.

En la rata lactante el reflejo de evacuación láctea se ha estudiado con cierta amplitud. Para esto se han utilizado diversos métodos que incluyen: la succión en animales concientes o anestesiados y la determinación del aumento de peso de las crías; la estimulación eléctrica de nervios segmentarios, el registro electrofisiológico de la vía final común y el registro de la PIM en animales anestesiados; así como también la medición por medio del RIA de la concentración circulante de oxitocina, etc. En un estudio realizado en ovejas Richard (1970) mostró que la estimulación eléctrica de los nervios inguinales o la dilatación vaginal generaba potenciales de acción en el tallo hipofisiario. En algunos casos, dichos potenciales estuvieron asociados a elevaciones de la PIM debidas aparentemente a liberación de oxitocina (Richard, 1970).

En estudios con ratas lactantes se ha observado que la succión por 6 crías durante 30 minutos eleva la concentración circulante de oxitocina inmunodetectable. Este incremento alcanza su máximo a los 5 minutos de estimulación e inmediatamente después declina a pesar de la persistencia del estímulo aferente. En contraste con este perfil de la secreción hormonal, las crías obtienen la mayor parte de la leche contenida en las glándulas durante la parte tardía del período de succión de 30 minutos (Goodman y Grosvenor, 1983). Estos resultados muestran que la rata presenta una situación opuesta a la de la coneja, en la cual las crías obtienen la leche inmediatamente después de haber empezado a succionar.

En una serie de estudios sobre la evacuación láctea en la rata, Lincoln, Wakerley y colaboradores (Lincoln y Paisley, 1982; Lincoln y Russell, 1985; Wakerley y col, 1988) han hecho diversas contribuciones que se han revisado recientemente.

De acuerdo al trabajo de estos investigadores:

a) la evacuación láctea en la rata ocurre de manera intermitente, a intervalos regulares de 2 a 10 minutos durante la succión continuada de las crías y cada evacuación es provocada por la liberación de pulsos de oxitocina correspondientes a 0.5 a 1 mU;

b) cada pulso de oxitocina liberada es generado por una aceleración de la frecuencia de descarga de las neuronas neurohipofisiarias;

c) la latencia inicial así como el intervalo entre las evacuaciones se determina por factores centrales;

d) la liberación de oxitocina ocurre asociada a un estado de sueño, siendo inhibida durante los estados de alerta;

e) la vía neural del reflejo es activada por mecanismos sinápticos que involucran a la noradrenalina (NA), acetilcolina (ACh) y dopamina (DA); y finalmente,

f) la evacuación láctea refleja es inhibida por péptidos opiáceos en el lóbulo posterior de la hipófisis, y por NA a través de receptores  $\beta$ -adrenérgicos dentro del SNC.

Mena y colaboradores (1978) usaron la estimulación eléctrica de un nervio mamario y el registro de la PIM en la rata anestesiada para analizar la relación que existía entre la liberación de oxitocina y la contracción mamaria. Estos autores determinaron que pulsos de 1 mseg de duración y 15 Hz durante 5 a 10 seg provocaban elevaciones de la PIM equivalentes a las inducidas por 50 a 400  $\mu$ U de oxitocina. Estas respuestas se suprimían por hipofisectomía o sección espinal y, después de cada estimulación, las respuestas de PIM podían repetirse a intervalos de 20 a 40 seg. Adicionalmente estos autores determinaron que la

administración endovenosa (IV) del bloqueador  $\beta$  adrenérgico (propranolol) y el aumento del volumen intraglandular, aumentaban la incidencia de respuestas positivas a dicha estimulación eléctrica. Estos resultados indicaban que la liberación de oxitocina por la estimulación aferente podía inducirse repetidamente por la estimulación eléctrica del nervio mamario. Si bien, la detección de dicha liberación podía estar condicionada al grado de llenado y al tono simpático de la glándula mamaria.

Tiempo después, mediante el RIA, se ha confirmado que la oxitocina se libera por la estimulación eléctrica de un nervio mamario. La administración IV de propranolol aumenta la incidencia y la magnitud de la liberación de oxitocina y dicha respuesta puede obtenerse repetidamente en el mismo animal (Mena y col, 1985).

Con estos estudios, Mena y colaboradores (1978, 1985) refutaron la hipótesis del grupo de Lincoln, acerca de la inhibición central de la secreción de oxitocina que estaría antagonizando a la estimulación aferente proveniente de la glándula mamaria y que sería el mecanismo para explicar el retardo y el carácter intermitente de la evacuación láctea.

Así, Mena y colaboradores (1985), concluyeron que el hecho de que las crías no obtengan la leche durante los primeros minutos de succión a pesar del aumento en el nivel circulante de oxitocina sugería la existencia de mecanismos periféricos inhibitorios que podrían antagonizar la acción de la oxitocina sobre el mioepitelio mamario e inhibir la evacuación láctea.

#### d) Regulación autonómica de la evacuación láctea.

Desde hace tiempo se han acumulado evidencias experimentales de diverso tipo que apoyan la hipótesis de que la glándula mamaria es un efector autonómico y que la evacuación láctea en particular está regulada fisiológicamente por la división simpática del sistema nervioso autónomo (Cross, 1961; Grosvenor y Mena, 1982;



Lefcourt y Akers, 1983).

Ahora bien, es evidente que a la luz de conceptos actuales de funcionamiento integrado e interdependiente de los sistemas nervioso central y endocrino, resulta obsoleta la compartimentalización de cada sistema y la limitación conceptual consecuente. Por lo tanto, dada la importancia evolutiva de una función como la lactancia, es fácil suponer que existen mecanismos redundantes que aseguren la eficiencia de tal función, aún y cuando sea necesario conocer las interrelaciones funcionales de tales mecanismos para dilucidar su importancia relativa.

Ya que la evidencia que apoya la participación simpática sobre la evacuación láctea ha sido ampliamente revisada por varios autores (Mena y col, 1985; Lefcourt y Akers, 1983), a continuación señalo solo algunos aspectos relativos a la activación fisiológica autónoma asociada a la evacuación láctea.

El sistema nervioso simpático puede influir en la evacuación láctea tanto mediante las catecolaminas circulantes como por medio de la inervación simpática que llega al músculo liso de los conductos y de los vasos sanguíneos mamarios.

Se ha observado que la activación del sistema simpático o la administración de catecolaminas provoca una vasoconstricción en la glándula mamaria que reduce el acceso de las hormonas a la glándula mamaria (Hebb y Linzell, 1951; Linzell, 1974). También, la activación simpática induce la constricción de los conductos mamarios con lo cual se antagoniza la acción de la oxitocina ya que se dificulta la salida de la leche (Findlay y Grosvenor, 1969; Grosvenor y col, 1972; Hebb y Linzell, 1966). Además se ha propuesto que las catecolaminas pueden inhibir directamente la acción de la oxitocina sobre el mioepitelio glandular (Chan, 1965; Moore y Zarrow, 1965).

La acción de los agentes simpáticos adrenalina (ADR) y NA sobre la evacuación láctea puede ser ejercida sobre la glándula mamaria a través de receptores  $\alpha$  o  $\beta$  adrenérgicos por medio de una vaso y/o ductoconstricción mamaria,

respectivamente. Se sabe que el efecto inhibidor periférico  $\alpha$  adrenérgico puede ser ejercido por una vasoconstricción mamaria, lo que impediría la llegada de la oxitocina a la glándula mamaria, y se ha sugerido una acción  $\beta$  adrenérgica que podría inducir vasodilatación (Bisset y col, 1967; Vorherr, 1971; Lefcourt y Akers, 1983). Asimismo, la acción inhibidora periférica  $\beta$  adrenérgica puede ejercerse por medio de una ductoconstricción, lo cual antagonizaría el desplazamiento de la leche por los conductos de la glándula mamaria (Grosvenor y Findlay, 1968; Bisset y col, 1967; Vorherr, 1971).

Recientemente se ha descrito la presencia de receptores  $\beta$ -adrenérgicos en las células epiteliales, alveolos, conductos y adipocitos de la glándula mamaria de la rata. La cantidad y distribución de tales receptores en la glándula mamaria varía de acuerdo a diferentes estados fisiológicos del animal, lo cual sugiere que los receptores  $\beta$ -adrenérgicos de la glándula mamaria son sensibles a cambios hormonales y pueden constituir un mecanismo para la influencia directa o indirecta de las catecolaminas sobre el desarrollo y funcionamiento de la misma (Marchetti y col, 1990; Marchetti y Labrie, 1990).

Por otro lado, se sabe que a nivel central la NA puede estimular o inhibir la evacuación láctea a través de receptores  $\alpha$  o  $\beta$  adrenérgicos respectivamente (Cross y col, 1971; Tribollet y Dreifuss, 1977; Moos y Richard, 1979b). Estos efectos (periféricos y centrales) potencialmente antagónicos de la NA sobre la evacuación láctea sugieren que su acción inhibidora periférica puede compensarse por su acción estimuladora central.

A partir de esto, puede pensarse que cambios en el tono simpático regulan la evacuación láctea por medio de diversos mecanismos.

Desde hace tiempo se sabe que en cabras y vacas la estimulación de receptores mamaros activa de manera refleja al sistema motor inhibidor (simpático) de la glándula mamaria (Cowie y Tindal, 1971; Cross, 1961). Asimismo, se ha descrito

que la estimulación eléctrica del pezón en cabras y la ordeña en vacas, dan lugar a la elevación en la concentración circulante de catecolaminas (Kuanyshbekova, 1976; Barowicz, 1979a; Ewy y Barowicz, 1981). Estos resultados indican que el sistema simpático adrenal puede activarse de manera refleja por la estimulación fisiológica de la glándula mamaria.

En estudios en ratas lactantes se ha encontrado que el sistema simpático adrenal puede activarse por la estimulación eléctrica de un nervio mamario o por la estimulación mecánica (compresión manual de dos glándulas torácicas) en ratas anestesiadas (Mena y col, 1979; Grosvenor y Mena, 1979). También se ha encontrado que la activación eléctrica del simpático puede inhibirse mediante la activación de receptores ductales (Mena y col, 1979). El indicador de la activación simpática empleados en estos estudios fue el registro de la respuesta de PIM a la oxitocina exógena.

Se ha observado que durante la estimulación eléctrica prolongada de un nervio mamario se deprimen las respuestas de PIM a dosis IV de oxitocina. Dicha depresión desaparece después de a) adrenalectomizar al animal, b) administrar sistémicamente propranolol, c) aumentar el volumen intraglandular de la glándula registrada o, d) introducir un pequeño volumen de leche en una glándula torácica distante a la que se registra (Mena y col, 1979). Finalmente, al seccionar la médula espinal, la estimulación del nervio aumenta las respuestas de PIM a la oxitocina exógena, en lugar de disminuirlas (Mena y col, 1979).

Estos resultados indican que la estimulación del nervio mamario provoca la activación refleja del sistema simpático. Los efectos inhibidores de dicha activación pueden contrarrestarse ya sea, localmente al aumentar el volumen de leche intraglandular o bien de manera refleja mediante la estimulación de mecanorreceptores activados en respuesta a la dilatación ductal. De esta manera se demostró en el nervio mamario existen componentes tanto facilitadores como inhibidores del tono ductal.

Asimismo, cuando se utilizó la estimulación manual de las glándulas mamarias, se obtuvo también una activación

simpática similar a la observada con la estimulación eléctrica del nervio mamario. Este efecto fue parecido al producido por la inyección sistémica de ADR y fue bloqueado por la anestesia local de la región estimulada (Grosvenor y Mena, 1979).

En apoyo a estos estudios, demostramos que la estimulación eléctrica del nervio mamario provoca la liberación a la circulación de ADR suprarrenal aunque no de NA. Dicha liberación de ADR no ocurrió cuando la estimulación del nervio fue precedida unos minutos antes por la inyección intraductal de un pequeño volumen de leche en una glándula torácica (Clapp y col, 1985; Mena y col, 1985)

Además, determinamos los niveles circulantes de catecolaminas en ratas despiertas, succionadas durante 10 minutos por sus crías. Los resultados mostraron que las concentraciones circulantes de NA y de ADR aumentaron significativamente por arriba del valor testigo, y que tal incremento sucedió desde los primeros minutos de la succión (Clapp y col, 1985). Un indicador complementario de la activación simpática en estos experimentos fue el de que estos animales mostraron una piloerección clara durante todo el período de succión de 30 minutos.

En vista de estos resultados, es claro que en la rata lactante las catecolaminas se liberan a la circulación durante la succión, de manera similar a lo que parece ocurrir en otras especies. Dicha liberación se añade a la lista de reflejos neuroendocrinos activados durante la succión en animales lactantes.

Teniendo en cuenta la información anterior, planteamos la posibilidad de que variaciones en la liberación de catecolaminas en el SNC o acciones de las catecolaminas circulantes en la periferia, ya sea sobre la neurohipófisis (Barowicz, 1979b; Shu-Lang Song y col, 1988) o sobre la glándula mamaria, estén influyendo en la secreción de oxitocina y la contractilidad mamaria (Mena y col, 1985).

Así, la hipótesis de trabajo en nuestro laboratorio, considera que la evacuación láctea en la rata se inicia cuando se facilita la acción oxitocinérgica por la activación

de receptores ductales, capaces de inhibir la liberación refleja de catecolaminas, y que puede existir una acción directa del SNC sobre el tono ductal de la glándula mamaria.

Analizamos esta acción del SNC sobre el tono ductal de la glándula mamaria y los resultados obtenidos se presentan en la sección de Resultados y Discusión.

A continuación se revisan aspectos relevantes de la participación del sistema nervioso autónomo en la regulación de la secreción láctea para tener una visión integrativa de la lactancia.

### III) Secreción láctea y prolactina.

Desde hace tiempo se sabe que el inicio y el mantenimiento de la secreción láctea son determinados por las hormonas adenohipofisarias que forman los complejos hormonales lactogénico y galactopoiético (Cowie y col, 1980; Tucker, 1974; Tucker, 1988). De estas hormonas se conoce el papel preponderante que desempeña la PRL en el desarrollo de la glándula mamaria y en la síntesis y secreción de los diferentes componentes de la leche. Por esto, algunos autores (Cowie, 1969) atribuyen la disminución en el volumen de leche que ocurre al final de la lactancia a una menor secreción de PRL.

El ciclo de la lactancia se caracteriza por una fase inicial de incremento de la producción láctea, una intermedia de sostén y otra final de menor producción. Sabemos que al final del ciclo, en la rata y en la coneja lactantes, disminuye la acción trófica de la PRL sobre la glándula mamaria; y ello va unido a una mayor latencia y menores magnitud y duración de la acción estimulante de la PRL sobre la secreción láctea (Mena y col, 1982; Grosvenor y Mena, 1973b; Clapp y col, 1987).

Como se verá mas adelante, existen causas diversas que determinan los cambios neuroendocrinos de finales de la lactancia, y entre ellas desempeñan un papel importante las

modificaciones cualitativas y cuantitativas de la estimulación aferente que recibe la madre durante la succión por las crías.

a) Importancia de la prolactina en la secreción láctea.

La importancia relativa de la PRL en la síntesis de leche por las glándulas mamarias se ha determinado usando animales lactantes intactos o hipofisectomizados. En esta última condición, desde hace tiempo se conoce que las hormonas necesarias para restituir la función varían entre las especies, aunque siempre ha sido necesario incluir a la PRL en el tratamiento sustitutivo (Cowie y Tindal, 1971). Por otra parte, en un caso extremo como el del conejo, la PRL por sí sola es capaz de restituir la lactancia después de la hipofisectomía (Cowie y col, 1969). En otras especies como la rata es necesario administrar adrenocorticotropina (ACTH) y hormona de crecimiento (GH) además de PRL para obtener el mismo resultado (Cowie y Tindal, 1961).

Una vez iniciada la lactancia, la madre queda sometida a la acción reguladora de los estímulos externos proporcionados por las crías (succión y estimulación exteroceptiva), los cuales mantienen la secreción continuada de las hormonas necesarias para la secreción de leche.

En relación con la secreción de PRL, los estudios en la rata han mostrado que la lactancia depende de modo muy crítico de la frecuencia con que se activa el influjo nervioso aferente. En efecto, la aplicación regular de la succión, con intervalos intersucción no mayores de ocho horas (Grosvenor y Mena, 1971; Grosvenor y col, 1970a; Mena y col, 1980b), determina un nivel adecuado de síntesis de PRL por la hipófisis y una secreción normal de la hormona hacia la circulación, así como el funcionamiento adecuado de los mecanismos hipotálamo-hipofisarios acorde a la demanda de las crías.

Ahora bien, como es de suponerse, las variaciones en la secreción de leche por las glándulas mamarias reflejan en

mayor o menor grado la secreción de PRL por la hipófisis. En apoyo a esto, se ha observado que la secreción de la hormona por la succión no ocurre cuando la misma se aplica en la rata anestesiada (Grosvenor y Mena, 1971); cuando de manera selectiva se ha bloqueado la secreción de PRL mediante extractos hipotalámicos o agonistas dopaminérgicos (Grosvenor y col, 1967b), o cuando la succión es aplicada después de intervalos sin succión excesivamente prolongados (de 16 a 24 hr) (Grosvenor y col, 1970a). En todas estas situaciones se observó una reducción drástica de la producción láctea. La disminución de la secreción láctea en estos animales se pudo evitar mediante la administración previa de PRL, sola o combinada con otras hormonas, como tirotropina (TSH), GH, ACTH y oxitocina (Grosvenor y col, 1970a).

