

03068

8
26

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
CENTRO DE NEUROBIOLOGIA

LOCALIZACION ESTRUCTURAL DE UN ANTIGENO TIPO PRL
16K EN EL SISTEMA HIPOTALAMO-NEUROHIPOFISIARIO DE
LA RATA

TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS PRESENTA
EL Q.F.B. SALVADOR MEJIA GUERRERO

México, D.F.

1996

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

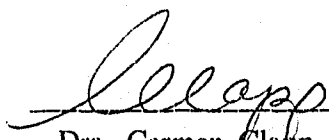
Ciudad Universitaria, Mayo de 1996

La presente Tesis de Maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Carmen Clapp Jiménez L. en el Centro de Neurobiología de la UNAM.

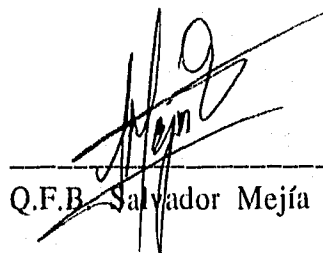
El jurado asignado estuvo compuesto por

Presidente	Dr. Horacio Merchant Larios
1er. Vocal	Dr. Raúl Aguilar Roblero
Secretario	Dra. Carmen Clapp Jiménez Labora
1er. Suplente	Dr. Miguel Angel Morales
2o. Suplente	Dra. María Teresa Morales Guzmán

Asesora del tema


Dra. Carmen Clapp Jiménez

Sustentante


Q.F.B. Salvador Mejía Guerrero

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Carmen Clapp, por su apoyo e interés siempre constante, así como por sus consejos y críticas, siempre encaminados a la realización del mejor trabajo posible.

A mis cotutores, el Dr. Miguel A. Morales y el Dr. Raúl Aguilar R., cuyas críticas y sugerencias, aunadas a las de la Dra. Clapp, permitieron la realización de esta tesis.

A la valiosa asesoría del Dr. Raúl Mena y de José Luna Muñoz en el uso del microscopio confocal.

A los Dres. Horacio Merchant Larios y María Teresa Morales Guzmán por sus comentarios y sugerencias al trabajo realizado.

A todos aquellos a quienes he tenido la oportunidad de darles clase en la Facultad de Química, pues me recuerdan constantemente la necesidad de estar actualizado a todos los niveles.

INDICE

RESUMEN	2
SUMMARY	3
INTRODUCCION	4
HIPOTESIS	7
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y METODOS	9
Animales Utilizados	9
Anticuerpos	9
Obtención de Tejido	10
Inmunocitoquímica General	10
Localización Intracelular	11
Inmunocitoquímica para Microscopía Electrónica	11
Doble Marcaje	12
RESULTADOS	14
Morfología	14
Especificidad del Antisuero anti-PRL 16K	14
Distribución de las Neuronas con Inmunorreactividad tipo PRL en los Núcleos PV y SO del Hipotálamo de la Rata	17
Colocalización de los Antígenos tipo PRL con VP	19
Distribución Intracelular de los Antígenos tipo PRL	24
DISCUSION	27
CONCLUSIONES	33
APENDICE	34
Prolactina	34
Características Estructurales	34
Funciones	36
Fuentes de Producción	37
a) Adenohipófisis	38
b) Producción Extrahipofisiaria	39
Sistema Hipotálamo-neurohipofisiario	41
Anatomía General	41
Principales Péptidos: Vasopresina y Oxitocina	44
Colocalización con otros Péptidos	47
BIBLIOGRAFIA	50

RESUMEN

Las neuronas magnocelulares de los núcleos paraventricular (PV) y supraóptico (SO) del hipotálamo sintetizan hormonas que son transportadas a la neurohipófisis, de donde son liberadas a la circulación en respuesta a diversos estímulos. Las principales hormonas neurohipofisiarias son la vasopresina (VP) y la oxitocina (OT), que son sintetizadas por poblaciones neuronales diferentes. Sin embargo, éstas no son los únicos mensajeros químicos producidos por este sistema. También se han detectado otros mensajeros de tipo peptídico, como son la angiotensina II, la galanina, la dinorfina, la met- y leu-encefalinas, el péptido intestinal vasoactivo, el factor liberador de corticotropinas, la colecistoquinina, etc. Entre éstos, evidencias recientes han permitido incluir a miembros de la familia de las prolactinas (PRL).

Entre las evidencias que apoyan al sistema hipotálamo-neurohipofisiario como productor de PRLs se encuentra la demostración de la presencia del ARN mensajero para PRL en núcleos PV y SO aislados así como de antígenos tipo PRL de 23 y 14 kDa de peso molecular. Asimismo, se demostró que dichas proteínas, además de compartir epítopes con la PRL, activan a los receptores de dicha hormona en bioensayos específicos. Sin embargo, se desconoce cuál es el significado funcional de las PRLs en este sistema.

En la presente tesis nos propusimos estudiar la distribución celular y subcelular de las PRLs neurohipofisiarias con el objeto de obtener bases estructurales que permitieran dilucidar posibles asociaciones fisiológicas con las hormonas neurohipofisiarias. Así, analizamos la distribución celular y subcelular de los antígenos tipo PRL en los núcleos PV y SO hipotalámicos, y su colocalización celular con la hormona neurohipofisiaria vasopresina.

Mediante técnicas inmunocitoquímicas se determinó, tanto en el núcleo PV como en el SO, que la distribución de las células con inmunorreactividad tipo PRL era muy similar a la de las neuronas vasopresinérgicas y claramente diferente a la de las células oxitocinérgicas. Este dato sugirió la posibilidad de que las PRLs colocalizaran con VP en la misma neurona. Para determinar la posible colocalización de las PRLs con VP se realizaron experimentos de doble marcaje revelados por fluoróforos. Estos fueron analizados tanto por microscopía de epifluorescencia como por microscopía confocal. Así, se observó que la mayoría de las células positivas para prolactina son también inmunorreactivas para VP. Sin embargo, también se encontraron células que sólo fueron inmunorreactivas para uno u otro de los dos antígenos. El análisis por microscopía confocal mostró además que la marca de PRL seguía tanto un patrón homogéneo como un patrón punteado, que contrastaba con la distribución homogénea observada siempre para VP. Adicionalmente, el patrón punteado de la marca para PRL se observó en regiones intracelulares distintas a las que contenían la marca de VP. Estos datos sugirieron que ambos antígenos podrían encontrarse colocalizados en diferentes compartimentos celulares en algunas de las neuronas. El patrón punteado observado para PRL parece corresponder a la localización de estos antígenos en estructuras granulares, ya que el análisis por microscopía electrónica mostró que la marca para PRL se localiza en lo que parecen ser vesículas de núcleo denso de diferentes tamaños que varían entre 50 y 200 nm. Estas vesículas inmunorreactivas no sólo se localizaron en el soma celular, sino también en procesos neuronales.

Los datos obtenidos permiten concluir que las PRLs se colocalizan con vasopresina en neuronas magnocelulares del sistema hipotálamo-neurohipofisiario y sugieren que dichas PRLs se encuentran en la vía de secreción de estas neuronas. Aunque el papel fisiológico de las PRLs neurohipofisiarias no ha sido determinado, su colocalización con vasopresina sugiere la posibilidad de que ambas moléculas estén sujetas a mecanismos de regulación similares y participen en funciones comunes.

SUMMARY

The hypothalamo-neurohypophyseal system is a neuroendocrine tissue that synthesizes and releases hormones in response to several stimuli. The main neurohypophyseal hormones are vasopressin (VP) and oxytocin (OT), which are synthesized by magnocellular neurons of the hypothalamic paraventricular (PV) and supraoptic (SO) nuclei. Nevertheless, these are not the only chemical messengers produced in this system. Among the list of neurohypophysial peptides are angiotensin II, galanin, dynorphin, met- and leu-enkephalin, VIP, CRF, etc. Recent evidence has included members of the prolactin (PRL) hormonal family as part of the chemical messengers produced in this system.