Estos estudios y otros sobre la relación entre la periodicidad de la estimulación aferente y su efectividad para inducir respuestas fisiológicas de secreción de la hormona (Grosvenor y col, 1967a), indican que en la rata lactante existe un paralelismo funcional entre la glándula mamaria y la secreción de PRL por la hipófisis. Desgraciadamente, no tenemos datos similares para otras especies o para otras hormonas y no sabemos si es posible su extrapolación.

**b) Acciones de la prolactina sobre la glándula mamaria.**

El mecanismo de acción de la PRL sobre la glándula mamaria no se conoce plenamente ya que, entre otros aspectos, la síntesis y la incorporación de cada uno de los componentes de la leche secretada han sido analizadas por separado debido a la complejidad de cada mecanismo.

En general, las acciones de la PRL sobre la glándula mamaria pueden agruparse en tres categorías:

- a) estimuladoras de la proliferación del epitelio alveolar,
- b) relacionadas con la diferenciación del tejido secretor, y
- c) relacionadas con la estimulación y el mantenimiento de la función secretora.

Existen revisiones amplias en las que se detallan las

acciones de la PRL en la glándula mamaria (véase: Forsyth, 1986; Linzell y Peaker, 1971; Shiu y Friesen, 1980; Topper y Freeman, 1980; Rillema y col, 1988; Tucker, 1974 y 1988; Wallis y col, 1985), por lo que sólo mencionaré algunas acciones de la PRL relacionadas con el mantenimiento de la secreción láctea.

La PRL estimula la función secretora de la glándula mamaria estimulando de manera generalizada el metabolismo del epitelio alveolar. Esto implica, la estimulación de la síntesis de proteínas, tanto de las secretadas en la leche (caseína,  $\alpha$ -lactalbúmina, etc) como de las enzimas que participan en la síntesis de otros componentes de la leche (lactosa, lípidos específicos de la leche, etc); así como también la estimulación del metabolismo de los lípidos y la regulación del flujo iónico a través del epitelio secretor (Shiu y Friesen, 1980).

#### **b.1) Acción de la prolactina sobre la permeabilidad epitelial de la glándula mamaria.**

Durante la secreción de la leche, la glándula mamaria transporta grandes cantidades de fluido isotónico. El contenido iónico de este fluido es mantenido parcialmente por transporte activo y los principales iones que se encuentran en la leche son  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$ . Con respecto al plasma, la concentración de  $\text{Na}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en la leche es baja y la de  $\text{K}^+$  es alta. En diversos estudios se ha sugerido que la PRL puede estar implicada en el mantenimiento de las diferencias entre la composición iónica de la leche y la del plasma (Cowie, 1969; Taylor y col, 1975; Peaker y Taylor, 1975; Linzell y col, 1975), ya que esta hormona puede modificar el movimiento de iones y moléculas pequeñas, como la lactosa, a través del epitelio mamario (Linzell y col, 1975). La lactosa es el principal azúcar de la leche y por ser un regulador osmótico de la célula mamaria, determina en buena parte el volumen de leche secretada (Linzell y Peaker, 1971).

Desde el punto de vista fisiológico, existe una



hipótesis que permite imaginar la acción de la PRL sobre la secreción de la fase acuosa de la leche y su posible mecanismo de acción en las células alveolares de la glándula mamaria. Linzell y Peaker (1974), han propuesto que la permeabilidad iónica del epitelio secretor mamario involucra dos vías: a) una transcelular, a través de las células, y b) una vía paracelular, en la cual participan las "uniones estrechas" que existen entre las células alveolares.

Estos autores han encontrado que la PRL reduce la permeabilidad de la glándula mamaria a través de esta vía paracelular y así, mantiene la diferencia en la composición iónica de la leche con respecto al plasma (Peaker y Taylor, 1975; Linzell y col, 1975).

En la coneja, al principio de la lactancia, cuando se secreta mayor cantidad de leche (por la acción de la lactosa), la composición iónica de la leche es distinta de la del plasma. Como ya mencioné, en la leche, el  $K^+$  y la lactosa están en mayor concentración que el  $Na^+$  y el  $Cl^-$ .

Sin embargo, al final de la lactancia la composición iónica de la leche tiende a parecerse a la del plasma. En esta fase, decrece la concentración del  $K^+$  y de la lactosa en la leche y aumenta la del  $Na^+$  y del  $Cl^-$ , lo cual se asocia con una menor producción de leche. Esta situación se explica con base en que al principio de la lactancia existe un mecanismo de bombeo que funciona en la membrana basal de la célula alveolar. De esta forma, en la célula se mantiene baja la concentración del  $Na^+$  y del  $Cl^-$  y alta la del  $K^+$  y la lactosa. Al final de la lactancia, esta diferencia de concentraciones se invierte y la hipótesis considera que esto se debe a que se altera la permeabilidad a estos iones ya que se establece una permeabilidad inespecífica a través de la vía paracelular en el epitelio mamario.

Dado que la PRL conserva la permeabilidad de las células alveolares e impide la apertura de la vía paracelular, su menor secreción al final de la lactancia determinaría la reducción del volumen de leche secretada por la apertura de la vía paracelular y la pérdida de lactosa por esta vía.

Por otro lado, (Falconer y Rowe, 1977) observaron que la

incubación con PRL de rebanadas de glándulas mamarias de conejas disminuyó la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$  y aumentó la de  $\text{K}^+$ . Dado que estos efectos de la PRL fueron revertidos con ouabaina, se postuló que involucraban la activación de un transporte activo (ATPasa Na/K) a través de la membrana. Con base en estos resultados, Falconer y Rowe (1977) refutaron la hipótesis de la vía paracelular. Sin embargo, dicha hipótesis explicaría cómo ocurre el tránsito de moléculas mayores entre la leche y el plasma, por lo cual, es evidente su validez.

c) Interrelación entre succión, prolactina y secreción láctea.

Ahora me referiré a la relación temporal que existe entre la liberación de la PRL por la hipófisis y su efecto de estimulación de la producción láctea en la glándula mamaria, así como a la duración e intensidad del efecto de la hormona sobre esta glándula.

Hace años se observó que la secreción láctea continuaba varias horas después de la hipofisectomía en la rata (Cowie y Tindal, 1961), o después de transplantar una glándula mamaria de una cabra lactante a una cabra macho castrada (Linzell, 1971). Como en ambas situaciones experimentales faltaban las hormonas necesarias para mantener la lactancia, se consideró que la persistencia de la secreción láctea se debía a la secreción de PRL o de hormonas hipofisiarias previa al tratamiento quirúrgico. Es importante recordar que en general la vida media de las hormonas adenohipofisiarias en la circulación tiende a ser breve, por ejemplo, la PRL en la rata tiene una vida media de 3 a 5 minutos. Sin embargo, su efecto se manifiesta muchas horas después de haber desaparecido de la circulación.

En estudios recientes realizados en la rata lactante se ha determinado con cierta precisión el período de latencia de la acción de la PRL y la cantidad mínima de hormonas necesarias para producir un efecto óptimo sobre la glándula

mamaria. Así, los resultados mostraron que después de la secreción de PRL por la estimulación natural, o bien después de que se administra PRL en forma exógena, es necesario esperar de 8 a 12 horas para que las glándulas mamarias produzcan la leche correspondiente a dicha estimulación hormonal (Grosvenor y Mena, 1973b). Una vez conocido el período de latencia, en estudios subsecuentes se determinó la cantidad mínima o umbral de hormona, suficiente para producir un efecto óptimo en la secreción láctea. Los resultados mostraron que una cantidad muy pequeña de solo 2  $\mu$ g de dosis total era suficiente para producir un efecto óptimo. Estos 2  $\mu$ g de PRL fueron administrados por vía IV en dosis de 400 ng/min durante 5 minutos. Cuando se administraron 400 ng/min durante 4 minutos o 200 ng/min durante 10 minutos, sólo se obtuvo un efecto parcial (Grosvenor y col, 1975). Por otra parte, cuando se aplicó un período de succión de 5 minutos, que por otros estudios (Grosvenor y col, 1979) se sabe que induce la secreción de 400-500 ng/min de PRL, se encontró una estimulación óptima de la secreción láctea.

En conjunto, estos estudios muestran que la secreción láctea es un proceso continuo gracias al efecto sostenido y acumulativo de la PRL sobre la glándula mamaria. Asimismo, indican que la hormona tiene un período de latencia determinado para producir su acción sobre el efector. Conociendo este período se puede decir que la cantidad de hormona para producir un efecto óptimo es realmente muy baja.

Mena y colaboradores (1982), han determinado la latencia, magnitud y duración del efecto de la PRL sobre la glándula mamaria de la coneja. Estos autores han precisado que la acción de esta hormona en esta especie tiene un período de latencia equivalente al observado en la rata. Además, han mostrado que la duración del efecto de la PRL (de 24 a 32 hr), explica porqué en la coneja, una succión diaria que provoca la secreción de la hormona es suficiente para mantener la lactancia normal (Mena y col, 1982). Se ha sugerido, que el período de latencia, o también llamado período inductivo de la PRL, en otras especies de mamíferos, debe ser similar al de la rata y la coneja, ya que estas

especies estarían en los extremos de la relación frecuencia de succión/latencia de acción de la hormona.

Al final de la lactancia, la producción de leche disminuye de manera natural y es posible que esto se deba a una modificación en los parámetros de latencia, magnitud y duración del efecto de la PRL.

Estudios hechos en ratas mostraron que, si bien el período de latencia no se modificaba durante la fase final de la lactancia, la cantidad mínima necesaria de hormona para producir un efecto óptimo era 4 a 5 veces mayor que la requerida a principios de la misma (Grosvenor y Mena, 1973b).

Por otra parte, se sabe que al final de la lactancia la secreción de PRL es menor (Cowie, 1969; Linzell y Peaker, 1971), y se ha sugerido que la reducción de leche se debe a esta disminución de PRL y a una alteración del efecto de ésta sobre la glándula mamaria.

A continuación se revisan algunos estudios recientes sobre el análisis de los mecanismos que determinan estas alteraciones.

#### d) Regulación de la lactancia al final del ciclo.

Ahora me referiré a las variaciones que con respecto a los estímulos externos como la succión y la estimulación exteroceptiva, ocurren normalmente durante la lactancia y que posiblemente contribuyen a determinar el final del ciclo.

Como ya mencioné, en la rata lactante el control hipotálamo-hipofisiario de la secreción de PRL está influenciado por la succión y por la estimulación exteroceptiva provenientes de las crías. Sin embargo, la estimulación exteroceptiva, a diferencia de la succión, provoca la secreción de PRL sólo durante las fases intermedia y final del ciclo de lactancia, es decir durante la 2ª y 3ª semanas postpartum (Grosvenor y col, 1970b).

Por esta característica se ha considerado que el estímulo exteroceptivo opera por un condicionamiento de la madre que asocia el estímulo de la succión por las crías con

la presencia de ellas. A partir de la segunda semana y hasta el final del ciclo de lactancia, aumenta la sensibilidad del mecanismo exteroceptivo de la secreción de PRL (Mena y Grosvenor, 1972), con lo cual la secreción de la hormona por la hipófisis y la respuesta de la glándula mamaria alcanzan un alto grado de funcionalidad. Además, la succión en cuanto a frecuencia se refiere, tiende a espaciarse debido al desarrollo de las crías que gradualmente se independizan de la madre para su nutrición.

Al final de la lactancia, sin embargo, aparece un mecanismo adicional de tipo exteroceptivo, decisivo para el cese de la misma. En esta fase la estimulación exteroceptiva de las crías, además de provocar la secreción de la PRL, activa un mecanismo periférico inhibitorio que interfiere con la acción estimulante de la PRL sobre la glándula mamaria (Grosvenor y col, 1977; Grosvenor y Mena, 1973a). Como consecuencia de este efecto paradójico de la estimulación exteroceptiva, la PRL, aunque se secreta a la circulación, no llega a estimular a la glándula mamaria y por lo tanto, ocurre una menor secreción de leche al final del período.

En otros estudios se ha determinado que el mecanismo de esta inhibición de origen exteroceptivo es de naturaleza simpática, ya que la estimulación exteroceptiva de las crías aumentó la producción láctea cuando se administraron drogas simpaticolíticas a ratas que se encontraban al final de la lactancia (Grosvenor y col, 1977).

Estos resultados obtenidos en la rata a lo largo del ciclo de la lactancia, indican la importancia relativa de los estímulos externos en la regulación de las primeras fases del ciclo. Así, al principio del ciclo, cuando las crías dependen completamente de la leche materna, estos estímulos aumentan la funcionalidad del sistema hipotálamo-hipófisis-glándula mamaria, para que se satisfaga la demanda de leche. A medida que avanza el ciclo y que las crías dependen menos de la madre para su subsistencia, succionan menos frecuentemente, pero como compensación se hace efectiva entonces la estimulación exteroceptiva. De este modo, a pesar de la menor frecuencia con que succionan las crías, se sigue produciendo

leche y se evita la disminución nutricional de la fuente materna. Sin embargo, al final del ciclo las crías son mas independientes de la madre y su nutrición proviene de otras fuentes. Es entonces cuando el estímulo exteroceptivo activa un mecanismo, aparentemente de naturaleza simpática, que impide que la PRL estimule a la glándula mamaria.

Se ha observado que si se modifica experimentalmente la frecuencia de succión en la coneja, de acuerdo a la fase de la lactancia en que se realiza la operación, se obtienen efectos distintos. Así, el incremento de la succión al inicio de la lactancia se acompaña de un aumento de la secreción láctea, mientras que la misma maniobra al final del ciclo resulta en una reducción de ella (Mena y col, 1981). Incrementos aún mayores en la frecuencia de la succión al inicio del ciclo, traen consigo una desaparición del efecto estimulante. Dichos efectos inhibitorios al principio y al final de la lactancia, se contrarrestan por la administración exógena de PRL o de drogas simpaticolíticas. Considerando estos datos, Clapp y col, (1987) propusieron que:

a) la succión ejerce influencias galactotróficas y galactolíticas al principio y al final del ciclo de la lactancia, respectivamente;

b) el umbral para activar influencias galactolíticas es menor al final de la lactancia;

c) la acción galactolítica de la succión se ejerce, entre otros posibles mecanismos, antagonizando la acción estimulante de la PRL sobre la glándula mamaria y,

d) que dicho antagonismo parece ser mediado por el sistema nervioso simpático.

Se desconoce el mecanismo íntimo de naturaleza simpática que en la rata y en la coneja parece ser responsable de la inhibición de la secreción láctea al final del ciclo. Sin embargo, como ya mencioné anteriormente, la activación del sistema simpático o la administración IV de catecolaminas provoca una vasoconstricción en la glándula mamaria. Esto traería como resultado una reducción del acceso de las hormonas a la glándula (Hebb y Linzell, 1951) y de los precursores indispensables para la síntesis de la leche

(Linzell, 1974).

Por otro lado, la hipótesis de Linzell y Peaker (1971) considera que la menor secreción láctea al final del ciclo se debe a que la reducción en la secreción de PRL altera la permeabilidad de la membrana alveolar mamaria por la apertura de una vía paracelular en la membrana apical.

En un estudio en ratas lactantes, Mena y colaboradores (1974) observaron que la administración de dosis grandes (2-4 U) de oxitocina deprimía la secreción láctea. Encontraron que la sección espinal o la administración de drogas simpaticolíticas bloqueaban la acción inhibitoria de la oxitocina y propusieron que dicha acción de la oxitocina se ejercía por medio de un mecanismo simpático. Por otra parte, Linzell y Peaker (1971) en una serie de estudios en cabras utilizaron también dosis grandes de oxitocina para producir inhibición de la secreción láctea. Mostraron que el mecanismo de dicha inhibición era precisamente inducir la apertura de la vía paracelular en la membrana apical de la célula alveolar mamaria.

Estos resultados apoyan la hipótesis de que la activación simpática fisiológica inducida por la estimulación exteroceptiva al final de la lactancia de la rata y la coneja, y que determina el cese de la función, se puede deber en parte a una alteración en la permeabilidad de la membrana alveolar de la glándula mamaria.

#### OBJETIVO DE LA TESIS

En general, la finalidad de nuestro trabajo de investigación es la de estudiar la regulación de la lactancia, con énfasis particular en los mecanismos neurohumorales que llevan a cabo esta regulación.

Dado que, como hemos visto, el estímulo de la succión es responsable de activar diversos mecanismos que regulan la secreción y la evacuación láctea, en la presente tesis se ha planteado el objetivo de investigar algunos de los mecanismos

neurohumorales que en el SNC regulan la lactancia.

La regulación de la secreción y la evacuación láctea es compleja y en ella participan mecanismos neurales y humorales diversos, como son: a) las hormonas hipofisiarias (PRL, oxitocina, etc.); b) el sistema nervioso autónomo, a través del sistema simpático adrenal y de la inervación mamaria; c) mecanismos locales particulares de la glándula mamaria (mecanorreceptor ductal); y d) mecanismos centrales adrenérgicos de regulación neural que pueden regular el funcionamiento del aparato motor de la glándula mamaria.

Por todo lo anterior, los objetivos generales de este estudio están orientados a determinar en qué grado participan los mecanismos centrales adrenérgicos y peptidérgicos en la contractilidad de la glándula mamaria.