The evidences that support the idea of the hypothalamo-neurohypophyseal system as a PRL source are the demonstration that the prolactin messenger RNA is present in isolated PV and SO nuclei, together with prolactin-like antigens of 23 and 14 kDa. It has been demonstrated that these proteins, besides sharing antigenic determinants with prolactin, activate receptors to this hormone on specific bioassays. However, it is not known what is the functional significance of the presence of PRL-like molecules in this system.

The objective of the present work was to study the cellular and subcellular distribution of the neurohypophyseal PRLs to establish structural bases that would allow valuable insights into the study of the physiology of these novel neurohypophyseal hormones. Thus, in this work, we have analyzed the cellular distribution of the PRL-like antigens throughout the PV and SO nuclei, and their colocalization with the neurohypophyseal hormone VP.

With the aid of immunocytochemical techniques, we determined in the PV and SO nuclei that the distribution of the PRL immunoreactive cells was very similar to that of the VP magnocellular neurons, and different to that of the OT cells. This similarity in the distribution pattern between VP and PRL neurons prompted us to analyze whether both antigens could be co-localized within the same neuron. For this purpose, double label fluorescence immunocytochemistry was performed and analyzed by epifluorescence and confocal microscopy. We observed that almost all of the PRL immunoreactive cells were VP immunoreactive. However, there were also cells that were immunoreactive only for one of the two antigens studied. Confocal microscopy showed that, within the cell the VP label followed a diffuse pattern, while the PRL label showed both diffuse and a dot shaped patterns. In addition, the dot shaped pattern of the PRL label was observed in different intracellular regions than that of VP. Dot shaped structures appear to correspond to a secretory granular component. Electron microscopy allowed us to determine that the PRL-like immunoreactivity was located in what appeared to be granules of various sizes ranging from 50 to 200 nm. The PRL label was not restricted to somas but was also detected in neuronal processes.

From these data we conclude that PRL-like proteins are colocalized with vasopressin in magnocellular neurons of the hypothalamo-neurohypophyseal system. In addition, the PRLs appear to enter the secretory pathway of these neurons. Although the physiology of the neurohypophyseal PRLs is unknown, their colocalization with VP suggest that both molecules could be subjected to a similar regulatory mechanisms and/or to exert common effects.

INTRODUCCION

El sistema neurosecretor hipotálamo-neurohipofisiario (SHN) se encuentra formado por neuronas magnocelulares de los núcleos paraventriculares (PV) y supraópticos (SO), cuyos axones proyectan hacia la neurohipófisis, o hipófisis posterior, a través de la lámina interna de la eminencia media. La función más conocida de este sistema es la secreción de dos hormonas peptídicas a la circulación: la vasopresina (VP) y la oxitocina (OT). La primera de ellas tiene como funciones principales la regulación de la presión arterial y del equilibrio hídrico del organismo, mientras que la OT ha sido relacionada principalmente con el trabajo de parto y la evacuación de leche durante la lactancia (Baulieu y Kelly, 1990; Reichlin, 1992).

Sin embargo, no son estas las únicas hormonas sintetizadas por este sistema. Diversas evidencias indican la existencia de otros mensajeros proteicos tanto a nivel de cuerpos neuronales como en sus terminaciones nerviosas en la neurohipófisis. Se ha propuesto que algunos de estos mensajeros podrían tener funciones de tipo local y/o sistémico al ser secretados en la vecindad y/o a la circulación, respectivamente, a través de las terminaciones nerviosas que se encuentran en la neurohipófisis (Sawchenko y col, 1992). Incluso se ha propuesto que algunos de estos péptidos, incluidas la VP y la OT, pudiesen ser liberados a nivel de los núcleos mismos y afectar parácrinamente su función (Sawchenko, 1992).

Evidencias experimentales recientes han permitido incluir a la prolactina (PRL) dentro de los péptidos producidos por el SHN (Clapp y col, 1994; López-Gómez y col, 1995; Torner y col, 1995). La PRL es en realidad una familia hormonal producto de diversas modificaciones postraduccionales originadas a partir de una molécula proteica que se sintetiza principalmente en la adenohipófisis, pero también en otros tejidos, incluido el nervioso (Nicoll, 1980). De hecho, el sistema nervioso central, y en particular

el hipotálamo, es un tejido productor de PRLs (Pfaff, 1992). La detección inmunológica de PRLs incluye preferencialmente a los núcleos hipotalámicos arcuato y ventromedial (DeVito, 1988a; DeVito y col, 1987; Emanuele y cols, 1986; Harlan y cols, 1989; Siaud y col, 1989; Thompson, 1982; Toubeau y col, 1979).

En nuestro grupo de investigación y utilizando anticuerpos dirigidos contra el fragmento amino terminal de 16 kDa de la PRL se detectó la presencia de proteínas inmunorreactivas en los somas de neuronas magnocelulares de los núcleos PV y SO del hipotálamo y en sus proyecciones neurohipofisarias (Clapp y col, 1994). Este hallazgo fue sorprendente, pues contrastó con reportes de la literatura donde las neuronas de ambos núcleos o no contenían PRL o la contenían en cantidades mucho menores a otros núcleos hipotalámicos (DeVito, 1987; Emanuele y col, 1986; Siaud y col, 1989; Thompson, 1982; Toubeau y col, 1979). Evidencias posteriores permitieron corroborar estos hallazgos y documentar la producción y secreción de PRL por el SHN (Torner y col, 1995). Así, se observó que la antigenicidad tipo PRL presente en la neurohipófisis se asociaba con proteínas de 23 y 14 kDa con propiedades biológicas específicas para dicha familia hormonal (López-Gómez y col, 1995). De esta manera se concluyó que las proteínas inmunorreactivas de 23 y 14 kDa probablemente correspondan a la PRL 23K y a un fragmento molecular de la misma (López-Gómez y col, 1995). Dado que el antígeno tipo PRL de 14 kDa es el más abundante (aproximadamente 80% de las PRLs inmunorreactivas presentes en extractos neurohipofisarios), se especuló sobre la posibilidad de que la falta de detección de PRLs en el SHN reportada previamente fuera consecuencia de que los anticuerpos dirigidos contra la PRL íntegra utilizados no reaccionaran o lo hicieran pobremente con la PRL de menor tamaño presente en este sistema. En apoyo a esta posibilidad, cuando utilizamos antisueros dirigidos contra la PRL 23K, fuimos incapaces de observar la presencia de PRLs neurohipofisarias (Clapp y col, 1994).

En apoyo a la producción local de las PRLs por el sistema hipotálamo-neurohipofisiario se demostró la presencia del ARN mensajero a PRL en núcleos PV y SO aislados (Clapp y col, 1994; Torner y col, 1995b). Adicionalmente, la detección de inmunorreactividad tipo PRL en ratas hipofisectomizadas descartó la posible contribución de la adenohipófisis como fuente de producción de las PRLs neurohipofisiarias (Torner y col, 1995a).

La producción de PRLs por el sistema neuroendócrino hipotálamo-neurohipofisiario sugirió también la posibilidad de que dichas PRLs fuesen liberadas a la circulación y, por tanto, que dicho sistema contribuyese a las PRLs circulantes. Esta posibilidad fue apoyada por estudios realizados con explantes hipotálamo-neurohipofisiarios y neurohipófisis aislados e incubados *in vitro*. En dichos estudios se observó la secreción de PRLs inmunorreactivas de 23 y 14 kDa al medio de incubación dependiente de Ca^{2+} (Torner y col, 1995a).

Estos datos sugieren que las PRLs neurohipofisiarias ingresan a la vía de secreción neuronal de donde son liberadas en respuesta a estímulos específicos. A este respecto, y como ya se mencionó en la sección de los antecedentes referente al SHN, se ha propuesto que los péptidos presentes en dicho sistema, en particular la VP y la OT, son liberadas a la circulación sistémica a través de la cual alcanzan sus diversos órganos blanco. Por otra parte PRL, al igual que como se ha propuesto para otros péptidos neurohipofisiarios (Renaud y Bourque, 1991; Sawchenko y cols, 1992), podría tener acciones locales, parácrinas y/o autócrinas, involucradas con la modulación de la secreción hormonal neurohipofisiaria.

Con el propósito de obtener bases morfológicas que nos permitieran iniciar el estudio del significado funcional de las PRLs en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, en esta tesis nos propusimos analizar la distribución celular de las PRLs en dicho sistema y su posible colocalización en uno de los dos tipos neuronales característicos del mismo: las neuronas vasopresinérgicas y/o oxitocinérgicas.

HIPOTESIS

Creemos que los datos mostrados en la introducción sustentan la siguiente hipótesis, que fue utilizada como base del trabajo de la presente tesis:

Miembros de la familia de las prolactinas son sintetizados y secretados por las neuronas del sistema hipotálamo-neurohipofisario. En vista de que la mayoría de los péptidos descritos en el SHN sólo colocalizan con una de las dos hormonas neurohipofisarias VP u OT, es de esperarse que la PRLs neurohipofisarias sean producidas por una sola de estas poblaciones neuronales.

OBJETIVOS

Los antecedentes expuestos nos convencieron de que la determinación precisa de la localización de los antígenos tipo PRL en el hipotálamo de la rata era un requisito indispensable para estudiar, a futuro, el significado funcional de estas moléculas en esta región del cerebro. Es por ello que nos propusimos el siguiente objetivo general:

Analizar la distribución celular y subcelular de los antígenos tipo prolactina detectados en los núcleos paraventriculares y supraópticos del sistema hipotálamo-neurohipofisario de la rata.

Este objetivo fue dividido en los siguientes objetivos particulares:

- I. Comparar la distribución de las células inmunorreactivas para prolactina con la de las neuronas vaso y oxitocinérgicas a través de los núcleos PV y SO hipotalámicos.
- II. Analizar si los antígenos tipo prolactina se colocalizan con vasopresina en la misma neurona.
- III. Determinar la localización intracelular de los antígenos tipo prolactina en las células inmunorreactivas a esta hormona.

MATERIALES Y METODOS

Animales Utilizados

Se usaron ratas de la cepa Wistar con un peso de 180-250 g que fueron mantenidas en periodos de luz oscuridad de 12 h. Los ensayos fueron realizados con ratas hembra en fase de estro, determinada por examen del exudado vaginal aproximadamente por una semana y media (un mínimo de dos ciclos completos) antes de ser sacrificadas.

Anticuerpos

El trabajo se realizó principalmente con un antisuero generado en conejo contra la forma de 16 kDa de la prolactina de rata, misma que fue producida en el laboratorio. Este fragmento de la PRL fue obtenido por incubación de la variante de 23 kDa con la fracción lisosomal de glándula mamaria de rata lactante (López-Gómez y col, 1995). Para el antisuero anti-PRL 16K se determinó un título óptimo de trabajo de 1:500. Otros anticuerpos usados fueron: antisueros policlonales anti-vasopresina (dilución 1:1,000) y anti-oxitocina (diluído 1:1,000) generados en conejo (donación del Dr. Samson, U. of North Dakota, U.S.A.); anti-PRL 23K denominados S-9 (dilución hasta 1:50) e IC-5 (dilución hasta 1:50), ambos generados en conejo por el NIADDK (National Institute of Diabetes, Digestive, and Kidney Diseases); antisuero policlonal anti-vasopresina generado en cobayo diluído 1:1,000 (Peninsula Laboratories, Inc., California, U.S.A.). Anticuerpos secundarios: Kit ABC, (Vector); antisuero anti-IgG de conejo acoplado a rodamina (RITC) y a fluoresceína (FITC) generados en cabra (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc., Pennsylvania, U.S.A.); antisuero anti-IgG de cobayo acoplado a biotina y acoplado a fluoresceína (FITC) (Sigma Immunochemicals).

Obtención de Tejido

Se perfundió a los animales bajo anestesia profunda (1 ml de hidrato de cloral al 3% por cada 100 g de peso corporal, vía intraperitoneal) en forma intracardiaca con 250 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, en disolución salina isotónica fría (PBS) seguidos de paraformaldehído al 4% en PBS (PFD) frío por 3-5 min a flujo rápido y otros 45 min a flujo lento hasta completar 250 ml. Cerebro e hipófisis fueron post fijados por 24 h a 24°C y transferidos a sacarosa al 30% en PBS hasta saturación del tejido, que fue seccionado en un crióstato modelo 975C (American Optical Co. Buffalo, N.Y.) a -16°C. Para microscopía electrónica el tejido se trató con PBS adicionado de glutaraldehído al 0.2% y se incubó, después de la perfusión, por dos horas en la solución perfusora, tras de lo cual fue trasferida por 24 h a PFD. Estas muestras fueron cortadas en vibratomo a 4-8°C.

Inmunocitoquímica General

El tejido cortado (con un grosor de 25 µm en el caso de cerebro y de 12 µm en el de hipófisis) fue bloqueado incubándolo durante 1 h a temperatura ambiente (T.A.) en PBS adicionado de tritón X-100 0.3% (PBSt), albúmina sérica bovina 1% y suero normal de cabra 1%. Seguidamente se incubaron las muestras con el anticuerpo primario diluído en PBSt durante la noche a 4°C. El revelado se realizó con un antisuero biotinilado anti-conejo diluído 1:200 en PBSt durante 1 h (T.A.), seguido de incubación con el complejo biotina-avidina acoplado a peroxidasa (1 h, T.A., kit ABC, Vector), tras de lo cual se expuso el tejido a diaminobencidina (DAB) al 0.05% en presencia de peróxido de hidrógeno al 0.015% en PBS durante 3-4 min. Entre cada incubación la muestra se lavó cuatro veces por 10 min cada lavado con PBSt. La muestra fue deshidratada por incubaciones sucesivas en etanol al 70% (5 min), 80% (5 min), 90% (10 min), etanol absoluto (10 min) y xilol (10 min) y se montó con Permount en laminillas,

siendo observadas y fotografiadas en un microscopio Nikon Optiphot. Las células positivas se observaron cubiertas de un precipitado café.

Localización Intracelular

Para determinar la ubicación de las células reactivas al antisuero anti-PRL 16K se hicieron cortes coronales seriados a través del hipotálamo tomando como punto de partida la región más caudal de la comisura anterior. Los cortes fueron realizados en forma caudal hasta aproximadamente 1,500 μm después de la comisura anterior. El tejido, de un grosor de 25 μm , fue revelado y montado de acuerdo al protocolo de microscopía general, tras de lo cual las células positivas fueron dibujadas con ayuda de la cámara lúcida. Como referencia otros cerebros fueron procesados de forma similar para vasopresina y oxitocina.

Inmunocitoquímica para Microscopía Electrónica

Las muestras, cortadas en vibratomo con un grosor de 30 μm , fueron incubadas por 10 min en borohidruro de sodio al 1% en PBS. El procesado posterior y revelado de marca fue idéntico al del protocolo de inmunocitoquímica general, excepto que no se usó tritón-X100 en ninguno de los pasos. En algunos casos se usó diaminobencidina intensificada para revelar (DAB 0.05%, CoCl_2 0.025%, sulfato de níquel y amonio 0.02% en PBS, pH 7.4). Después del revelado se expuso el tejido a tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1% en amortiguador de fosfatos 0.1M, pH 7.4 durante 1 h a T.A. El tejido se lavó dos veces en el mismo amortiguador y se deshidrató en etanol al 70% (10 min), 80% (10 min), 90% (10 min), 95% (10 min), etanol puro (20 min) y óxido de propileno (20 min). Seguidamente se impregnó con Epón/óxido de propileno (1:1) 1 h, Epón/óxido de propileno (2:1) 1 h y Epón puro durante toda la noche. El tejido fue incluido en plano y se dejó polimerizar por 24 h (50°C). Las inclusiones en plano fueron observadas al microscopio de luz para detectar las áreas de localización de células inmunorreactivas.