Los objetivos específicos de la presente tesis son los siguientes:

a) Determinar el efecto de aplicar por vía intracerebroventricular (ICV) agonistas y antagonistas adrenérgicos sobre la contractilidad de la glándula mamaria en respuesta a la oxitocina.

a.1) Determinar cómo interactúan los mecanismos centrales  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos sobre la contractilidad de la glándula mamaria.

a.2) Determinar si existe una interacción entre la activación del mecanorreceptor ductal y los efectos centrales inhibidor y facilitador del tono ductal de los agonistas  $\alpha$  (NA) y  $\beta$  adrenérgicos (isoproterenol, ISOP), respectivamente.

b) Determinar si las hormonas hipofisiarias que se liberan durante la succión a la circulación, y supuestamente al líquido cefalorraquídeo, pueden influir directa o indirectamente en la evacuación láctea. De dichas hormonas, en la presente tesis estudiamos si la administración por vía ICV de oxitocina y PRL, puede modificar la contractilidad de la glándula mamaria a la oxitocina exógena; y si sus efectos pueden deberse a mecanismos adrenérgicos.

Para este estudio utilizamos la vía ICV ya que es una



ruta directa de acceso al SNC, cuya activación puede obtenerse con la administración de catecolaminas u otros neurotransmisores. Esta activación neural puede repercutir en el funcionamiento de la glándula mamaria mediante mecanismos neuroendocrinos como la secreción de oxitocina, o bien mediante la inervación simpática de la glándula.

Por otro lado, el líquido cefalorraquídeo puede ser un vehículo para la comunicación neuroendocrina y transportar moléculas biológicamente activas a lo largo del eje cerebroespinal, a otras regiones del SNC, o bien a la hipófisis (Knigge y col, 1980).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### 1) Factores neurales y hormonales que regulan la contractilidad de la glándula mamaria de la rata en respuesta a la oxitocina.

Como mencioné previamente, la tasa y magnitud de la evacuación láctea dependen de la cantidad de oxitocina que llega por vía sanguínea al mioepitelio efector, de la sensibilidad de éste a la hormona y de la resistencia del sistema de conductos a la salida de la leche (Mena y col, 1985). También describí a grandes rasgos nuestra hipótesis de trabajo sobre la regulación de la evacuación láctea en la rata. En esta hipótesis desempeñan una función primordial: a) la liberación de oxitocina por el estímulo de la succión, b) la activación del sistema simpático adrenal por el mismo estímulo y c) los mecanorreceptores ductales que facilitan la acción oxitocinérgica en el mioepitelio mamario al inhibir la activación simpática.

Por otro lado, en esta sección se presentan los resultados obtenidos con el análisis de los mecanismos centrales de naturaleza adrenérgica y peptidérgica que

regulan el tono ductal de la glándula mamaria de la rata por medio de la inervación eferente mamaria. Para esto utilizamos ratas lactantes (día 7 a 15pp) implantadas previamente con una cánula guía a cada ventrículo lateral cerebral. En el día del experimento las ratas fueron anestesiadas con uretano (Apéndice I), se les administró oxitocina por vía IV y se les registró la PIM en una glándula mamaria abdominal. De esta manera, se estudió la sensibilidad del mioepitelio a la oxitocina y la resistencia que opone el sistema ductal mamario a la salida de leche.

a) Estudios sobre el sistema regulador central del aparato motor de la glándula mamaria.

Para analizar los mecanismos centrales adrenérgicos que regulan la contractilidad mamaria, administramos pequeñas cantidades de ADR, NA, ISOP y DA, en un ventrículo lateral cerebral. Determinamos los efectos de estos fármacos sobre las respuestas de la glándula mamaria a la oxitocina exógena mediante el registro de la PIM. Como se puede observar en la figura 2, la administración ICV de ADR (0.5-8  $\mu$ g) aumentó la amplitud de respuesta de la glándula mamaria a la oxitocina exógena. Dicho efecto fue reversible y dependiente de la dosis.

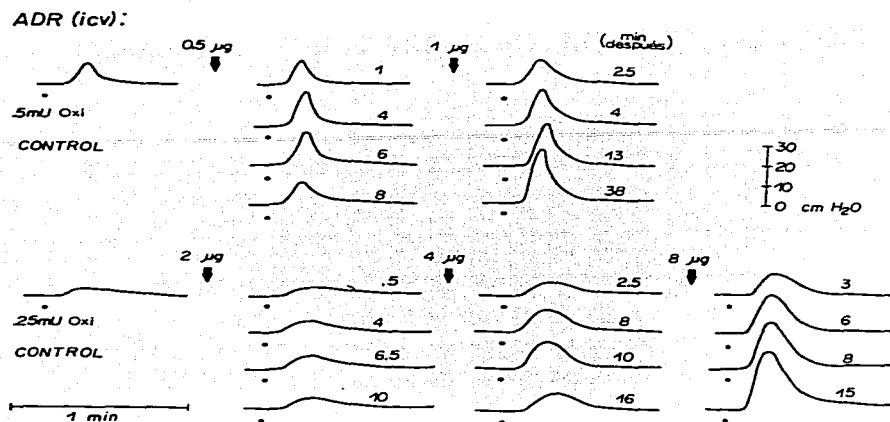


Fig.2. Respuestas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada. A las ratas se les administraron dosis de oxitocina IV (indicadas por los puntos debajo de cada registro), antes y después de diferentes cantidades de adrenalina (ADR) (indicadas por las flechas) en un volumen de 1  $\mu$ l, aplicadas en un ventrículo lateral cerebral (ICV). Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Dada la similitud de estos resultados con los obtenidos por la supresión, quirúrgica o farmacológica, del tono simpático (Grosvenor y col, 1972), se analizó el efecto de administrar ADR ICV en el animal hipofisectomizado. Los resultados obtenidos mostraron que el efecto también se obtuvo en dicha preparación (Fig. 3).

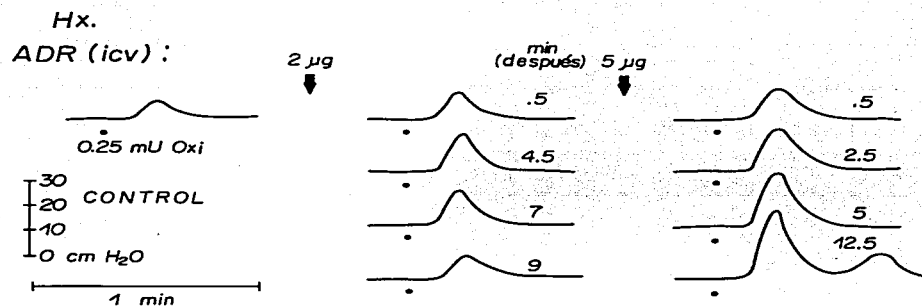


Fig. 3. Efecto de la inyección de adrenalina (ADR) por vía ICV en una rata lactante anestesiada, hipofisectomizada 3 hr antes, sobre las respuestas de PIM a la inyección de oxitocina (indicada por los puntos debajo de cada registro). Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Posteriormente aplicamos NA, ISOP y DA por vía ICV en el animal intacto. Encontramos un efecto similar al de la ADR para la NA y la DA; y un efecto de disminución en la amplitud de las respuestas con el ISOP (Fig. 4).

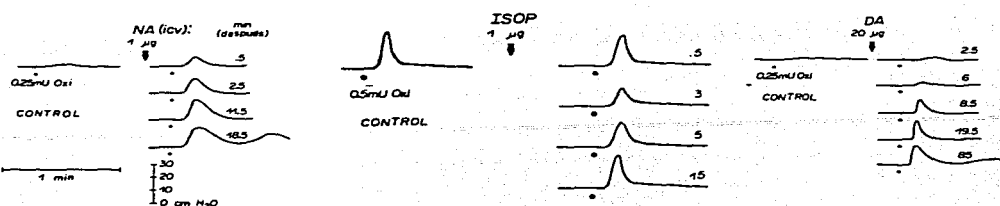


Fig. 4. Respuestas representativas de PIM de glándulas abdominales de ratas lactantes anestesiadas, antes y después de aplicar diferentes cantidades de noradrenalina (NA), isoproterenol (ISO) y dopamina (DA) (indicado por las flechas), en un volumen de  $1\mu\text{l}$ , en un ventrículo lateral cerebral (ICV).

En estudios previos se habían reportado efectos de estimulación o inhibición de la evacuación láctea por la aplicación ICV de estas y otras sustancias, en dosis similares o aún mayores que las utilizadas por nosotros (Tribollet y col, 1978; Clarke y col, 1979; Moos y Richard, 1979a). En todos los casos se reportó que estos efectos se debían a la interacción de estas sustancias con la secreción de oxitocina y que en ningún caso se modificó la responsividad de la glándula mamaria a la oxitocina exógena.

Si bien nuestros resultados no eliminan la posibilidad de que estas sustancias modifiquen la secreción de oxitocina, sí indican que existen mecanismos independientes de la oxitocina que son responsables de los efectos observados.

En vista de estos resultados, determinamos si los efectos de las catecolaminas podían transmitirse por la inervación directa de la glándula mamaria. Para esto,

seccionamos las raíces ventrales correspondientes y registramos simultáneamente dos glándulas mamarias abdominales, una de las cuales quedaría sujeta a desnervación. En este experimento se encontró que la desnervación bloqueó los aumentos o disminuciones de la amplitud de las respuestas de PIM a la oxitocina exógena obtenidas por la administración ICV de ADR, NA o ISOP ya que tal efecto estuvo limitado a la glándula desnervada; mientras que los efectos de las drogas administradas aún se obtuvieron en la glándula intacta (Fig. 5).

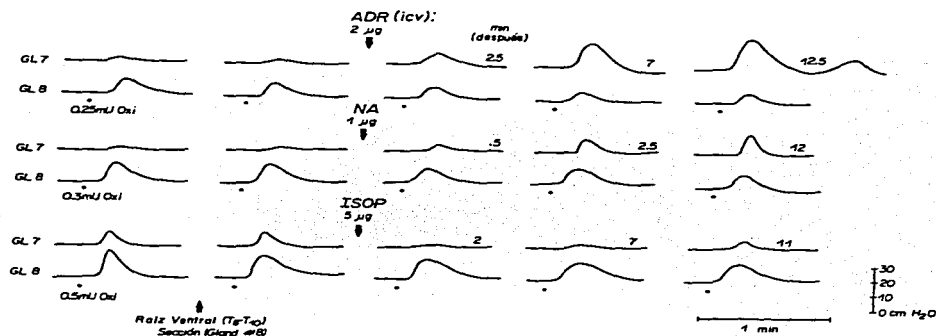


Fig. 5. Respuestas representativas de PIM a la oxitocina IV de dos glándulas mamarias abdominales (Gl. 7 y 8) de ratas lactantes anestesiadas, obtenidas antes y después de inyectar adrenalina (ADR), noradrenalina (NA) e isoproterenol (ISOP) por vía ICV. Nótese que el efecto de las aminas solo ocurre en la glándula mamaria inervada.

Por otra parte, cuando administramos las mismas catecolaminas por vía IV, observamos que todas ellas, excepto la DA, disminuyeron la magnitud de las respuestas de PIM a la oxitocina exógena (Fig. 6).

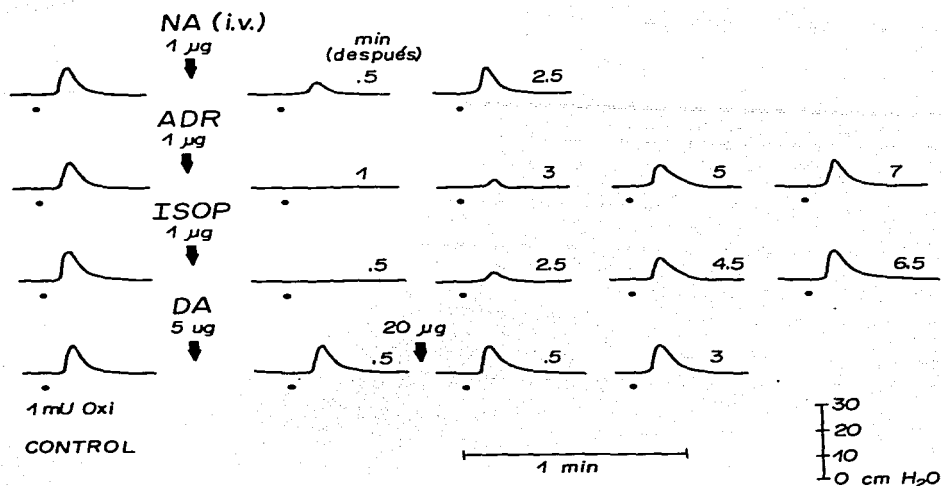


Fig. 6. Respuestas representativas de la PIM de ratas lactantes anestesiadas, a inyecciones de oxitocina (indicadas por los puntos negros bajo cada registro) después de la administración IV de noradrenalina (NA), adrenalina (ADR), isoproterenol (ISOP) y dopamina (DA). Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección IV de catecolaminas.

En síntesis, con estos resultados iniciales observamos: a) la facilitación o inhibición de la respuesta de PIM a la oxitocina exógena, inducida por la aplicación ICV respectiva de ADR, NA y DA, o de ISOP; b) la persistencia de estos efectos en el animal hipofisectomizado y c) el bloqueo de estos efectos por la desnervación de la glándula mamaria. Por esto, consideramos que en la rata, el SNC puede regular la evacuación láctea a través de la inervación directa de la

glándula mamaria. Dado que tanto la secreción de oxitocina como la de catecolaminas son reguladas centralmente, estos resultados aumentan la complejidad de la regulación integrativa de la evacuación láctea.

Hemos investigado un poco más acerca de este mecanismo central y los resultados obtenidos se presentan a continuación.

a.1) Efecto de la aplicación ICV de agonistas y antagonistas adrenérgicos.

Como habíamos observado, la administración ICV de NA (1 a 5  $\mu\text{g}$ ) o de ISOP (1 a 10  $\mu\text{g}$ ) incrementa o disminuye respectivamente, la magnitud de la respuesta de PIM de la glándula mamaria a la oxitocina exógena. Tales cambios son significativos y dependientes de la dosis y probablemente se deban (véase mas adelante) a la respectiva disminución (NA) o aumento (ISOP) del tono ductal. Investigamos si la administración de NA ICV podía antagonizar el efecto central del ISOP y encontramos que al administrar NA antes del ISOP prevalece el efecto facilitador de la primera (Fig. 7).

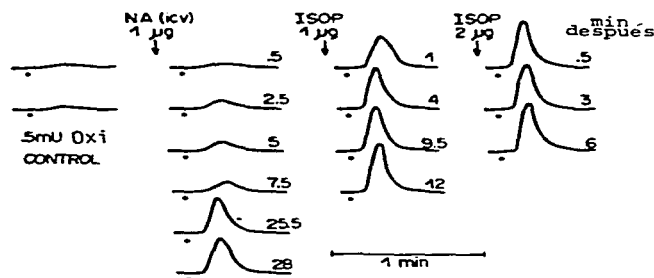


Fig. 7 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar noradrenalina (NA) o isoproterenol (ISOP), en un volumen de  $1\mu\text{l}$  por vía ICV. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.



Por otra parte, la administración IV de propranolol (antagonista  $\beta$ -adr.), contrarresta el efecto inhibitorio obtenido por la administración ICV de ISOP (Fig. 8).

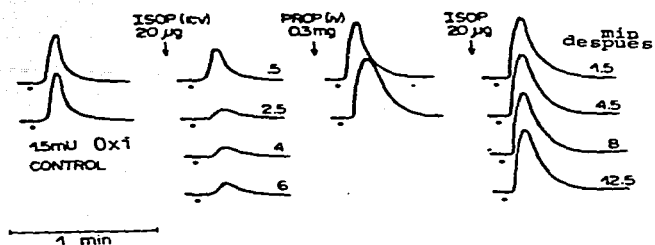


Fig. 8 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar por vía ICV dosis de isoproterenol (ISOP), en un volumen de 1  $\mu$ l y después de aplicar 0.3 mg de propranolol (PROP) IV. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Estos resultados sugieren que el tono ductal de la glándula mamaria se inhibe al aplicar NA ICV y este efecto central de tipo  $\alpha$ -adrenérgico predomina sobre la inhibición de las respuestas que se logra con la aplicación ICV del ISOP. El propranolol IV contrarresta a su vez el efecto central del ISOP actuando como bloqueador de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos en la glándula mamaria (desnervación farmacológica). Esto indica la naturaleza simpática de las influencias neurales sobre la glándula mamaria.

Para determinar si los efectos adrenérgicos centrales podían anularse o disminuir mediante la aplicación de un antagonista, probamos administrar una dosis ICV de un antagonista  $\alpha$  o  $\beta$  adrenérgico respectiva y posteriormente a

una dosis de NA o de ISOP. Los antagonistas empleados fueron: la fentolamina como antagonista  $\alpha$  y el propranolol como antagonista  $\beta$ .

Como se muestra en la figura 9, la aplicación ICV de NA inhibe el tono ductal de la glándula mamaria y aumenta la amplitud de las respuestas. La aplicación ICV del antagonista  $\alpha$ -adrenérgico antes de la administración ICV de NA anuló el aumento de las respuestas de la glándula (Fig. 9).