Las zonas positivas fueron incluidas en bloques de Epon previamente polimerizados. Posteriormente se cortaron de estos bloques secciones semifinas y finas en ultratomo.

Doble Marcaje

Para determinar si los antígenos tipo prolactina se colocan con vasopresina se realizó doble inmunotinción con marcadores fluorescentes. El tejido fue tratado de la misma forma que para inmunocitoquímica general y fue revelado con el antisuero anti-PRL 16K generado en conejo por medio de un segundo anticuerpo anti-IgG de conejo acoplado a rodamina (dilución 1:200). Después del revelado el tejido fue lavado cuatro veces por 10 min cada una con PBSt y procesado nuevamente, ahora con el antisuero anti-vasopresina generado en cobayo. Este se reveló con un antisuero anti-IgG de cobayo acoplado a fluoresceína (dilución 1:200). El revelado se realizó en forma secuencial debido a que los anticuerpos dirigidos contra las IgG de conejo reconocen también a las IgG de cobayo (que es el tipo de inmoglobulinas del antisuero dirigido contra VP en estos ensayos). Sin embargo, se determinó que los anticuerpos anti-IgG de cobayo no cruzan antigénicamente con las IgG de conejo. Como controles se utilizaron secciones de tejido que fueron sometidas al protocolo de doble inmunotinción completo, pero no se les expuso a alguno o ambos antisueros primarios (ver tabla 1). El resultado se analizó tanto por microscopía de epifluorescencia como por microscopía confocal (Se usó el microscopio confocal del departamento de Biofísica del CINVESTAV a cargo del Dr. Raúl Mena). En la tabla 1 se muestran los controles utilizados para verificar que en cada experimento no hubiera ocurrido reacción cruzada.

Tabla 1: Controles de revelado de anticuerpos. Para la doble inmunocitoquímica se usaron los controles descritos como 1, 2 y 3, donde se comprobó que no existía reconocimiento cruzado ni pegado inespecífico en el tejido. Los controles señalados como previos fueron utilizados para determinar si los segundos anticuerpos reconocían IgG de especies contra las cuáles no fueron generados.

	Ac α -PRL 16K	2o. Ac-R	Ac α -VP	2o. Ac-F
Control 1	-	+	-	+
Control 2	-	+	+	+
Control 3	+	+	-	+
Problema	+	+	+	+
Controles Previos				
Control 1	Ac de conejo α -PRL 16K		2o. Ac α -IgG cobayo (Acoplado a fluoresceína)	
Control 2	Ac de cobayo α -VP		2o. Ac α -IgG conejo (Acoplado a rodamina)	

Ac α -PRL 16K : generado en conejo

Ac α -VP : generado en cobayo

2o. Ac-R : Ac α -IgG de conejo acoplado a rodamina

2o. Ac-F : Ac α -IgG de cobayo acoplado a fluoresceína

RESULTADOS

Morfología

El uso de diaminobencidina sin intensificar nos ofreció una marca de color café oscuro. En la figura 1 aparece (en blanco y negro) un ejemplo de una célula teñida de esta forma. En general las neuronas inmunorreactivas a PRL fueron redondas u ovals, con pocas dendritas (generalmente dos o tres), y aparentemente todas son de tipo magnocelular. También se observa una gran cantidad de procesos en la zona de los núcleos magnocelulares hipotalámicos. Como se mostrará más adelante, fuera de los núcleos hipotalámicos las células tienden a ser escasas y casi no se observan procesos.

Especificidad del antisuero anti-PRL 16K

Estudios realizados mediante la técnica de radioinmunoensayo habían mostrado previamente que el antisuero anti-PRL 16K utilizado en este estudio no presentaba reacción cruzada con moléculas homólogas a la PRL de rata, como la hormona de crecimiento proveniente de rata y prolactinas bovina y humana. Asimismo, mediante el radioinmunoensayo no se observó reacción cruzada con VP, OT, neurofisina I y II y otros péptidos presentes en el SHN, a saber, β -lipotropina, β -endorphina, [Met]encefalina y adrenocorticotropina (residuos 1-39) (Clapp y col, 1994).

La especificidad del antisuero fue también corroborada en los estudios de inmunocitoquímica. En las fotografías de la derecha de la figura 2 puede observarse, en secciones de tejido neurohipofisiario, que los anticuerpos responsables de la marca para PRL fueron totalmente preadsorbidos con prolactina 23K a una concentración de 10 μ M y con 1 μ M de prolactina 16K. En cambio, la tinción no se modificó cuando el antisuero fue previamente adsorbido con vasopresina (100 μ M), oxitocina (100 μ M), neurofisina I

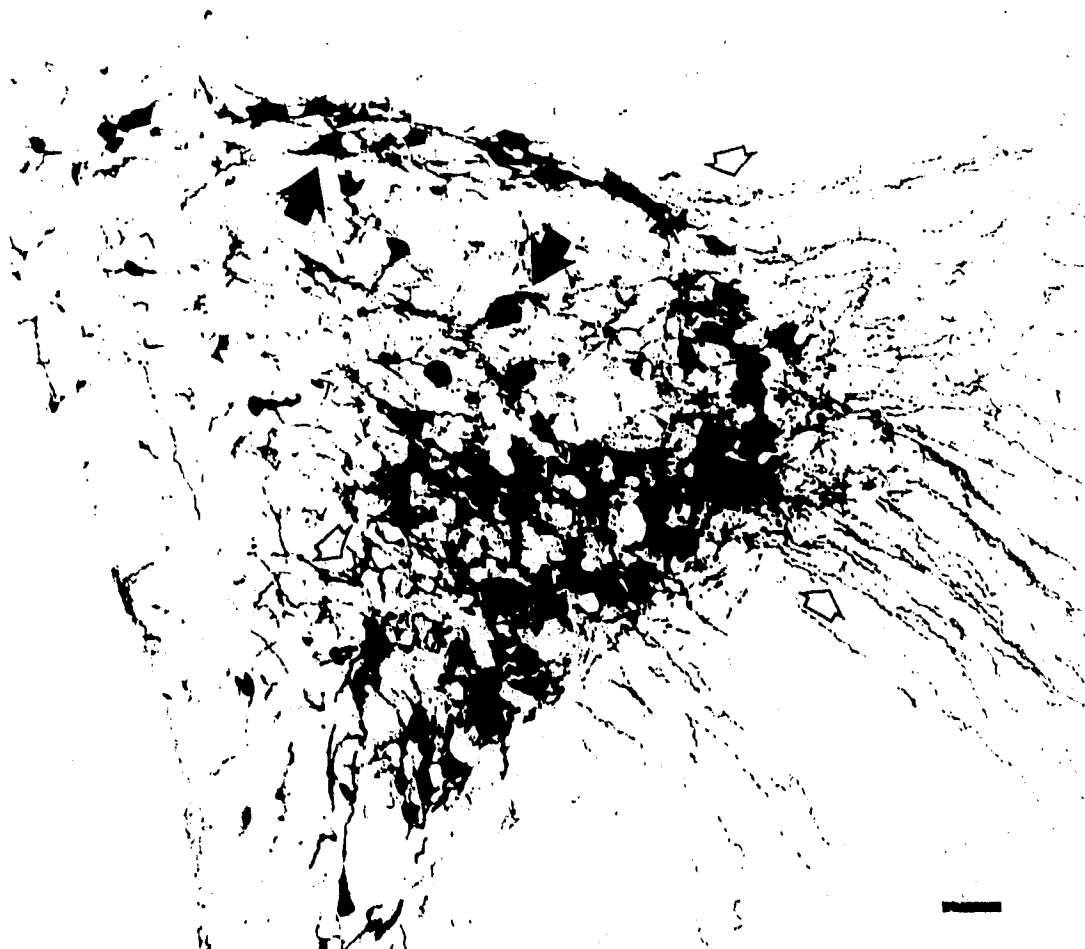


FIGURA 1. Tinción, con el uso de un antisuero α PRL 16K y por medio de la técnica ABC, de células inmunorreactivas a PRL en el núcleo PV. Se puede apreciar que se trata de neuronas de tipo magnocelular de aproximadamente 25-30 μ m (ejemplos señalados con flechas). Asimismo, se pueden observar varios procesos inmunorreactivos en la vecindad del núcleo PV (flechas pequeñas) (Calibración: 50 μ m).