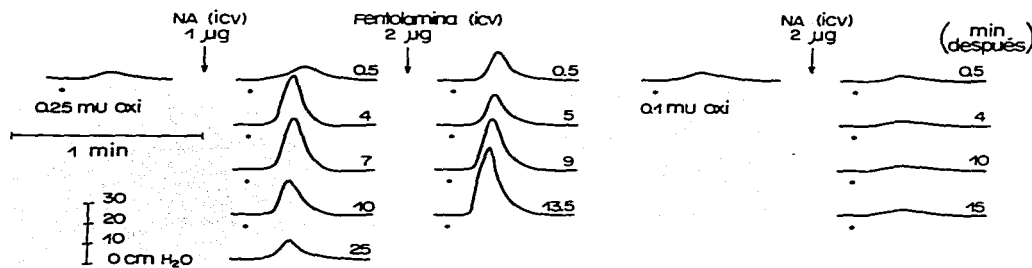


Fig. 9 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar por vía ICV dosis de noradrenalina (NA) en un volumen de 1  $\mu$ l y de aplicar por la misma vía una dosis de fentolamina. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Con una dosis ICV de ISOP (5  $\mu$ g) se incrementa el tono ductal de la glándula mamaria. Esta acción del ISOP se anuló cuando administramos previamente una dosis de 4  $\mu$ g de propranolol ICV (Fig. 10).

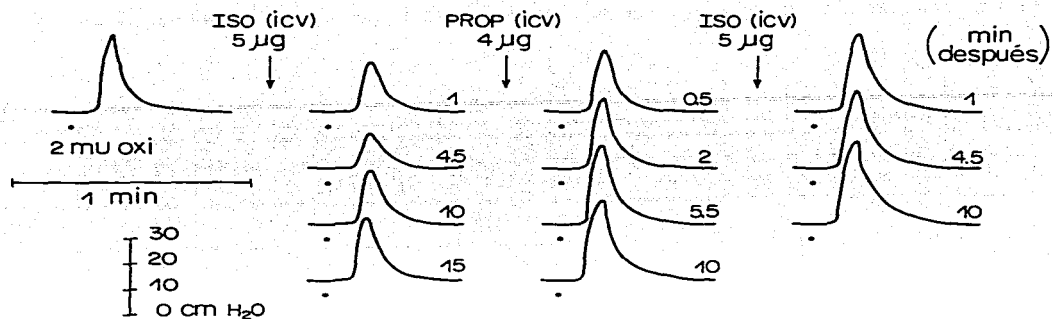


Fig. 10 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar isoproterenol (ISOP) ( $5\mu\text{g}$  en  $1\mu\text{l}$ ) en un ventrículo lateral cerebral y de aplicar por la misma vía  $4\mu\text{g}$  de propranolol (PROP). Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

a.1.1) Efecto de la aplicación ICV de isoproterenol sobre la tasa de entrada de leche a la glándula mamaria.

Como ya mencioné, al aplicar una dosis de ISOP ( $5\mu\text{g}$ ) por vía ICV observamos una disminución de la amplitud de las respuestas de la glándula mamaria a la oxitocina exógena. Este efecto inhibitorio podría deberse a que la aplicación ICV de ISOP provoque una vasoconstricción que dificulte la llegada de la oxitocina a la glándula mamaria; o bien, que el ISOP provoque una constricción de los conductos de la

glándula mamaria que antagonize la contracción mioepitelial inducida por la oxitocina y con ello resulte una menor amplitud de la respuesta de PIM. Con respecto a la posibilidad de la vasoconstricción, ésta se descartó en principio dado que el efecto inhibitor del ISOP se manifestó sólo sobre la amplitud de las respuestas de presión intramamaria y no sobre la latencia de las mismas a la oxitocina exógena.

Con respecto a la ductoconstricción, ésta fue analizada determinando la tasa de entrada de leche a una glándula mamaria, lo cual se hizo mediante el método descrito por Grosvenor y Findlay (1968) (ver Apéndice I).

Se midió la tasa de entrada de leche en la glándula mamaria de una rata anestesiada, registrando el tiempo que toman dosis de 0.1 ml de leche en entrar a la glándula a una presión constante (90 mmHg). Si bien este método permite conocer de manera indirecta la resistencia de los conductos mamarios sólo al flujo de entrada y no de salida de la leche; era de utilidad para determinar si dicha resistencia se alteraba después de administrar ISOP ICV.

Así, encontramos que al aplicar 1 $\mu$ g de ISOP por vía ICV, la tasa de entrada de leche no se modificó. Con una dosis de 5 $\mu$ g de ISOP ICV observamos una ligera disminución en la tasa de entrada; aunque con frecuencia ocurrió la ruptura de la glándula mamaria y la consecuente pérdida de presión. Si bien esta ruptura ocurrió también cuando se utilizó la dosis de 10 $\mu$ g de ISOP ICV, fue posible observar una disminución clara de la tasa de entrada de leche después de aplicar el fármaco (Fig. 11). Este resultado nos indicó que, en efecto, la administración ICV de ISOP provoca una ductoconstricción que se opone al flujo de la leche por los conductos de la glándula.

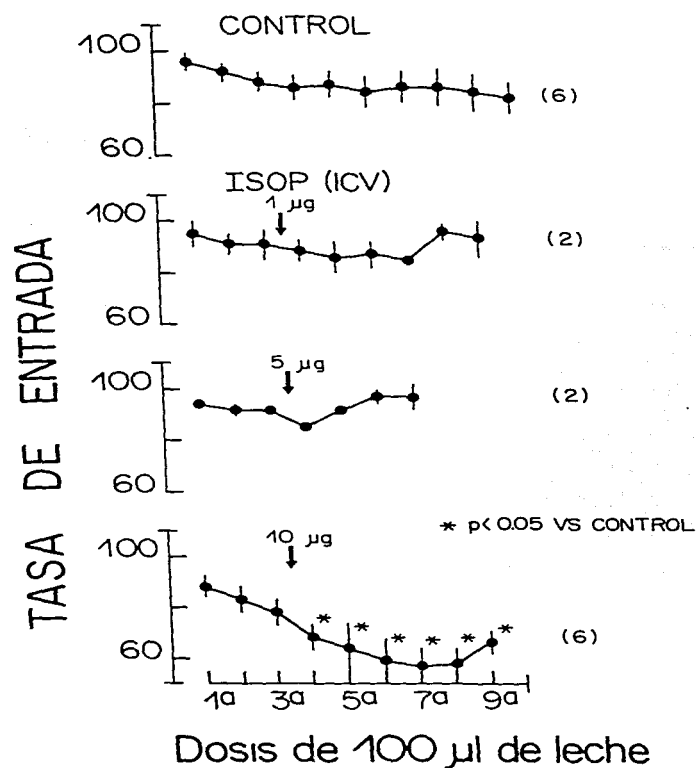


Fig. 11. Las gráficas muestran la modificación de la tasa de entrada de dosis (0.1 ml) subsecuentes (c/5min) de leche a glándulas mamarias de ratas anestesiadas con uretano, por la aplicación ICV de sol. salina (1µl) o de ISOP 1µg, 5µg o 10µg. La tasa de entrada de leche = [(tiempo de flujo por el sistema/tiempo de flujo por la glándula) X 100]. Cada punto representa el promedio ± E.E. Los números a la derecha de cada línea representan el número de glándulas probadas.

De todos estos resultados podemos concluir que existe

una regulación adrenérgica central del tono ductal de la glándula mamaria que llega a ella por medio de su inervación eferente.

**a.2) Efectos centrales de la oxitocina y la prolactina sobre el aparato motor de la glándula mamaria.**

Como se ha mencionado repetidamente en la presente tesis, las hormonas PRL y oxitocina desempeñan un papel fundamental en los procesos de secreción y evacuación de la leche por la glándula mamaria. Asimismo, dado que éstas y otras hormonas que previamente eran consideradas exclusivamente hipofisiarias, se sintetizan en el SNC y desempeñan diversas funciones, es posible que como parte de la regulación de la lactancia, estas hormonas ejerzan efectos neurales específicos que contribuyan a la compleja regulación del funcionamiento de la glándula mamaria. En esta sección de la tesis se presentan los resultados obtenidos por la administración central de oxitocina y de PRL.

**a.2.1) Efectos centrales de la oxitocina sobre la contractilidad de la glándula mamaria.**

Como mencioné en la Introducción, la oxitocina se sintetiza en las neuronas de los núcleos supraóptico y paraventricular del hipotálamo. Si bien estas neuronas proyectan sus principales terminales axónicas hacia la neurohipófisis, se sabe que existe una distribución amplia de fibras oxitocinérgicas en el SNC (Sofroniew, 1983; Buijs y col, 1985; Sawchenko y Swanson, 1985). Además, sabemos que en todas las especies estudiadas, la oxitocina se libera a la circulación (Mena y col, 1985; Grosvenor y col, 1986) y en la oveja al líquido cefalorraquídeo (Kendrick y col, 1986), en respuesta al estímulo de la succión.

Dada la importancia de esta hormona en la lactancia, analizamos si la oxitocina puede tener acciones centrales (directas o indirectas) sobre el funcionamiento del aparato

motor de la glándula mamaria. Al analizar esta posibilidad encontramos que, como se muestra en la figura 12, la administración ICV de oxitocina (en dosis de 0.625, 2.5 y 12.5  $\mu\text{g}$ ) provocó la disminución del tono ductal de la glándula mamaria y un aumento de la amplitud de las respuestas de PIM a la oxitocina exógena. Observamos que este efecto fue independiente de la dosis de oxitocina administrada por vía ICV.

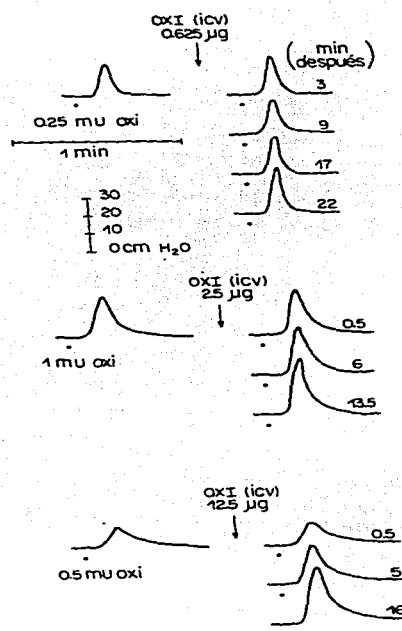


Fig. 12 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar diferentes dosis de oxitocina (OXI) en un volumen de 1  $\mu\text{l}$  por vía ICV. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Dado que como se sabe, la concentración de oxitocina se incrementa en el plasma y sobre todo en el líquido cefalorraquídeo durante la succión (Kendrick y col, 1986), estos resultados sugieren la participación de la oxitocina en la regulación de la evacuación láctea. Asimismo, dada la existencia de la hormona en las terminales sinápticas (Sofroniew, 1983; Buijs y col, 1985), no se excluye su participación como neurotransmisor o neuromodulador en las estructuras implicadas en la regulación neural del funcionamiento mamario.

a.2.2) Efectos centrales de la prolactina sobre la contractilidad de la glándula mamaria.

Respecto a las hormonas adenohipofisarias que regulan la lactancia, la PRL es particularmente importante como parte del complejo hormonal galactopoiético. En la rata lactante, se sabe que la PRL se libera a la circulación en respuesta a la succión (Mena y col, 1980a; Grosvenor y col, 1986). Se sabe también que un aumento en el nivel circulante de PRL puede significar un incremento de la concentración de la hormona en el líquido cefalorraquídeo (Clemens y Sawyer, 1974; Login y MacLeod, 1976). Por otra parte, evidencias de tipo inmunocitoquímico (Fuxe y col, 1977; Toubreau y col, 1979a; Toubreau y col, 1979b; De Vito, 1988a; Harlan y col, 1989), bioquímico (Schachter y col, 1984; De Vito y col, 1987; De Vito, 1988b) y biológico (Dudley y col, 1982; Harlan y col, 1983; Emanuele y col, 1986), algunas de ellas obtenidas en animales hipofisectomizados, muestran que en la rata existe una proteína tipo PRL en neuronas, principalmente del hipotálamo. Con técnicas de inmunocitoquímica se ha determinado que estas neuronas tienen proyecciones hacia varias regiones del cerebro. Además, la PRL central inmunoreactiva se libera por la estimulación de rebanadas de hipotálamo *in vitro* (De Vito y col, 1987), puede estar diferencialmente distribuida en el cerebro de machos ó de



hembras (De Vito, 1988c) y se ha determinado que se sintetiza en las neuronas, ya que en el cerebro se ha encontrado RNAm similar al de la PRL hipofisiaria (Schachter y col, 1984)). Los estudios de localización subcelular indican que la PRL inmunoreactiva del hipotálamo es almacenada en estructuras asociadas a membranas (De Vito y col, 1987) y su presencia en fracciones ricas en sinaptosomas indican que podría funcionar como un neuromodulador (Emanuele y col, 1987). Recientemente, Nishizuka y col (1990), han encontrado que en cuerpos celulares principalmente del hipotálamo medio basal, existe PRL inmunoreactiva. Estos autores determinaron la naturaleza neuronal de estas células ya que encontraron inmunoreactividad tipo PRL en axones y en sinapsis asociadas a dendritas.

Por otro lado, se sabe que la PRL hipofisiaria posee distintas variantes que se forman por modificaciones post-traduccionales del monómero. Tales modificaciones pueden ser: glicosilación, deamidación, fosforilación, agregación y proteólisis. La proteólisis convierte a la PRL monomérica cuyo peso molecular es de 24,000 daltones (24 Kd) en una estructura de dos cadenas polipeptídicas (una de 16,000 daltones (16 Kd) y otra de 8,000 daltones (8 Kd) de peso molecular) unidas por un puente disulfuro (Mittra, 1980) y a la variante de 16 Kd se le ha atribuido actividad mitogénica en la glándula mamaria (Mittra, 1980; Clapp y col, 1988). Con respecto a la PRL neural, en el hipotálamo ventral del cerebro de la rata se han identificado variantes de bajo peso molecular (16 y 12Kd) que son más abundantes en el cerebro de la rata hembra ciclante (De Vito, 1988a).

Considerando esta información, era posible que la PRL (y/o sus variantes) influyese directa o indirectamente en la evacuación láctea. Hemos analizado dicha posibilidad con la administración ICV o IV de PRL en ratas lactantes anestesiadas y determinamos su efecto sobre la contractilidad de la glándula mamaria a la oxitocina exógena (Morales y Mena, 1990).

Encontramos que la aplicación ICV de un estándar de PRL

(rPRL-B6) (NIH) (20pg a 1 $\mu$ g) aumentó significativamente la amplitud de las respuestas de la glándula mamaria a la oxitocina exógena con una latencia de 5 a 10 min (Fig. 13).

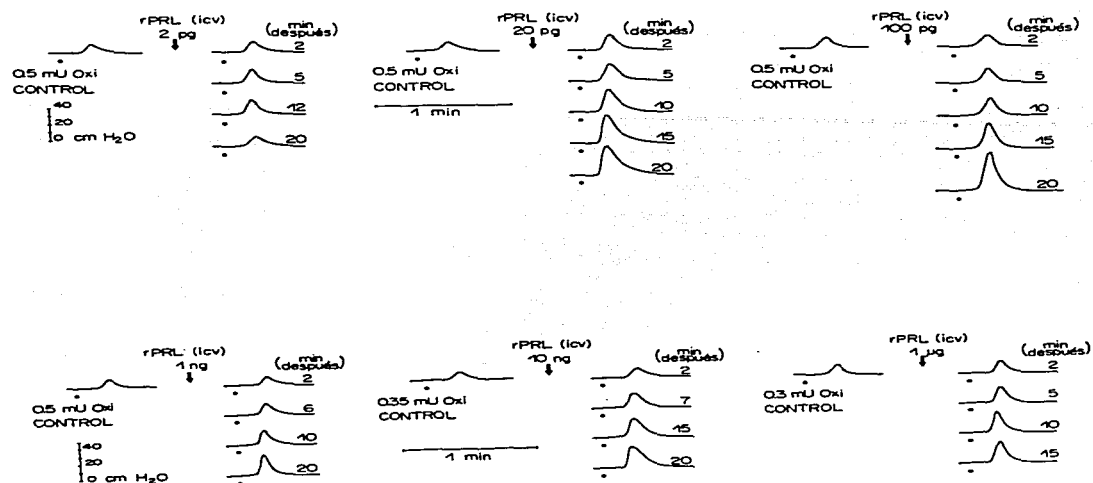


Fig. 13 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar diferentes dosis de prolactina (PRL) en un volumen de 1 $\mu$ l por vía ICV. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Ya que la PRL se libera a la circulación en respuesta a la succión, investigamos si la aplicación sistémica de esta hormona podía influir en la contractilidad de la glándula mamaria. La administración IV de PRL (rPRL-B6 10  $\mu$ g) también aumentó la amplitud de las respuestas, pero con una latencia mayor (20 a 30 min) (Fig. 14).

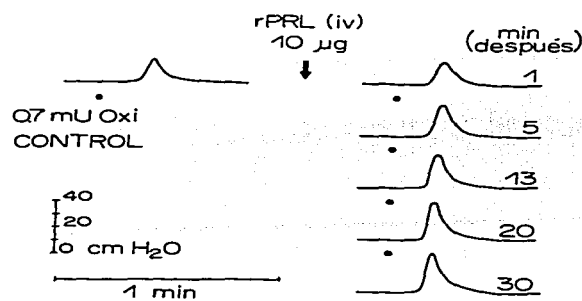


Fig. 14 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar una dosis de PRL por vía IV. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

La administración ICV del fragmento de 16Kd de la molécula de PRL (200 pg) aumentó la amplitud de las respuestas de la glándula mamaria (Fig. 15). Cuando aplicamos una dosis mayor (100 ng) no obtuvimos efecto (Fig. 15).

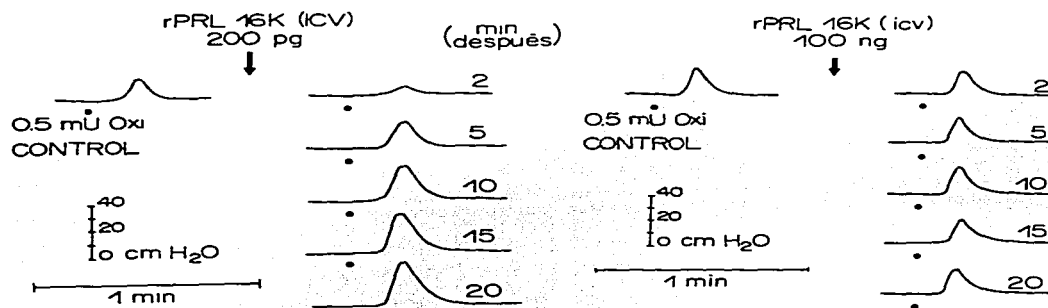


Fig. 15 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar dosis de PRL-16Kd por vía ICV.

Otro fragmento de PRL que utilizamos fue el de 8Kd. Encontramos que la aplicación ICV de 160 ng de PRL-8Kd no modificó la amplitud de las respuestas de la glándula mamaria (Fig. 16).

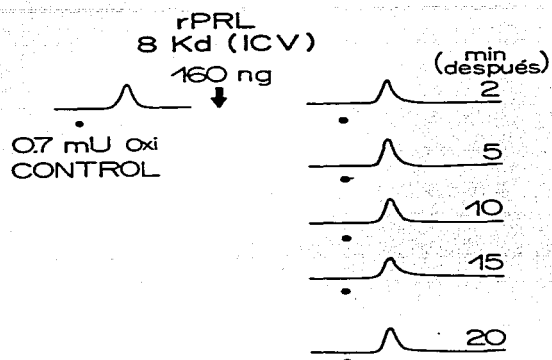


Fig. 16 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar 160 ng de PRL-8Kd por vía ICV.

En la siguiente figura graficamos el porcentaje de cambio de la amplitud de las respuestas de PIM sobre la respuesta control, a lo largo del tiempo, para definir si el efecto central de la PRL era dependiente de la dosis aplicada. Encontramos que la magnitud del efecto central de la PRL (24Kd) sobre la contractilidad mamaria fue dependiente de la dosis y que, como ya mencioné, tuvo una latencia de 5 min (Fig. 17, panel izquierdo).

En relación con los fragmentos de PRL, como ya mencioné, la aplicación ICV de la PRL 16Kd provocó un efecto similar al obtenido con la PRL monomérica, mientras que la aplicación ICV del fragmento de 8Kd no tuvo efecto (Fig. 17, panel derecho).

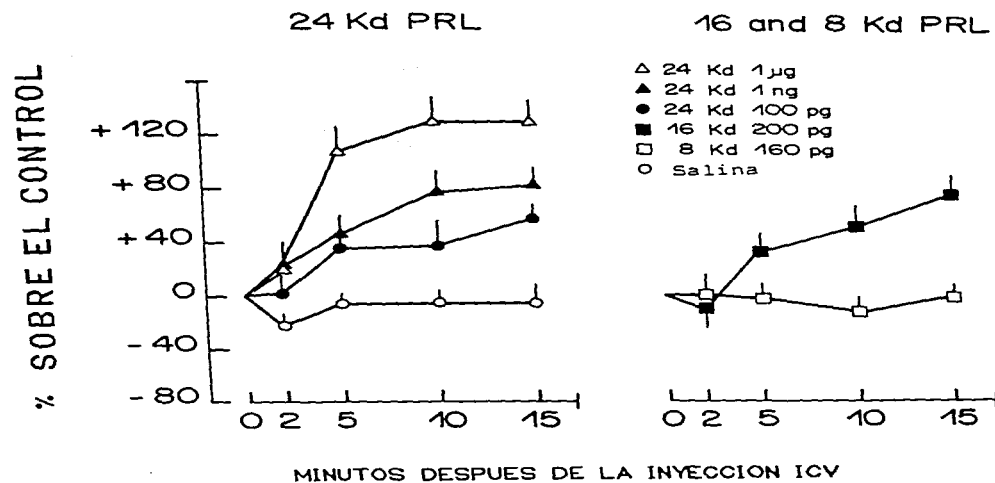


Fig. 17 Efecto central de diferentes dosis de PRL y de una dosis de los fragmentos de 16Kd y de 8Kd de la PRL, sobre las respuestas de PIM. La gráfica muestra el porcentaje de cambio sobre las respuestas de PIM controles, 2, 5, 10 y 15 min después de la aplicación ICV de las hormonas.

Otra hormona que se libera a la circulación como parte del complejo hormonal galactopoiético es la GH. Esta hormona es muy importante en la lactancia dado que participa, principalmente, en la estimulación del crecimiento de la glándula mamaria (Cowie y Tindal, 1971; Tucker, 1988).

La GH al igual que la PRL y otras hormonas hipofisarias (ACTH, TSH, LH) ha sido detectada en el cerebro de la rata, por medio de técnicas de radioinmunoensayo, bioensayo e inmunohistoquímicas (Pacold y col, 1976; Pacold y col, 1978; Hojvat y col, 1982). Dado que la GH neural se encuentra en el SNC independientemente de la hormona hipofisaria (Hojvat y col, 1982) y dada su homología estructural con la PRL (Wallis y col, 1985), investigamos si podía participar también en la

regulación de la contractilidad mamaria.

Observamos que la aplicación ICV de GH (rGH-B6) (10pg a 1ng) aumentó la amplitud de las respuestas de la glándula. Sin embargo, la magnitud de este efecto de la GH fue menor que el de la PRL (Fig. 18).

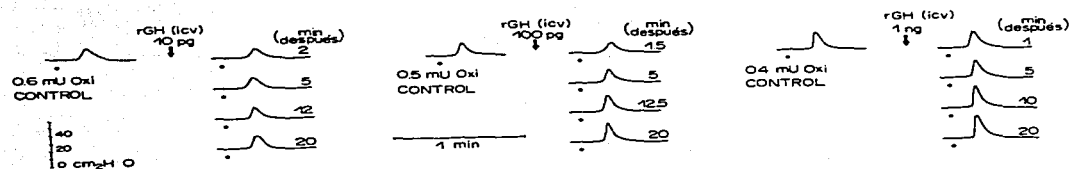


Fig. 18 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar diferentes dosis de hormona de crecimiento (GH) por vía ICV.

Es posible que la GH haya tenido tal efecto dada la homología que existe entre esta hormona y la PRL. Otra posibilidad es que el estándar de GH que utilizamos no era muy puro y pudiese tener una cantidad muy pequeña de PRL, suficiente para provocar el efecto. Finalmente, también es posible que la GH esté involucrada en la regulación del tono ductal de la glándula mamaria.

Por otra parte, con respecto al efecto central de la PRL, quisimos determinar los mecanismos por los cuales esta hormona modifica la contractilidad mamaria. Considerando la información presentada en la introducción y nuestros datos

obtenidos con agonistas adrenérgicos, pensamos que existían varias posibilidades. Una era que la PRL provocase una disminución de la actividad simpática adrenal; otra posibilidad era que la PRL estimulara la liberación de oxitocina y con ello aumentara la amplitud de las respuestas de PIM. La última posibilidad era que la PRL influyese la contractilidad mamaria por medio de la inervación que recibe la glándula mamaria y que esto fuese a través de mecanismos adrenérgicos.

Al investigar la primera de estas posibilidades encontramos que la adrenalectomía bilateral no modificó el efecto central de la PRL (Fig. 19). Estos resultados descartan que la acción central de la PRL esté mediada por la inhibición de la actividad simpática adrenal.

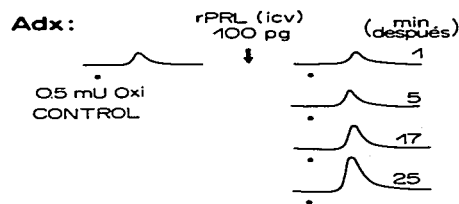


Fig. 19 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas y adrenalectomizadas, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar una dosis de PRL por vía ICV.

Analizamos la posibilidad de que los efectos centrales de la PRL se debiesen a una liberación de oxitocina y no a mecanismos neurales, mediante la determinación del efecto de la PRL ICV en ratas hipofisectomizadas. Como se observa en la figura 20, la aplicación ICV de una dosis de PRL en animales hipofisectomizados aumentó la amplitud de las respuestas de

PIM a la oxitocina exógena.

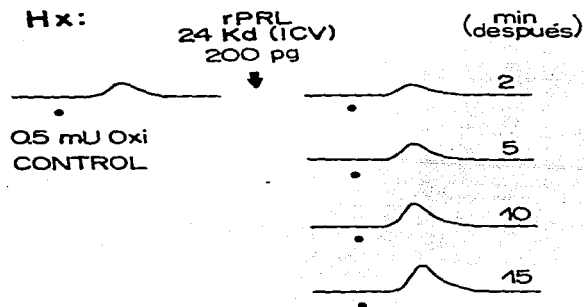


Fig. 20 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada e hipofisectomizada 3hr antes, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar una dosis de PRL por vía ICV.

Al investigar si el efecto central de la PRL era a través de mecanismos neurales encontramos que tanto la sección espinal como la sección de las raíces ventrales (T<sub>10</sub>-T<sub>12</sub>), correspondientes a la glándula registrada, bloquearon el efecto de la PRL ICV (Fig 21).



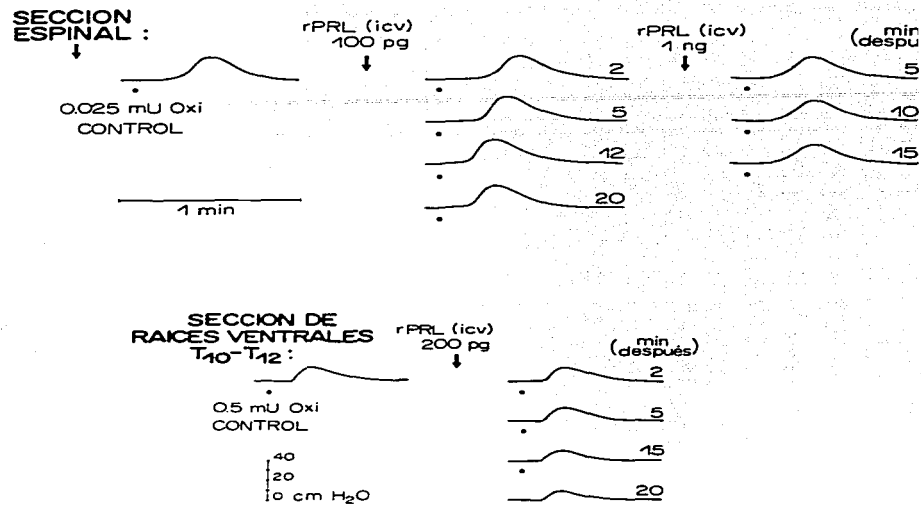


Fig. 21 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro). El efecto de la PRL ICV se bloqueó en las ratas con sección espinal ó con sección de las raíces ventrales correspondientes a la glándula registrada.

Respecto a la posibilidad de que entre los mecanismos adrenérgicos centrales previamente estudiados y la PRL se dé una interacción que determine los efectos observados por la administración ICV de la hormona, investigamos el efecto de aplicar una dosis ICV de PRL después de aplicar por vía IV o ICV bloqueadores adrenérgicos [prazosina ( $\alpha$ ), propranolol ( $\beta$ )]. Los resultados obtenidos mostraron que la administración ICV de prazosina (2 $\mu$ g) no bloqueó el efecto central de PRL sobre las respuestas de la glándula mamaria (Fig. 22).

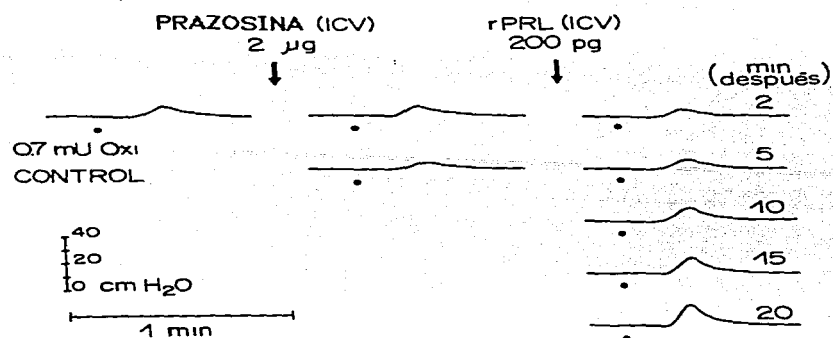


Fig. 22 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro). La dosis ICV de prazosina no bloqueó el efecto de la PRL ICV. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Por otra parte, la administración IV (0.3 mg) o ICV (4 µg) de propranolol bloquearon el efecto de la PRL ICV (Fig. 23). Esto sugiere, tentativamente, que en efecto existe un cierto grado de interacción entre la PRL ICV y los mecanismos centrales  $\beta$  adrenérgicos inhibitorios, previamente discutidos. Sin embargo, dado que el propranolol antagoniza también receptores a serotonina (5-HT), es necesario analizar con más detalle esta interacción entre la PRL y los mecanismos centrales adrenérgicos. Con respecto al bloqueo del efecto de la PRL ICV por el propranolol IV, dicho bloqueo debe interpretarse como un resultado que apoya la mediación neural del efecto de la PRL, ya que el efecto del propranolol corresponde al de una desnervación farmacológica.

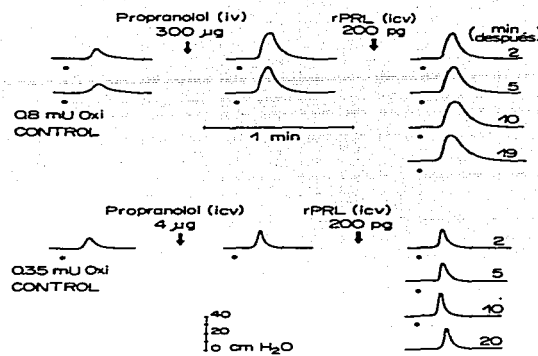


Fig. 23 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro). La aplicación IV o ICV de propranolol bloqueó el efecto de la PRL ICV. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Finalmente, dado que Harlan y col (1983) reportaron que la infusión de antisuero anti-PRL, en la región dorsal del cerebro medio, inhibió la conducta de lordosis provocada por la aplicación de PRL en la misma región, investigamos si la aplicación ICV de antisuero anti-PRL podría bloquear el efecto central de la PRL sobre la contractilidad mamaria.

Observamos que la aplicación ICV (aguda) de cada uno de tres antisueros anti-PRL (NIH, J. Neill y R. Gala), deprimieron las respuestas de PIM a la oxitocina exógena y aparentemente antagonizaron el efecto central de la PRL. Sin embargo, cuando en el animal adrenalectomizado se aplicó por vía ICV el anticuerpo anti-PRL, encontramos que las respuestas de la glándula mamaria no disminuyeron como en el animal intacto (Fig. 24).

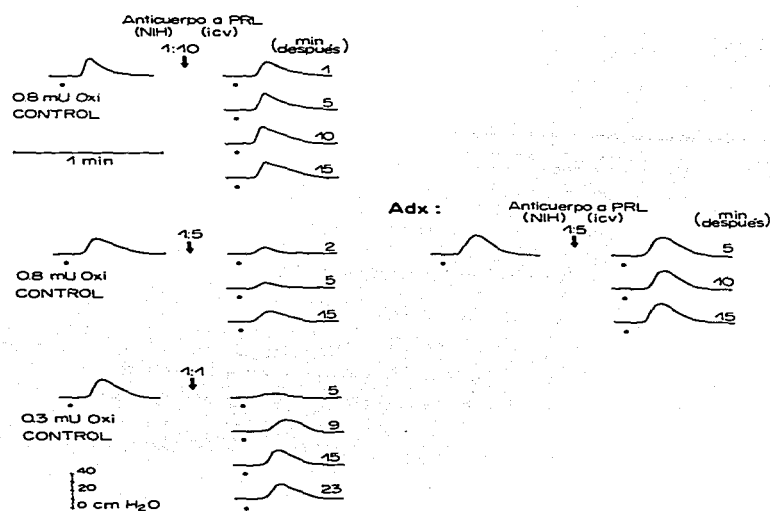


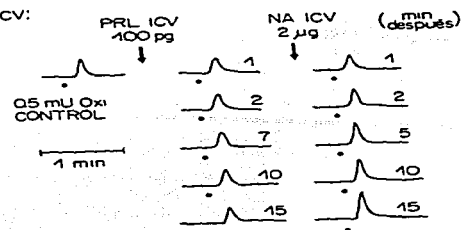
Fig. 24 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar una dosis de uno de los anticuerpos anti-PRL. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Posteriormente, utilizamos otro antisuero anti-PRL (C. Grosvenor), pero esta vez lo administramos por vía ICV ó intratecal (IT, a nivel de T<sub>10</sub>-T<sub>11</sub>) 48 horas antes del registro de la PIM. De esta manera, por vía ICV el anticuerpo anti-PRL bloqueó el efecto de la PRL ICV, pero nó el de la NA ICV. Por vía IT el anticuerpo bloqueó también el efecto de la PRL pero nó el de la oxitocina o la NA (IT), sobre las respuestas de PIM (Fig. 25).