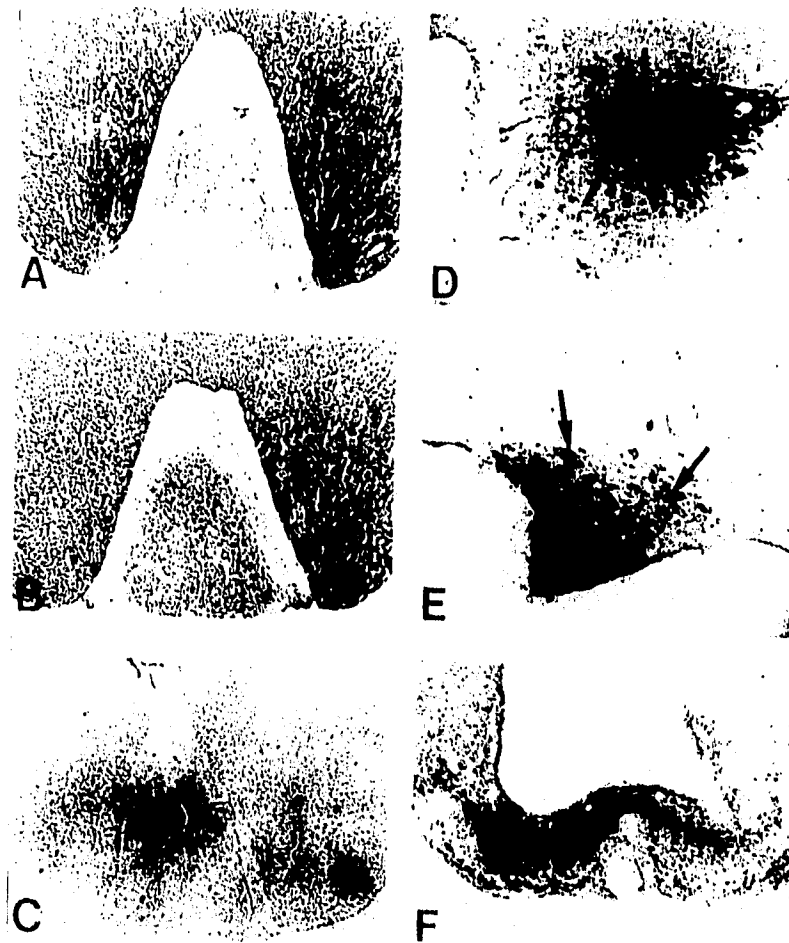


FIGURA 2. PreadSORCIÓN del antisuero anti-PRL 16K y tinción en el SHN. A la izquierda se muestran cortes horizontales de hipófisis de 12 μm de grosor que fueron revelados con el antisuero dirigido contra PRL 16K diluido 1:500. A la derecha se aprecian cortes coronales del cerebro en la región de (D) los núcleos PV, (E) los núcleos SO y, (F) la eminencia media. En (A) se muestra el resultado obtenido con un antisuero dirigido contra la PRL 23K, donde lo único que se tiñe es la hipófisis anterior (AH), pero no la intermedia (IH) ni la posterior (NH). En (B), con el uso de el antisuero anti-PRL 16K, se puede apreciar tinción específica en la neurohipófisis y en la hipófisis anterior, mas no en la hipófisis intermedia. El antisuero fue previamente preadsorbido durante 24 h con prolactina 23K a una concentración de 10 μM , resultado que aparece en (C). La preadsorción con PRL 16K 1 μM nos ofreció una imagen similar (no mostrada). El grado de tinción obtenido con el antisuero previamente adsorbido con vasopresina 100 μM , oxitocina 100 μM , y neurofisiina I 10 μM fue muy semejante al obtenido con el antisuero sin preadsorber (B). Se señalan también con flechas algunas neuronas inmunorreactivas en los núcleos PV (D) y en los SO (E) (Izquierda, aumento, 10x; derecha, aumento 20x).

(10 μM) y neurofisiina II (10 μM) (Resultados no mostrados). En la parte izquierda de la figura 2 se muestra el resultado típico de la tinción en los núcleos PV (Fig. 2D), SO (Fig. 2E) y en la lámina interna de la eminencia media, por donde pasan los axones de estas neuronas (Fig. 2F). Estos datos, junto con los obtenidos previamente mediante radioinmunoensayo, indican que los antígenos reconocidos por el antisuero empleado pertenecen a la familia de las prolactinas y se localizan en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario.

Distribución de las neuronas con inmunorreactividad tipo PRL en los Núcleos PV y SO del hipotálamo de la rata

La inmunorreactividad a PRL se observó únicamente en neuronas magnocelulares localizadas en los núcleos paraventriculares y supraópticos del hipotálamo, aunque también se encontraron células inmunorreactivas dispersas en la región periventricular y en los subnúcleos magnocelulares hipotalámicos. En la figura 3 se muestra un esquema representativo de la distribución tanto de las células inmunorreactivas para prolactina como de las marcadas para VP y OT. Este esquema fue obtenido a través del análisis de cortes secuenciales a lo largo del hipotálamo anterior. En los núcleos paraventriculares las células inmunorreactivas a PRL comienzan a ser detectadas en las regiones más caudales (900-1,000 μm) con respecto a la comisura anterior, concentrándose en la región lateroposterior de los mismos. Las células se agrupan preferentemente en el centro del núcleo, aunque llegan a observarse también algunos somas dispersos en los bordes ventrales y dorsales de dicho núcleo. Con respecto a los núcleos SO, las células se observan a todo lo largo de los mismos y, aunque no presentan una agrupación diferencial clara dentro del núcleo, tienden a localizarse en la región ventral y proximal (con respecto al quiasma óptico) de los mismos (Figura 3).