### ANTICUERPO A PRL

(Grosvenor)

48h antes ICV:



### ANTICUERPO A PRL

(Grosvenor)

48h antes IT:

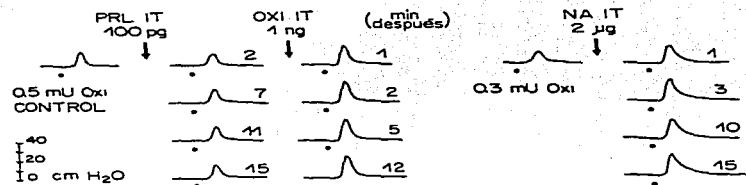


Fig. 25 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de ratas lactantes anestesiadas, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar una dosis de PRL ICV o IT. El anticuerpo anti-PRL fue aplicado 48 hr antes. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV o IT.

En conjunto, los resultados presentados en esta sección, sugieren que la PRL tiene acciones centrales que facilitan la contractilidad de la glándula mamaria a la oxitocina y que puede estar implicada en la regulación de la evacuación láctea.

Dado que los efectos de la PRL fueron obtenidos por la PRL 16Kd, reproducidos por la GH, y bloqueados por la desnervación quirúrgica o farmacológica simpática, es posible que tanto la PRL de origen hipofisiario como la de origen neural participen de manera específica en la regulación central del aparato motor de la glándula mamaria, quizás a través de interactuar en ese nivel con mecanismos adrenérgicos.

El resultado de que la adrenalectomía bilateral bloqueó el efecto inhibitor del anticuerpo anti-PRL, sugiere que dicho anticuerpo deprimió las respuestas de la glándula mamaria a la oxitocina exógena al activar inespecíficamente al sistema simpático-adrenal. Sin embargo, el hecho de que el anticuerpo aplicado 48 horas antes del registro bloqueara específicamente el efecto de la PRL, sugiere que la PRL endógena puede participar en la regulación neural del tono ductal mamario.

b) Experimentos de la interacción entre el sistema regulador central y el mecanorreceptor ductal sobre la contractilidad de la glándula mamaria.

Se sabe que la aplicación intraductal de un pequeño volumen de leche (0.1 ml) en 2 glándulas torácicas en la rata lactante anestesiada, activa los mecanorreceptores ductales. Esta activación, a su vez, inhibe la activación fásica del sistema simpático adrenal (Mena y col, 1979; Clapp y col, 1985) y disminuye el tono ductal de la glándula mamaria (Mena y col, 1979).

Dadas las consecuencias de la activación del sistema de mecanorreceptores ductales y su efecto sobre el tono ductal, se consideró importante determinar la posible interacción entre este sistema y el sistema regulador central del tono ductal, a fin de entender mayormente cómo ocurre la evacuación láctea en la rata. Para investigar tal interacción, utilizamos el registro de la PIM (Apéndice I).

Encontramos que la inhibición de las respuestas de PIM que se observa cuando se activa el sistema  $\beta$  adrenérgico mediante la aplicación de ISOP ICV ( $5\mu\text{g}$ ), se contrarresta por la activación del mecanorreceptor ductal (Fig. 26).

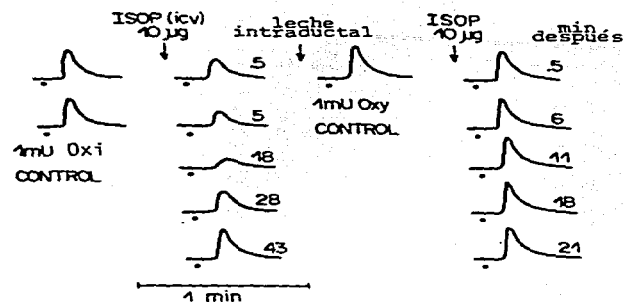


Fig. 26 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar una dosis de isoproterenol (ISOP) por vía ICV. Las dosis ICV de ISOP se administraron antes y después de aplicar leche intraductal en 2 glándulas torácicas. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Por otra parte, cuando simultáneamente a la activación del sistema facilitador  $\alpha$  adrenérgico (mediante la administración de NA ICV) se estimuló el receptor ductal, se obtuvo un aumento en la amplitud de las respuestas de la glándula mamaria a la oxitocina (Fig. 27).

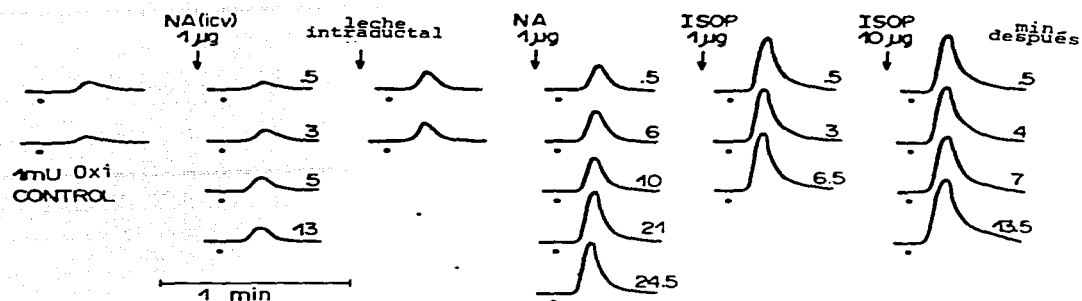


Fig. 27 Respuestas representativas de PIM de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada, obtenidas al inyectar oxitocina IV (indicada por los puntos bajo cada registro) antes y después de aplicar diferentes dosis de noradrenalina (NA) e isoproterenol (ISOP) por vía ICV y de aplicar leche intraductal en dos glándulas torácicas. Los números sobre cada registro indican los minutos después de la inyección ICV.

Estos resultados sugieren que en estos sistemas reguladores  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos existe un cierto equilibrio que, sin embargo, puede inclinarse a favor de la facilitación de la evacuación láctea cuando interviene la activación del mecanorreceptor ductal. De esta manera, el sistema adrenérgico central puede sumar sus efectos inhibidores del tono ductal a los producidos por la activación del mecanorreceptor ductal, lo cual, durante la succión facilitaría el desplazamiento de la leche por los conductos de la glándula mamaria.



## DISCUSION GENERAL

Los resultados que he presentado en esta tesis se ubican dentro de la hipótesis general de la regulación integrativa de la lactancia y de la importancia particular que en dicha regulación tienen mecanismos centrales adrenérgicos y peptidérgicos que influyen en el funcionamiento del aparato motor de la glándula mamaria (Mena y col, 1985). Observamos que la aplicación ICV de ADR y NA (efecto  $\alpha$ -adrenérgico), así como también la de DA, disminuyen el tono ductal de la glándula mamaria, mientras que la aplicación ICV de ISOP (efecto  $\beta$ -adrenérgico) aumenta el tono ductal de la glándula mamaria. El hecho de que el efecto central  $\alpha$ -adrenérgico predomine sobre el de tipo  $\beta$ , sugiere que éste puede ser un mecanismo para aumentar la eficiencia de la evacuación láctea durante la succión, ya que al sostener el tono ductal bajo, facilitaría con ello el efecto de la oxitocina sobre el mioepitelio. El hecho de que la activación del mecanorreceptor ductal bloqueó el efecto inhibitor de la evacuación del ISOP, sugiere que el mecanorreceptor ductal puede modular la regulación central adrenérgica y reforzar con ello acciones centrales facilitadoras de la evacuación láctea.

La posibilidad de que el tono ductal esté sujeto a una regulación activa, fue sugerida desde hace tiempo a partir de estudios en los que la desnervación de la glándula mamaria provocó en la coneja una dilatación de los conductos del pezón (Hebb y Linzell, 1966), y en cabras y cobayos una dilatación de los conductos mamarios (Zaks, 1962). Posteriormente, Grosvenor y Findlay (1968) mostraron que en la rata, la desnervación de una glándula mamaria disminuyó claramente la resistencia de la entrada de leche en la glándula, sugiriendo con ello una regulación neural tónica del sistema de conductos.

En esta tesis he mostrado datos de nuestro laboratorio que demuestran la existencia de una regulación

catecolaminérgica central sobre el tono de los conductos mamarios. Dado que la sección de las raíces ventrales correspondientes a una glándula mamaria abdominal antagonizó los efectos centrales de agonistas  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos, concluimos que esta regulación central llega a la glándula mamaria por la inervación eferente glandular.

Consideramos que la glándula mamaria es un efector autonómico y que en la rata el sistema nervioso simpático se activa por la estimulación eléctrica de un nervio mamario (Mena y col, 1979) y por la succión (Clapp y col, 1985). En este estudio, determinamos que las influencias neurales que regulan el funcionamiento contráctil de la glándula mamaria son de naturaleza simpática ya que al administrar propranolol IV (bloqueador  $\beta$ -adr) se antagonizó el efecto central del ISOP de disminución de la amplitud de las respuestas de PIM.

Teniendo en cuenta, que cambios del diámetro de los conductos influirían en la dinámica de la respuesta de PIM a la oxitocina exógena (Grosvenor y Findlay, 1968), y por lo tanto en el movimiento de la leche por los conductos, calculamos la tasa de entrada de leche en la glándula mamaria y determinamos que el efecto central del agonista  $\beta$ -adrenérgico fue inducir una constricción de los conductos de la glándula mamaria, determinando con ello una disminución de la amplitud de la respuesta de PIM a la oxitocina exógena.

Por una parte, esta ductoconstricción mamaria estaría dificultando el movimiento de la leche por los conductos mamarios. Además, las catecolaminas que se liberan a la circulación durante la succión (Clapp y col, 1985) antagonizarían la acción de la oxitocina sobre el miopitelio mamario mediante una vaso y/o ductoconstricción. En contraposición a esta inhibición, tanto la acción reguladora del mecanorreceptor ductal (Mena y col, 1979; Clapp y col, 1985) como la activación del mecanismo central  $\alpha$  adrenérgico, facilitarían la acción de la oxitocina para la evacuación láctea. Posteriormente, en ausencia de la succión, se restituiría el tono  $\beta$  adrenérgico.

En estudios previos de otros autores se interpretó que

el efecto central de las catecolaminas sobre la contractilidad mamaria se debía a modificaciones en la secreción de oxitocina (Clarke y col, 1979; Tribollet y col, 1978). Se ha mostrado recientemente que las catecolaminas adrenales pueden inhibir la liberación de oxitocina durante la succión por medio de receptores adrenérgicos que pueden estar localizados en el SNC o en la neurohipófisis (Shu-Lan Song y col, 1988). Sin embargo, nuestros resultados obtenidos en animales hipofisectomizados mostraron que los mecanismos centrales adrenérgicos influyen en la evacuación por mecanismos independientes de la liberación de oxitocina.

Por otra parte, dada la amplia distribución y síntesis de PRL y oxitocina en neuronas cerebrales y dado que en algunas especies se ha reportado su presencia en el líquido cefalorraquídeo (para PRL ver: Clemens y Sawyer, 1974; Login y MacLeod, 1976; Jordan y Kendall, 1978; Kiefer y Malarkey, 1978; Barbanel y col, 1986; Voogt, 1987; De Vito, 1989) (para oxitocina ver: Robinson y Jones, 1982; Mens y col, 1983; Kendrick y col, 1986), investigamos la influencia central de estas hormonas sobre la contractilidad mamaria y presentamos evidencias que apoyan la posibilidad de que estas hormonas están implicadas en la regulación neural de la evacuación láctea.

Al aplicar la oxitocina ICV obtuvimos un aumento en la amplitud de las respuestas de PIM. Es necesario estudiar con mayor detalle este efecto de la oxitocina para determinar si su acción central sobre la glándula mamaria es por medio de mecanismos neurales.

En relación con acciones autonómicas de la oxitocina, se sabe que las principales fibras oxitocinérgicas proyectan hacia la neurohipófisis y a las regiones caudales del cerebro, por lo que se ha postulado que dicha hormona puede influir en procesos autonómicos (Sawchenko y Swanson, 1985). La oxitocina puede estar implicada en la regulación central de la presión sanguínea (Versteeg y col, 1983)). La presencia de receptores a oxitocina en regiones como el núcleo olfatorio y la amígdala sugiere que los efectos de oxitocina

sobre conducta maternal (Pedersen y Prange, 1979) tendrían relación con acciones de este péptido sobre dichas estructuras. También, se sabe que áreas inervadas por fibras oxitocinérgicas como el complejo dorsal vagal o el núcleo ambiguo proyectan directamente a los núcleos paraventricular y supraóptico (Sawchenko y Swanson, 1982).

Dada esta estrecha relación anatómica, se ha propuesto que el núcleo paraventricular del hipotálamo ocupa una posición estratégica para influir en los procesos autonómicos (Swanson y Sawchenko, 1980). Incluso Sawchenko y Swanson (1985), han sugerido que las neuronas oxitocinérgicas participan, en distinto grado, en cada una de las tres principales modalidades reguladoras (neurohipofisiaria, adenohipofisiaria y autonómica) que están representadas en el hipotálamo. Así, tomando en cuenta que durante la succión, en varias especies la oxitocina se libera a la circulación (Mena y col, 1985) y al líquido cefalorraquídeo en la oveja (Kendrick y col, 1986) pensamos que esta hormona puede tener acciones centrales que influyen en la contractilidad mamaria, y por lo tanto en la evacuación láctea.

Respecto al efecto de PRL 24Kd sobre la contractilidad mamaria encontramos que la PRL 24Kd ICV aumentaba la amplitud de las respuestas de PIM. Dada la amplia distribución de la PRL neural en el cerebro, este efecto puede atribuirse a esta PRL ya que las dosis empleadas para obtener el efecto fueron muy bajas y que el efecto se obtuvo en animales hipofisectomizados. La GH ICV provocó un efecto menor que la PRL 24Kd y dado que fue necesaria una dosis mayor, este efecto puede atribuirse o bien a la homología estructural entre ambas hormonas (Wallis y col, 1985), o bien a una contaminación con PRL del estandar de GH empleado (GH-B6). Por otra parte, por el momento tampoco puede excluirse la posibilidad de que el efecto observado sea genuino de la GH, ya que al igual que otras hormonas hipofisiarias, la GH se ha encontrado distribuida en el SNC (Pacold y col, 1976; Pacold y col, 1978; Hojvat y col, 1982).

Investigamos también el efecto central de los fragmentos

16Kd y 8Kd que resultan de la proteólisis de la molécula de PRL 24Kd. Mientras que el efecto de la PRL 16Kd ICV fue aumentar la amplitud de las respuestas de PIM, la PRL 8Kd ICV no produjo efecto significativo. El efecto central de la PRL 16Kd (en su dosis baja) puede atribuirse a que este fragmento comprende las 2/3 partes de la molécula de PRL 24Kd y que dicha porción corresponda a la parte activa de la molécula de PRL de 24Kd. Así, se podría también explicar la falta de efecto de la PRL 8Kd. Cabe señalar que la preparación de PRL 8Kd era inestable, por lo que es necesario confirmar este resultado. Por otra parte, es posible que la PRL 16Kd posea efectos centrales propios. Existen receptores a la PRL 16Kd en el cerebro de la rata (Clapp y col, 1989) y se ha encontrado este fragmento de la PRL en neuronas de diversas estructuras del cerebro de estos animales (De Vito, 1988a). Por otro lado, el hecho de que no hayamos obtenido efectos similares con la dosis alta de 16Kd y con la 8Kd puede deberse a que estos fragmentos tienden a oligomerizarse cuando están en solución acuosa.

Mientras que con la aplicación aguda de un antisuero anti-PRL en el SNC provocamos una activación simpática inespecífica, los resultados obtenidos con la aplicación del antisuero 48 horas antes, sugieren que la PRL endógena participa en la regulación central de la contractilidad mamaria. De esta manera, es posible que la hormona esté funcionando en el SNC como un neuromodulador y que el anticuerpo afecte a esta acción.

En relación con acciones biológicas centrales de la PRL 24Kd, Harlan y col (1983) encontraron que dosis de PRL aplicadas en la región dorsal del cerebro medio provocaron un aumento en la conducta de lordosis de ratas ovariectomizadas y tratadas con estrógeno. Este incremento se contrarrestó por la aplicación en la misma región del anticuerpo a PRL. Por otra parte, Dudley y col (1982) observaron una disminución de la lordosis con la aplicación intraventricular de PRL. Es posible que esta diferencia se deba a las distintas regiones cerebrales donde se aplicó la PRL.

Es interesante mencionar el estudio de Parker y col

(enviado a publicación), en el que encontraron que la administración IV de PRL en la rata lactante estimuló significativamente la liberación basal de oxitocina. Estos autores sugieren que la PRL provocó dicho efecto por una acción directa sobre el lóbulo neural de la hipófisis. De acuerdo con nuestros resultados, el efecto de la administración central de la PRL sobre la contractilidad mamaria incluiría mecanismos independientes de la liberación de oxitocina ya que dicho efecto fué reproducido en animales hipofisectomizados. Esto sugiere que además de estimular la liberación de oxitocina a la circulación, la PRL podría estimular una vía neural oxitocinérgica o bien, estimular vías neurales de otra naturaleza.

Dada la existencia de PRL (24Kd) y de su forma submonomérica (16Kd) en el cerebro de la rata, pensamos que tanto las PRLs de origen central como hipofisiario podrían participar en la regulación central de la contractilidad mamaria.

En conjunto, los resultados presentados en esta tesis sugieren la existencia de mecanismos centrales adrenérgicos y peptidérgicos que pueden regular el funcionamiento mamario.

#### **ID Modelo de la evacuación láctea en la rata.**

Como ya mencioné, la evacuación láctea resulta de la interacción de factores antagónicos, neurohumorales que regulan el funcionamiento del aparato motor de la glándula mamaria. Las influencias hormonales son la oxitocina y las catecolaminas adrenales, las cuales se liberan a la circulación durante la succión y ejercen efectos opuestos sobre las células mioepiteliales y los conductos de la

glándula mamaria. Por otro lado, existen mecanismos centrales  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos que pueden facilitar o inhibir la evacuación láctea, mediante la inervación directa de la glándula mamaria.

La figura 28 resume esta compleja combinación de interacciones y propone un modelo para la evacuación láctea en la rata (Mena y col, 1985). En esta figura, están representados los principales elementos de la glándula mamaria implicados en la evacuación láctea (pezón, sistema ductal, sistema alveolar), el SNC, la médula espinal, la neurohipófisis y la glándula suprarrenal.

Por una parte, se ha planteado que existe un mecanismo de control central que puede regular la secreción de oxitocina (Taleisnik y Deis, 1964; Clarke y col, 1978). Por otro lado, se ha planteado también que existe un mecanismo central que puede regular el tono vascular y ductal de la glándula mamaria (Grosvenor y col, 1972)). De acuerdo a los resultados mostrados en la presente tesis, en ausencia de la succión predominarían los efectos centrales  $\beta$ -adrenérgicos para evitar la liberación de oxitocina y para mantener el tono ductal y vascular de la glándula mamaria, esto último estaría reforzado por las catecolaminas circulantes.

Cuando se inicia la succión (I), la estimulación asociada con ella activaría la liberación a la circulación de oxitocina (IIB) y de catecolaminas (IIA); a la vez que provocaría la inhibición del control central del tono ductal (mediante la activación y/o inhibición respectiva de los mecanismos centrales  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos) de la glándula mamaria. Con la disminución del tono ductal de la glándula mamaria, tendría lugar una facilitación del efecto de la oxitocina en la glándula. Sin embargo, los efectos de la oxitocina inicialmente serían contrarrestados por la liberación de catecolaminas, lo cual reduciría el acceso de la hormona a la glándula mamaria (por vasoconstricción) y provocaría una ductoconstricción mamaria. En consecuencia, a pesar del incremento en los niveles circulantes de oxitocina, se tendría una latencia prolongada para la salida de la leche.

Ahora bien, no obstante la menor evacuación láctea durante este período inicial, la oxitocina llegaría a la glándula mamaria y de esta manera, la PIM aumentaría, el sistema ductal se dilataría y se activarían los mecanorreceptores ductales (III). A su vez, la activación de los mecanorreceptores ductales provocaría: a) la inhibición del tono ductal, b) la inhibición de la activación fásica del sistema simpático adrenal, c) la facilitación de la liberación de oxitocina y d) la inhibición del sistema ? adrenérgico central.

De acuerdo con esta hipótesis, la participación de los mecanorreceptores ductales cambiaría el balance de las influencias antagónicas a favor de la salida de la leche, con lo cual aumentaría la eficiencia de la succión para evacuarla. Esta acción facilitadora de la evacuación láctea estaría reforzada por la acción central de la oxitocina, la PRL y la GH. Esto ocurriría durante la parte tardía del período de succión.

Es posible que en otras especies existan mecanismos similares a aquellos que regulan la evacuación láctea en la rata. Podría esperarse que las diferencias en la capacidad de almacenamiento de la glándula mamaria (la cual está en relación con la frecuencia de succión y con la dinámica de la evacuación láctea), puedan influenciar la importancia relativa de la oxitocina y del sistema simpático en la eficiencia de la evacuación en otras especies.



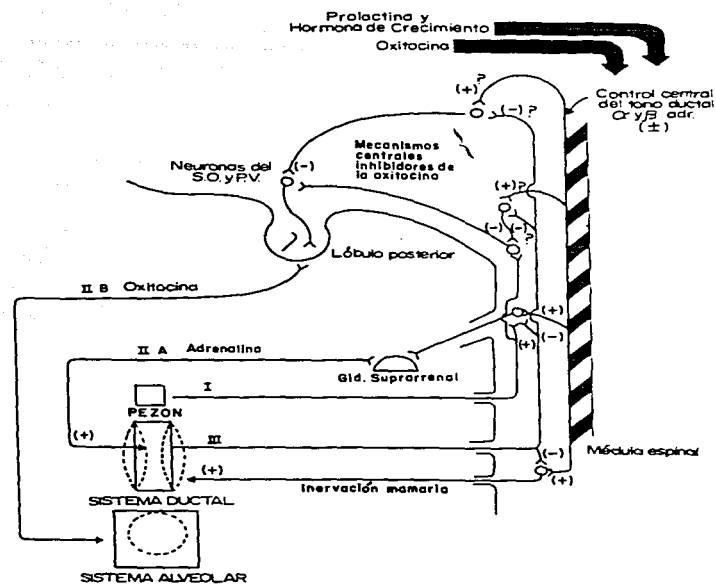


Fig 28 Mecanismos involucrados en la regulación de la evacuación láctea durante la succión en la rata (ver texto para detalles y explicación).

**IID Líneas de investigación futura generadas a partir de los resultados obtenidos.**

Los resultados obtenidos indican la existencia de mecanismos centrales de regulación de la lactancia en la rata y por ello permiten plantear el desarrollo de las siguientes investigaciones:

a) Mayor análisis farmacológico de los efectos centrales de los agonistas y antagonistas adrenérgicos, de las hormonas hipofisiarias y de la interacción entre ambos; así como también del empleo de antisueros, sobre la evacuación y la secreción lácteas.

b) Análisis de los efectos centrales de las hormonas hipofisiarias sobre la secreción de las mismas por la hipófisis.

c) Estudio farmacológico, sobre la secreción y la evacuación lácteas, de los sistemas centrales colinérgico, serotoninérgico y endorfinérgico, cuya intervención en la regulación de la lactancia ha sido sugerida.

## APENDICE I

### MATERIAL Y METODOS.

#### A) Animales.

En todos los experimentos se usaron ratas lactantes primíparas de la variedad Wistar, provenientes de una colonia desarrollada en el bioterio del IIB. El número de crías se limitó pocos días después del parto a 8-10 por rata. Las ratas se implantaron (bajo anestesia) con 1 cánula de acero inoxidable a cada ventrículo lateral cerebral, con un aparato estereotáxico. Se utilizó al animal 5 ó 7 días después de la operación.

#### B) Método de registro de la presión intramamaria.

En la rata lactante, toda la leche producida en cada glándula mamaria se drena por el sistema ductal hasta un galactóforo principal que se continúa formando parte del pezón.

Para registrar la presión intramamaria se canula el galactóforo principal de una glándula mamaria abdominal de una rata lactante anestesiada con uretano.

El otro extremo de la cánula queda conectado por un tubo de polietileno a un transductor de presión. Dicho transductor se conecta mediante un tubo en T a un reservorio de leche, a partir del cual se llena todo el sistema. El sistema se calibra previamente con un manómetro de agua. Una vez anestesiado el animal y canulada la glándula mamaria cuya presión se va a registrar, se permite la entrada gradual de leche bajo presión hacia la glándula (que antes de la

anestesia de la madre ha sido vaciada por las crías), permitiendo con ello obtener una curva de complianza estática, es decir, una curva de presión/volumen, la cual es un índice de la elasticidad de la glándula mamaria. El tiempo requerido para que un volumen dado de leche a una cierta presión entre a la glándula, da una medida indirecta de la resistencia del sistema ductal, particularmente de los conductos grandes. Después de introducir cada volumen, se puede administrar oxitocina IV en diferentes dosis y registrar la presión intramamaria. A partir de estos datos es posible calcular el umbral de sensibilidad a la oxitocina y la pendiente de la curva dosis/respuesta para cada volumen introducido.

Posteriormente se administran dosis iguales de oxitocina a intervalos regulares (1-2 min) y con esto se pueden registrar cambios en la contractilidad de la glándula mamaria.

#### **C) Método para determinar la tasa de entrada de leche a la glándula mamaria.**

Se utilizan ratas lactantes anestesiadas con uretano, colocadas en posición supina e implantadas con cánulas ICV a cada ventrículo lateral cerebral. Las glándulas mamarias de la rata deben estar vacías.

Una glándula mamaria abdominal se canula con una cánula de acero inoxidable, la cual se conecta a un tubo de polietileno y a un transductor de presión Statham P23Db. La salida del transductor se registra en un poligrafo Grass previamente calibrado con un manómetro de Hg. Antes de canular la glándula se llena con leche todo el sistema.

Se usa una unión T entre el transductor y la glándula mamaria para agregar leche. El transductor se conecta a un reservorio mantenido a una presión constante de 90 mm de Hg, de manera que el fluido entra a la glándula mamaria siempre a esta presión. El volumen de leche que fluye a la glándula

mamaria se regula con una llave de paso entre la pipeta y la unión T. Se dejan pasar por operación manual de la llave de paso, dosis de 0.1 ml de leche hacia la glándula. Las dosis se dan cada 5 min.

Se registra el tiempo en segundos que toma la entrada de cada dosis de leche a la glándula mamaria (*tiempo de entrada*). El tiempo de entrada se compara con el tiempo requerido para que el mismo volumen fluya por el sistema antes de canular la glándula (*tiempo de flujo por el sistema*).

La tasa de entrada de leche se calcula de la siguiente forma:

$$\frac{\text{tiempo de flujo por el sistema}}{\text{tiempo de entrada a la glándula mamaria}} \times 100$$

Esta manera de calcular la tasa de entrada de leche anula las diferencias en la viscosidad de los fluidos que se usen en cada experimento.

## BIBLIOGRAFIA

- Barbanel, G, Ixart, G, Arancibia, S, Assenmacher, I. (1986) Probable extrapituitary source of the immunoreactive prolactin measured in the cerebrospinal fluid of unanesthetized rats by push-pull cannulation of the 3rd ventricle. Neuroendocrinology **43**: 476-482.
- Barowicz, T. (1979a) Changes of blood catecholamine levels in the sheep during machine milking. J. Dairy Res. **46**: 555-557.
- Barowicz, T. (1979b) Inhibitory effect of adrenaline on oxytocin in the ewe during the milk-ejection reflex. J. Dairy Res. **46**: 41-46.
- Bisset, GW, Clark, BJ y Lewis, GP. (1967) The mechanism of the inhibitory action of adrenaline on the mammary gland. Brit. J. Pharmacol. **31**: 550-559.
- Buijs, RM, De Vries, GJ y Van Leeuwen, FW. (1985) The distribution and synaptic release of oxytocin in the central nervous system. pp. 77-86. En: Amico, JA y Robinson, AG. (Eds) Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies. Excerpta Medica, NY.
- Chan, WY. (1965) Mechanisms of epinephrine inhibition of the milk ejecting response to oxytocin. J. Pharmac. Exp. Ther. **147**: 48-53.
- Clapp, C, Martínez-Escalera, G, Morales, MT, Shyr, SW, Grosvenor, CE y Mena, F. (1985) Release of catecholamines follows suckling or electrical stimulation of mammary in lactating rats. Endocrinology **117**: 2498-2504.
- Clapp, C, Martínez-Escalera, G, Aguayo, D y Mena, F. (1987) Regulación integrativa de la lactancia. Bol. Estud. Med. Biol. Mex. **35**: 63-107.
- Clapp, C, Sears, PS, Russell, D, Richards, J, Levay-Young, BK y Nicoll, C. (1988) Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. Endocrinology **122**: 2892-2898.
- Clapp, C, Sears, PS y Nicoll, C. (1989) Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. Endocrinology **125**: 1054-1059.
- Clarke, G, Fall, CHD, Lincoln, DW y Merrick, LP. (1978) Effects of cholinoreceptor antagonists on the suckling-induced and experimentally evoked release of oxytocin. Br. J. Pharmacol. **63**: 519-527.
- Clarke, G, Lincoln, DW y Merrick, LP. (1979) Dopaminergic control of oxytocin release in lactating rats. J. Endocr. **83**: 409-420.

- Clemens, JA y Sawyer, BD. (1974) Identification of prolactin in cerebrospinal fluid. Exp. Brain Res. 21: 399-402.
- Cowie, AT, Folley, SJ, Cross, BA, Harris, GW, Jacobson, D y Richardson, KC. (1951) Terminology for use in lactational physiology. Nature 168: 421.
- Cowie, AT y Tindal, JS. (1961) The maintenance of lactation in the rat after hypophysial anterior lobectomy during pregnancy. J. Endocr. 22: 403-408.
- Cowie, AT. (1969) Variations in the yield and composition of the milk during lactation in the rabbit and the galactopoietic effect of prolactin. J. Endocr. 44: 437-450.
- Cowie, AT, Hartmann, PE y Turvey, A. (1969) The maintenance of lactation in the rabbit after hypophysectomy. J. Endocr. 43: 651-662.
- Cowie, AT y Tindal, JS. (1971) The Physiology of Lactation. Monographs of the Physiological Society. Arnold, Londres.
- Cowie, AT. (1974) Overview of the mammary gland. J. Invest. Dermatol. 63: 2-9.
- Cowie, AT, Forsyth, IA y Hart, IC. (1980) Hormonal Control of Lactation. Springer-Verlag, N.Y.
- Cross, BA y Harris, GW. (1952) The role of the neurohypophysis in the milk ejection reflex. J. Endocr. 8: 148-161.
- Cross, BA. (1955) Neurohormonal mechanisms in emotional inhibition of milk ejection. J. Endocr. 12: 29-37.
- Cross, BA. (1961) Neural control of lactation. p. 229. En: Kon, SK y Cowie, AT. (Eds) Milk: The mammary gland and its secretion. Vol. 1. Academic Press, N.Y.
- Cross, BA, Moss, RL y Urban, I. (1971) Effect of iontoporetic application of acetylcholine and noradrenaline to antidromically identified paraventricular units. J. Physiol. 214: 28-30.
- De Vito, WJ, Connors, JM, Hedge, GA. (1987) Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: In vitro release and subcellular localization. Neuroendocrinology 46: 155-161.
- De Vito, WJ. (1988a) Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. Biochem. Biophys. Research Communications 150: 599-604.
- De Vito, WJ. (1988b) Peptide mapping of brain and pituitary immunoreactive prolactin. 70th Annual Meeting. The Endocrine Society. Abst. 173.
- De Vito, WJ. (1988c) Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. Neuroendocrinology

47: 284-289.

De Vito, WJ. (1989) Immunoreactive prolactin in the hypothalamus and cerebrospinal fluid of male and female rats. Neuroendocrinology 50: 182-186.

Dudley, CA, Jamison, TS y Moss, RL. (1982) Inhibition of lordosis behavior in the female rat by intraventricular infusion of prolactin and by chronic hyperprolactinemia. Endocrinology 110: 677-679.

Emanuele, NV, Metcalfe, L, Wallock, L, Tentler, J, Hagen, TC, Beer, CT, Martison, D, Gout, PW, Kirsteins, L y Lawrence, AM. (1986) Hypothalamic prolactin: Characterization by radioimmunoassay and bioassay and response to hypophysectomy and restraint stress. Neuroendocrinology 44: 217-221.

Emanuele, NV, Metcalfe, L, Lubrano, T, Rubinstein, H, Kirsteins, L y Lawrence, AM. (1987) Subcellular distribution of hypothalamic prolactin-like immunoreactivity. Brain Res. 407: 223-229.

Ewy, Z y Barowicz, T. (1981) Interaction of neurohypophyseal and adrenal catecholamines and oxytocin hormones in the ewe during the milk ejection reflex. Adv. Physiol. Sci. 20: 209.

Falconer, IR y Rowe, JM. (1977) Effect of prolactin on sodium and potassium concentrations in mammary alveolar tissue. Endocrinology 101: 181-186.

Findlay, ARL. (1966) Sensory discharges from lactating mammary glands. Nature 211: 1183-1184.

Findlay, ARL y Grosvenor, CE. (1969) The role of mammary gland innervation in the control of the motor apparatus of the mammary gland: a review. Dairy Sci. Abstr. 31: 109-116.

Forsyth, IA. (1986) Variation among species in the endocrine control of mammary growth and function: The roles of prolactin, growth hormone, and placental lactogen. J. Dairy Sci. 69: 886-903.

Fuchs, AR, Cubile, L, Dawood, MY y Jorgensen, FS. (1984) Release of oxytocin and prolactin by suckling in rabbits throughout lactation. Endocrinology 114: 462-469.

Fuxe, K, Hokfelt, T, Eneroth, P, Gustafsson, JA y Skett, P. (1977) Prolactin-like immunoreactivity: Localization in nerve terminals of rat hypothalamus. Science 196: 899-900.