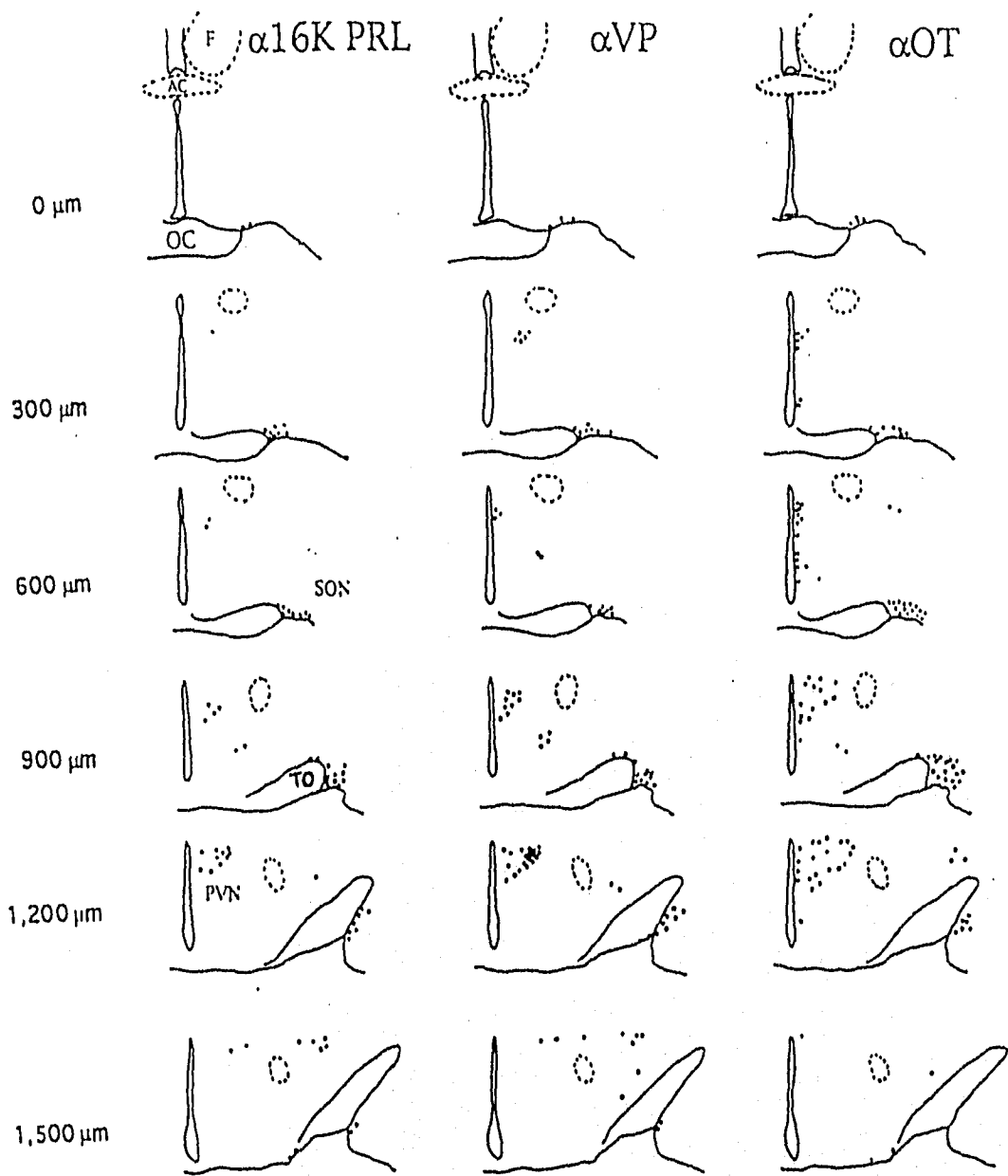


FIGURA 3. Se muestran una serie de dibujos de secciones representativas del hipotálamo que fueron teñidas con antiseros contra PRL 16K, VP u OT. A la izquierda se muestran las distancias tomadas en forma caudal con respecto a la sección más caudal de la comisura anterior. Los puntos de referencia son el tercer ventrículo, el fórnix (F), la comisura anterior (AC), el quiasma óptico (OC) y los tractos ópticos (TO). Cada punto es representativo de tres neuronas.

La distribución de las células positivas para PRL fue comparada con la de los elementos magnocelulares vasopresinérgicos y oxitocinérgicos. Esto permitió determinar que las células hipotalámicas productoras de prolactinas siguen una distribución muy similar a la de las células vasopresinérgicas. Cortes seriados del hipotálamo en regiones representativas de estas diferencias, a nivel tanto de los núcleos PV como de los SO, son mostrados como un ejemplo de este resultado en la fig. 4. Claramente se aprecia que la distribución de las células inmunorreactivas a prolactina es muy semejante a la de las células vasopresinérgicas en ambos núcleos y que es diferente a la de las oxitocinérgicas. Estas últimas tienden a encontrarse principalmente en la región medial de los núcleos PV y ocupan un área mayor de los mismos (comparar la figura 4d con la 4e y 4f); con respecto a los núcleos SO, aunque las células inmunorreactivas a OT también se distribuyen a lo largo de los mismos, tienden a encontrarse en posiciones más dorsales que las células positivas a VP y a PRLs (Fig. 4a, 4b y 4c).

Sin embargo, los núcleos magnocelulares hipotalámicos no fueron los únicos en los que se observaron neuronas inmunorreactivas a PRL. También fue detectada una población importante de neuronas positivas a PRL dispersas entre los núcleos PV y SO, principalmente en las zonas dorsales de los mismos y en algunos de los núcleos accesorios magnocelulares del hipotálamo. La tabla 2 muestra que esta población neuronal contribuye aproximadamente con un 20% de las neuronas magnocelulares inmunorreactivas totales. Con fines comparativos se muestran los resultados obtenidos para el número total de neuronas magnocelulares positivas a VP y a OT.

Colocalización de los antígenos tipo PRL con VP

Los resultados de distribución de las células obtenidos con inmunoperoxidasa sugirieron fuertemente la posibilidad de colocalización celular de vasopresina y los antígenos tipo prolactina.

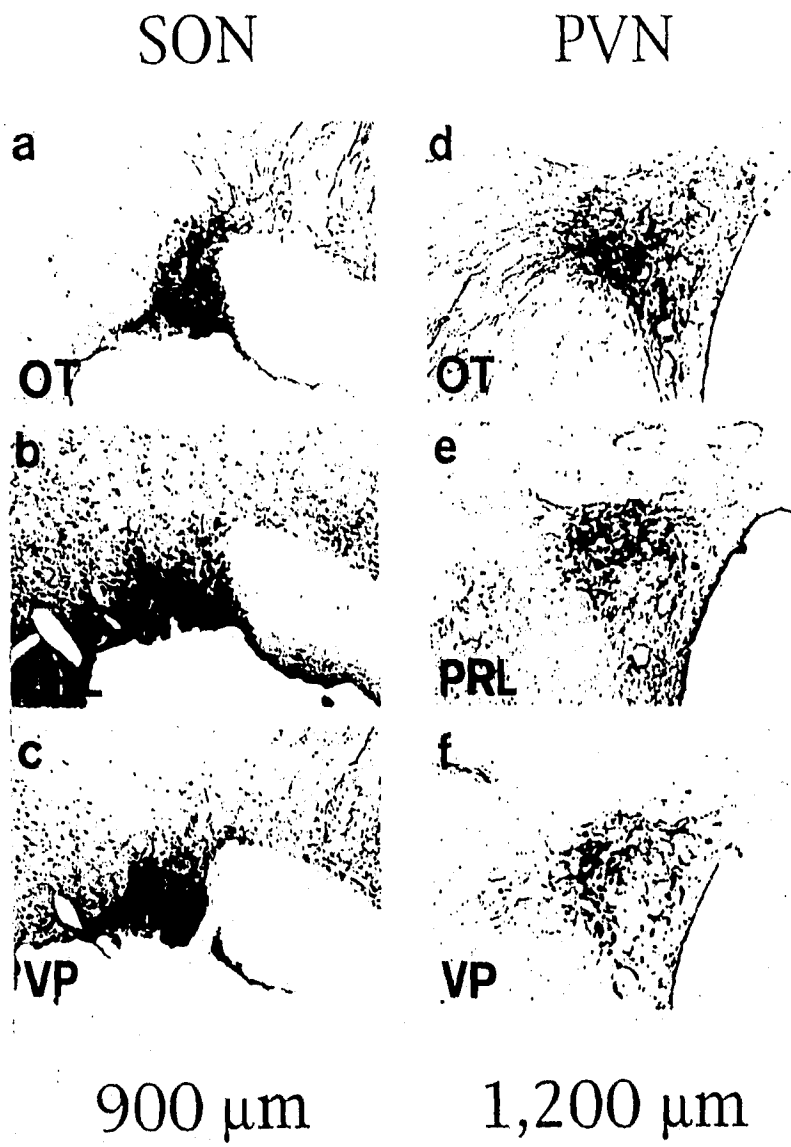


FIGURA 4. Distribución de las células inmunorreactivas a los distintos antisueros. Se muestra un ejemplo de las observaciones con respecto a la distribución de neuronas magnocelulas inmunorreactivas para oxitocina (OT), prolactina 16K (PRL) y vasopresina (VP) en los núcleos supraópticos (SON) y paraventriculares (PVN). Las fotografías de cada núcleo son tomadas de cortes consecutivos de 25 μm cada uno. Los valores en la parte inferior indican la distancia de los cortes en forma caudal a la comisura anterior (Aumento, 16x).

TABLA 2. Número de neuronas magnocelulares positivas a prolactina, vasopresina y oxitocina en el hipotálamo anterior de la rata. Se muestran los números y porcentajes de neuronas positivas a los tres antígenos en los núcleos PV, SO y otras regiones del hipotálamo de ratas hembras en la fase de estro.