Goodman, GT y Grosvenor CE. (1983) Neuroendocrine control of the milk ejection reflex. J. Dairy Sci. 66: 2226-2235.

Grosvenor, CE, Mena, F y Schaeffgen, DA. (1967a) Effects of nonsuckling interval and duration of suckling on the suckling-induced fall in pituitary prolactin concentration in the rat. Endocrinology 81: 449-453.

Grosvenor, CE, Mena, F, Dhariwall, AS y McCann, SM. (1967b)



Reduction of milk secretion by prolactin-inhibiting factor: further evidence that exteroceptive stimuli can release pituitary prolactin in rats. Endocrinology 81: 1021-1028.

Grosvenor, CE y Findlay, AL. (1968) Effect of denervation on fluid flow into rat mammary gland. Am. J. Physiol. 214: 820-824.

Grosvenor, CE, Maiweg, H y Mena, F. (1970a) Effect of nonsuckling interval on ability of prolactin to stimulate milk secretion in rats. Am. J. Physiol. 219: 403-408.

Grosvenor, CE, Maiweg, H y Mena, F. (1970b) A study of factors involved in the development of the exteroceptive release of prolactin in the lactating rat. Hormones and Behavior 1: 111-120.

Grosvenor, CE y Mena, F. (1971) Effect of suckling upon the secretion and release of prolactin from the pituitary gland of the lactating rat. J. Anim. Sci. 32: 115-136.

Grosvenor, CE, De Nuccio, DJ, King, SF, Maiweg, H y Mena, F. (1972) Central and peripheral neural influences on the oxytocin-induced pressure response of the mammary gland of the anaesthetized lactating rat. J. Endocr. 55: 299-309.

Grosvenor, CE y Mena, F. (1973a) Evidence that suckling pups, through an exteroceptive mechanism, inhibit the milk stimulatory effects of prolactin in the rat during late lactation. Horm. Behav. 4: 209-222.

Grosvenor, CE y Mena, F. (1973b) Evidence for a time delay between prolactin release and the resulting rise in milk secretion rate in the rat. J. Endocr. 58: 31-39.

Grosvenor, CE y Mena, F. (1974) Neural and hormonal control of milk secretion and milk ejection. p 227-276. En: Larson, BL y Smith, VR. (Eds) Lactation: a comprehensive treatise. Vol. 1. Academic Press, NY.

Grosvenor, CE, Whitworth, NS y Mena, F. (1975) Milk secretory response of the conscious lactating rat following injections of rat prolactin. J. Dairy Sci. 58: 1803-1807.

Grosvenor, CE, Mena, F y Whitworth, NS. (1977) Sensory stimuli from pups involved in inhibition of milk secretion in rats during late lactation. Horm. Behav. 8: 287-296.

Grosvenor, CE y Mena, F. (1979) Alterations in the oxytocin-induced intramammary pressure response after mechanical stimulation of the mammary gland of the anesthetized lactating rat. Endocrinology 104: 443-447.

Grosvenor, CE, Mena, F y 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.

Grosvenor, CE y Mena, F. (1982) Regulating mechanisms for oxytocin

- and prolactin secretion during lactation. p.69. En: Muller, EE y MacLeod, RM. (Eds) Neuroendocrine perspectives. Vol. 1. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam.
- Grosvenor, CE, Shyr, SW, Goodman, GT y Mena, F. (1986) Comparison of plasma profiles of oxytocin and prolactin following suckling in the rat. Neuroendocrinology 43: 679-685.
- Harlan, RE, Shivers, BD, Pfaff, DW. (1983) Midbrain microinfusions of prolactin increase the estrogen-dependent behavior, lordosis. Science 219: 1451-1453.
- Harlan, RE, Shivers, BD, Fox, SR, Kaplove, KA, Schachter, BS y Pfaff, DW. (1989) Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. Neuroendocrinology 49: 7-22.
- Harris, GW. (1948) Further evidence regarding the endocrine status of the neurohypophysis. J. Physiol. 107: 436-448.
- Hebb, CO y Linzell, JL. (1951) Some conditions affecting the blood flow through the perfused mammary gland with special reference to the action of adrenaline. Quart. J. Exptl. Physiol. 36: 159-175.
- Hebb, CO y Linzell, JL. (1966) A histochemical study of the innervation of the mammary glands. J. Physiol. 186: 82P.
- Hojvat, S, Emanuele, N, Baker, G, Connick, E, Kirsteins, L y Lawrence, AM. (1982) Growth hormone (GH), thyroid-stimulating hormone (TSH), and luteinizing hormone (LH)-like peptides in the rodent brain: non-parallel ontogenetic development with pituitary counterparts. Developmental Brain Res. 4: 427-434.
- Jordan, RM y Kendall, JW. (1978) Dissociation of plasma and CSF prolactin heterogeneity. Acta Endocr. 89: 38-47.
- Kendrick, KM, Keverne, EB, Baldwin, BA y Sharman, DF. (1986) Cerebrospinal fluid levels of acetylcholinesterase monoamines and oxytocin during labour parturition, vaginal cervical stimulation, lamb separation and suckling in sheep. Neuroendocrinology 44: 149-156.
- Kiefer, KA y Malarkey, WB. (1978) Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: Experimental conditions that alter gel filtration patterns. Journal of Clin. Endocr. and Metabolism 46: 119-124.
- Knigge, KM, Bennett-Clarke, C, Burchanowski, B, Joseph, SA, Romagnano, MA, Sternberger, LA. (1980) Relationships of some releasing-hormone-producing neuron systems to the ventricles of the brain. En: Motta, M. (Ed.) The endocrine functions of the brain. Raven Press, NY.
- Kuanyshebekova, GA. (1976) Reflex discharge of catecholamines during milk ejection inhibition in goats. Akad. Nauk. SSR. Biol. 14: 62-65.

- Lefcourt, AM y Akers, RM. (1983) Is oxytocin necessary for efficient milk removal in dairy cows? J. Dairy Sci. 66: 2251-2259.
- Lincoln, DW y Paisley, AC. (1982) Neuroendocrine control of milk ejection. J. Reprod. Fertil. 65: 571-586.
- Lincoln, DW y Russell, JA. (1985) The electrophysiology of magnocellular oxytocin neurons. pp. 53-76. En: Amico, JA y Robinson, AG. (Eds.) Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies. Excerpta Medica, NY.
- Linzell, JL. (1971) The role of the mammary glands in reproduction. Res. Reprod. 3: 2-3.
- Linzell, JL y Peaker, M. (1971) Mechanism of milk secretion. Physiol. Rev. 51: 564-597.
- Linzell, JL. (1974) Mammary blood flow and methods of identifying and measuring precursors of milk. p 143-225. En: Larson, BL y Smith, VR. (Eds) Lactation: a comprehensive treatise. Vol. 1. Academic Press, NY.
- Linzell, JL y Peaker, M. (1974) Changes in colostrum composition and in the permeability of the mammary epithelium at about the time of parturition in the goat. J. Physiol. 243: 129-151.
- Linzell, JL, Peaker, M y Taylor, JC. (1975) The effects of prolactin and oxytocin on milk secretion and on the permeability of the mammary epithelium in the rabbit. J. Physiol. 253: 547-563.
- Login, IS y MacLeod, RM. (1976) Prolactin in human and rat serum and cerebrospinal fluid. Brain Research 132: 477-483.
- Marchetti, B, Fortier, MA, Poyet, P, Folléa, N, Pelletier, G y Labrie, F. (1990)  $\beta$ -Adrenergic receptors in the rat mammary gland during pregnancy and lactation: Characterization, distribution, and coupling to adenylate cyclase. Endocrinology 126: 565-574.
- Marchetti, B y Labrie, F. (1990) Hormonal regulation of  $\beta$ -adrenergic receptors in the rat mammary gland during the estrous cycle and lactation: Role of sex steroids and prolactin. Endocrinology 126: 575-581.
- Mayer, G y Klein, M. (1961) Histology and cytology of the mammary gland. pp 47-126. En: Kon, SK y Cowie, AT (Eds) Milk: the mammary gland and its secretion. Vol. 1. Academic Press, NY.
- Mena, F y Grosvenor, CE. (1972) Effect of suckling and of exteroceptive stimulation upon prolactin release in the rat during late lactation. J. Endocr. 52: 11-22.
- Mena, F, Beyer, C y Grosvenor, CE. (1974) On the mechanism by which oxytocin depresses milk ejection and milk secretion in rats. Am. J. Physiol. 227: 1249-1254.
- Mena, F, Pacheco, P, Aguayo, D, Clapp, C y Grosvenor, CE. (1978) A rise in intramammary pressure follows electrical stimulation of

mammary nerve in anesthetized rats. Endocrinology 103: 1929-1936.

Mena, F, Pacheco, P, Aguayo, D, Martínez, G y Grosvenor, CE. (1979) Reflex regulation of autonomic influences upon the oxytocin-induced contractile response of the mammary gland in the anesthetized rat. Endocrinology 104: 751-756.

Mena, F, Pacheco, P y Grosvenor, CE. (1980a) Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma prolactin concentrations in anesthetized lactating rats. Endocrinology 106: 458-462.

Mena, F, Pacheco, P, Whitworth, NS y Grosvenor, CE. (1980b) Recent data concerning the secretion and function of oxytocin and prolactin during lactation in the rat and rabbit. pp. 217-250. En: Valverde, CM y Aréchiga, H. (Eds) H. Front. Hormone Research. Vol. 6 Karger, Basel.

Mena, F, Martínez-Escalera, G, Aguayo, D, Clapp, C, Anguiano, G y Grosvenor, CE. (1981) Effect of acute increases in suckling frequency upon food intake and milk secretion in the rabbit. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 168: 373-377.

Mena, F, Martínez-Escalera, G, Aguayo, D, Clapp, C y Grosvenor, CE. (1982) Latency and duration of the effects of bromocriptine and prolactin on milk secretion in lactating rabbits. J. Endocr. 94: 389-395.

Mena, F, Clapp, C, Martínez-Escalera, G, Pacheco, P y Grosvenor, CE. (1985) Integrative regulation of milk ejection. pp. 179-199. En: Amico, JA y Robinson, AG. (Eds) Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies. Excerpta Medica, NY.

Mens, WBJ, Witter, A, Van Wimersma Greidanus, TB. (1983) Penetration of neurohypophyseal hormones into cerebrospinal fluid (CSF): half-times of disappearance of these neuropeptides from CSF. Brain Res. 262: 143-149.

Mitra, I. (1980) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary. II. *In vivo* mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. Biochem. Biophys. Res. Commun. 95: 1760-1767.

Moore, R y Zarrow, MX. (1965) Contraction of the rabbit mammary strip *in vitro* in response to oxytocin. Acta Endocrinol. 48: 186-198.

Moos, F y Richard, PH. (1979a) Effect of dopaminergic antagonist and agonist on oxytocin release induced by various stimuli. Neuroendocrinology 28: 138-144.

Moos, F y Richard, PH. (1979b) The inhibitor role of  $\beta$ -noradrenergic receptors in oxytocin release during suckling. Brain Res. 162: 595-599.

Morales, MT y Mena, F. (1990) Central effects of prolactin upon contractility of the mammary gland in rats. 72o. Annual Meeting of

the Endocrine Society. Abst. No. 269.

Nishizuka, M, Shivers, BD, Leranth, C y Pfaff, DW. (1990) Ultrastructural characterization of prolactin-like immunoreactivity in rat medial basal hypothalamus. Neuroendocrinology 51: 249-254.

Pacold, ST, Lawrence, AM y Kirsteins, L. (1976) CNS growth hormone: secretion of growth hormone-like immunoreactivity from monolayer tissue cultures of the amygdala. Clin. Res. 24: 563.

Pacold, ST, Kirsteins, L, Hojvat, S, Lawrence, AM y Hagen, TC. (1978) Biologically active pituitary hormones in the rat brain amygdaloid nucleus. Science 199: 804-806.

Parker, SL, Armstrong, WE, Sladek, CD, Grosvenor, CE y Crowley, WR. () Prolactin stimulates the release of oxytocin in lactating rats: a physiological role and an action at the neural lobe. Enviado a Endocrinology.

Peaker, M y Taylor, JC. (1975) Milk secretion in the rabbit: changes during lactation and the mechanisms of ion transport. J. Physiol 253: 527-545.

Pedersen y Prange (1979) Induction of maternal behavior in virgin rats after intracerebroventricular administration of oxytocin. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 6661-6665.

Peeters, G, Houvenaghel, A, Verbeke, R y Van Sicheem-Reynaert, R. (1972) Effects of bradykinin and kallikrein injected into the udder artery of sheep and goats. Arch. Int. Pharmacodyn Ther. 198: 397-414.

Richard, Ph. (1970) An electrophysiological study in the ewe of the tracts which transmit impulses from the mammary glands to the pituitary stalk. J. Endocr. 47: 37-44.

Rillema, JA, Etindi, RN, Ofenstein, JP, Waters, SB. (1988) Mechanisms of prolactin action. pp 2217-2234. En: Knobill, E y Neill, J. et al. (Eds) The Physiology of Reproduction. Vol. 2 Raven Press, NY.

Robinson, ICAF y Jones, PM. (1982) Oxytocin and Neurophysin in plasma and CSF during suckling in the guinea-pig. Neuroendocrinology 34: 59-63.

Sawchenko, PE y Swanson, LW. (1982) Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. J. Comp. Neurol. 205: 260-272.

Sawchenko, PE y Swanson, LW. (1985) Relationship of oxytocin pathways to the control of neuroendocrine and autonomic function. pp. 87-103. En: Amico, JA y Robinson, AG. (Eds) Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies. Excerpta Medica, NY.

Schachter, BS, Durgerian, S, Harlan, RE, Pfaff, DW y Shivers, BD.

(1984) Prolactin mRNA exists in rat hypothalamus. Endocrinology 114: 1947-1949.

Shiu, RPC y Friesen, HG. (1980) Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. Ann. Rev. Physiol. 42: 83-96.

Shu-Lan Song, Crowley, WR y Grosvenor, CE. (1988) Evidence for involvement of an adrenal catecholamine in the  $\beta$ -adrenergic inhibition of oxytocin release in lactating rats. Brain Research 457: 303-309.

Sofroniew, MV. (1983) Vasopressin and oxytocin in the mammalian brain and spinal cord. TINS Nov: 467-472.

Soloff, MS. (1985) Oxytocin receptors and mechanisms of oxytocin action. pp. 259-276. En: Amico, JA y Robinson, AG. (Eds) Oxytocin: Clinical and Laboratory Studies. Excerpta Medica, NY.

Swanson, LW y Sawchenko, PE. (1980) Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. Neuroendocrinology 31: 410-417.

Taleisnik, S y Deis, RP. (1964) Influence of cerebral cortex in inhibition of oxytocin release induced by stressful stimuli. Am. J. Physiol. 207: 1394-1398.

Taylor, JC, Peaker, M y Linzell, JL. (1975) Effects of prolactin on ion movements across the mammary epithelium of the rabbit. J. Endocrinol. 65: 26-27P.

Topper, YJ y Freeman, CS. (1980) Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. Physiol. Rev. 60: 1049-1106.

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

Toubeau, G, Desclin, J, Parmentier, M y Pasteels, JL. (1979b) Compared localizations of prolactin-like and adrenocorticotropin immunoreactivities within the brain of the rat. Neuroendocrinology 29: 374-384.

Tribollet, E y Dreifuss, JJ. (1977) Effect of propranolol on reflex milk ejection and on paraventricular neurones. Experientia 33: 786.

Tribollet, E, Clarke, G, Dreifuss, JJ y Lincoln, SW. (1978) The role of central adrenergic receptors in the reflex release of oxytocin. Brain Res. 142: 69-84.

Tucker, HA. (1974) General Endocrinological Control of Lactation. pp. 277-326. En: Larson, BL y Smith, VR. (Eds) Lactation: A comprehensive treatise. Vol. 1. Academic Press, NY.

Tucker, HA. (1988) Lactation and its hormonal control. pp.

2235-2263. En: Knobill, E y Neill, J et al. (Eds) The Physiology of Reproduction. Vol. 2. Raven Press, NY.

Turner, CW. (1952) The mammary gland I. The anatomy of the udder of cattle and domestic animals. Lucas Brothers, Columbia, Mo.

Versteeg, CAM, Cransberg, K, De Jong, W y Bohus, B. (1983) Reduction of a centrally induced pressor response by neurohypophyseal peptides: the involvement of lower brainstem mechanisms. Eur. J. Pharmacol. 24: 133-140.

Voogt, JL. (1987) Actions of prolactin in the brain. p 27-40. En: Rillema, J. (Ed) Actions of prolactin on molecular processes. CRC Press, Florida.

Vorherr, H. (1971) Catecholamine antagonism to oxytocin-induced milk ejection. Acta Endocr. Suppl. 154: 5-38.

Wakerley, JB, Clarke, G y Summerlee, JS. (1988) Milk ejection and its control. pp. 2283-2321. En: Knobill, E y Neill, J et al. (Eds) The Physiology of Reproduction. Vol. 2. Raven Press, NY.

Wallis, M, Howell, SL y Taylor, KW. (1985) The biochemistry of the polypeptide hormones. John Wiley & Sons, NY.

Zaks, MG. (1962) The motor apparatus of the mammary gland. Oliver & Boyd, London.