	No. de neuronas inmunorreactivas a PRL					
	NPV	%	NSO	%	Otros	%
Rata 1	1148	22.1	2941	56.7	1096	21.1
Rata 2	2122	25.1	4818	57.0	1515	17.9
Rata 3	1166	15.0	5216	67.2	1384	17.8
	No. de neuronas inmunorreactivas a Vasopresina					
Rata 4	2582	25.3	5103	50.0	2520	24.7
	No. de neuronas inmunorreactivas a Oxitocina					
Rata 5	2090	21.0	4234	42.5	3625	36.4

Para determinar si existía colocalización de estos dos antígenos en una misma neurona se hicieron ensayos de doble marcaje con inmunofluorescencia. Los antígenos tipo prolactina fueron revelados con un segundo anticuerpo acoplado a rodamina, que fluoresce en color rojo, mientras que la marca de vasopresina fue revelada con fluoresceína, que se observa de color verde. Por microscopía de epifluorescencia se observó que los antígenos tipo PRL colocalizaban con vasopresina pero no con oxitocina (resultados no mostrados). El uso de microscopía confocal nos permitió corroborar estos resultados, ya que se determinó que la mayoría de las células con inmunoreactividad tipo PRL también fueron teñidas con los anticuerpos dirigidos contra vasopresina (figuras 5 y 6). La figura 5 muestra un ejemplo de un núcleo SO teñido para prolactina y vasopresina. En éste la mayoría de las células y proyecciones son inmunorreactivas para ambos anticuerpos, aunque puede apreciarse una célula que sólo presenta inmunoreactividad para vasopresina (Figura 5c). En general en todos los experimentos se observó una pequeña población de células vasopresinérgicas que carecían de inmunoreactividad tipo PRL.

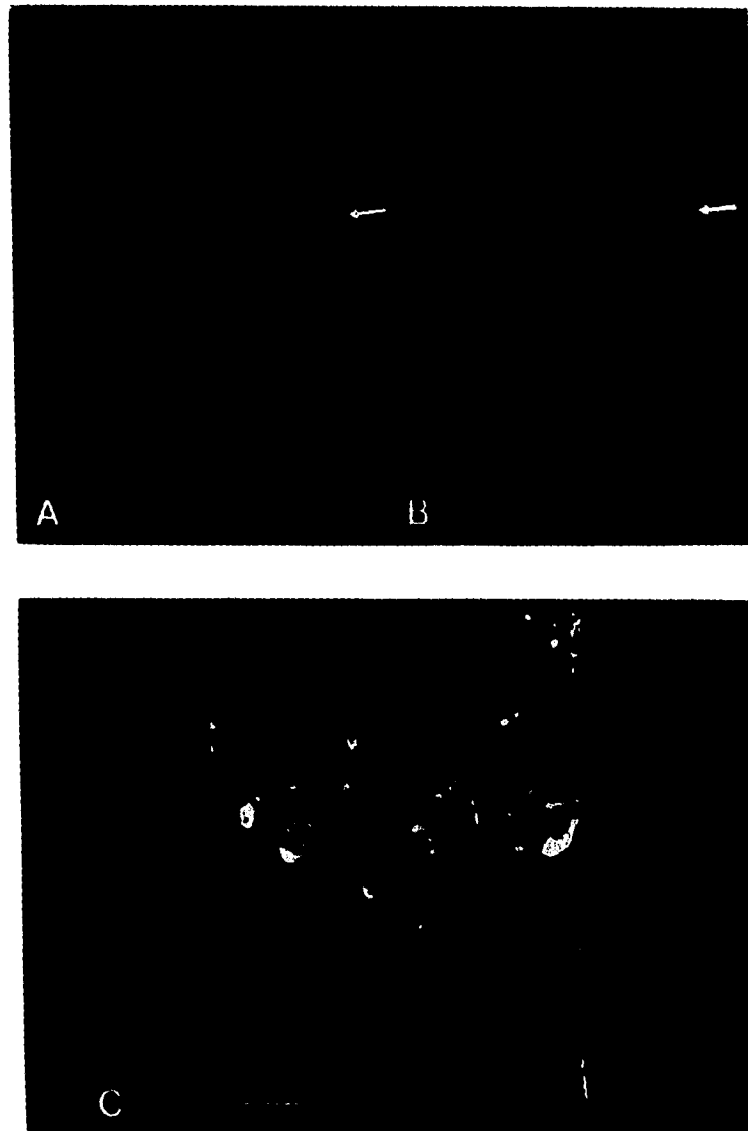


FIGURA 5. Micrografía de microscopía confocal donde se muestra la inmunorreactividad de (a) VP, revelada con fluoresceína y (b) de PRL, que fue revelada con rodamina, en un núcleo supraóptico. En este núcleo todas las células y procesos marcados para PRL fueron teñidas también para VP. Sin embargo, se puede apreciar claramente una célula teñida sólo para VP (flecha en A y B). En (c) se muestra una imagen combinada de ambos resultados. En ésta los elementos donde coexisten ambos antígenos se muestran en amarillo, apreciándose nuevamente la neurona que sólo es reactiva para VP (flecha) (Calibración: 20 μ m).

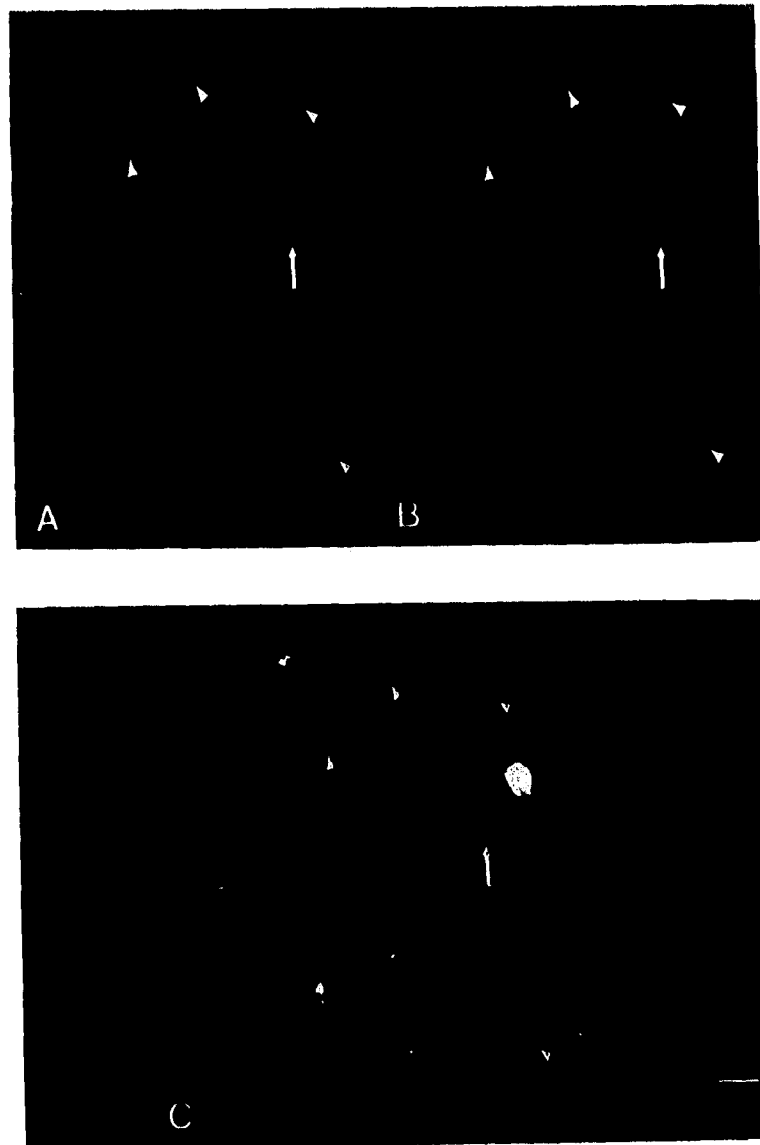


FIGURA 6. Micrografía de microscopía confocal donde se muestra la colocalización de PRL y VP. Imagen a mayor aumento de una sección de los núcleos paraventriculares, donde se muestra nuevamente el patrón de revelado para VP (A) y PRL (B). Pueden observarse varias proyecciones donde sólo se aprecia la marca de vasopresina (cabezas de flecha), así como una célula que sólo es inmunorreactiva a PRL (flecha). En (c) la imagen combinada muestra colocalización tanto por marca de color amarillo como por coexistencia de elementos rojos y verdes dentro de la misma neurona. En esta imagen se aprecia nuevamente la neurona teñida sólo para PRL (flecha) (Calibración: 10 μ m).

Sin embargo, también fueron detectadas neuronas que se tiñeron para PRL, pero no para vasopresina, como se muestra en la figura 6. En ésta aparece una sección de los núcleos PV, donde se aprecia una célula y varias proyecciones donde coexisten ambas marcas y una célula teñida sólo en color rojo (Figura 6c). Como se puede apreciar en la misma figura, la distribución de ambos antígenos en el interior de la célula no es la misma: mientras que la marca de vasopresina tiende a encontrarse distribuída en forma homogénea en todo el cuerpo celular, la marca de PRL se observa como un patrón punteado, encontrándose dicho patrón tanto en el soma como en las proyecciones celulares (Figura 6b).

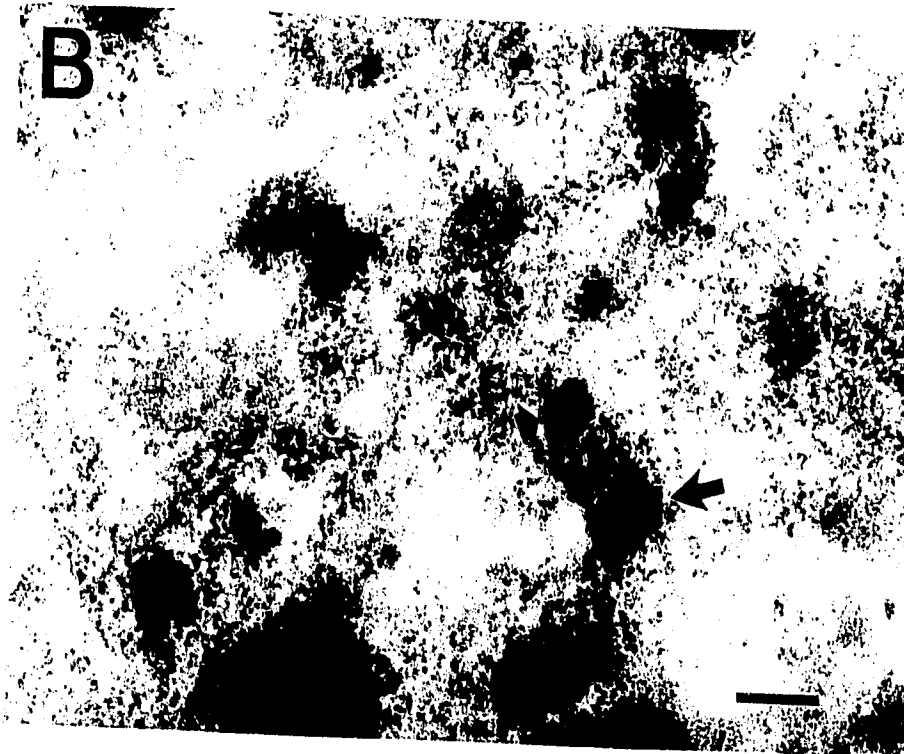
Distribución intracelular de los antígenos tipo PRL

El tipo de distribución de la marca de PRL sugirió que los antígenos responsables de ésta se encuentran altamente compartimentalizados. Con el propósito de determinar el tipo de estructuras en que se distribuye la marca tipo PRL se realizaron ensayos de inmunoperoxidasa que fueron examinados a nivel de microscopía electrónica. El producto de reacción de la peroxidasa fue encontrado, a nivel del soma celular, en vesículas de diferentes tamaños que van de 50 a 200 nm. Las vesículas se observaron distribuídas en todo el soma, e incluso se encontraron algunas que parecen estar desprendiéndose del retículo endoplásmico (Figura 7a).

También se observaron vesículas de núcleo denso no marcadas. Estas vesículas tienen un tamaño semejante a las que sí presentan marca (Figura 7b) y, en base a los ensayos de colocalización descritos, creemos que pudiesen contener sólo VP. La marca de PRL no fue observada solamente en el soma neuronal, sino también en proyecciones celulares como las ilustradas en la figura 7c.



FIGURA 6. Localización intracelular de antígenos tipo PRL. Microfotografías de la localización del producto de reacción de la peroxidasa en la región de los NPV. En (A) se muestra una sección del soma neuronal en la región del retículo endoplásmico rugoso. La inmunorreactividad se asocia a lo que parecen ser vesículas que van de 50 a 200 μm de diámetro. Algunas de estas vesículas parecen estar desprendiéndose del retículo endoplásmico (flechas) (Calibración: 500 nm). Asimismo, se observó que las vesículas inmunorreactivas (flecha grande) se encuentran mezcladas con otras no reactivas (B) (flecha pequeña) (Calibración: 200 nm). En (C) se ilustran dos procesos neuronales que presentan inmunorreactividad específica tipo PRL (flechas) (Calibración: 500 nm).



DISCUSION

En el presente trabajo se observó que la inmunorreactividad para PRLs que se encuentra en la región del hipotálamo se asocia a neuronas vasopresinérgicas de tipo magnocelular localizados tanto en los núcleos PV como en los SO. La inmunorreactividad tipo PRL se observó tanto en los somas como en las proyecciones de estas células. La colocalización de PRLs con VP en las mismas células del SHN podría tener implicaciones fisiológicas, que serán discutidas más adelante.

Aunque la detección de antígenos tipo PRL en el sistema nervioso central se ha reportado desde fines de los años 70 y principios de los 80 (Fuxe y col, 1976; Toubeau y col, 1979; Hansen y col, 1982; Thompson, 1982; Emanuele y col, 1986; DeVito, 1988a), el consenso general es que existen muy pocas neuronas prolactinérgicas y que éstas se encuentran preferencialmente en los núcleos ventromedial y arcuato del hipotálamo (Toubeau y col, 1979; Hansen y col, 1982; Harlan y col, 1989). Si bien la localización de PRLs en los núcleos PV y SO se había observado en algunos estudios (Toubeau y col, 1979; Hansen y col, 1982; Paut-Pagano y col, 1993), la inmunorreactividad tipo PRL presente en éstos sólo aparecía en un número escaso de neuronas y solamente cuando se bloqueaba el transporte de axoplásmico con colchicina (Toubeau y col, 1979; Paut-Pagano y col, 1993). Fue por ello que resultó sorprendente detectar PRLs inmunorreactivas en una población grande de neuronas de los núcleos magnocelulares hipotalámicos, aun en ausencia de colchicina. La inmunorreactividad tipo PRL sólo se observó, sin embargo, cuando se utilizó un antisuero dirigido contra el segmento amino-terminal de la PRL, o PRL 16K (Clapp y col, 1994). De tal manera que al igual que lo reportado en la literatura (Thompson, 1982; Harlan y col, 1989; Siaud y col, 1989; Paut-Pagano y col, 1993), cuando utilizamos un antisuero dirigido contra la forma completa de PRL (PRL 23K) no observamos inmunorreacción en el SHN (Clapp y col, 1994; Torner y col, 1995).

En apoyo a la naturaleza tipo PRL de los antígenos detectados por el antisuero anti-PRL 16K se observó que la inmunotinción neurohipofisiaria se preadsorbe con un exceso tanto de PRL 16K como de PRL 23K. Sin embargo, dicha inmunotinción no se preadsorbió con los principales péptidos y proteínas presentes en este sistema como son VP, OT, neurofisiina I y II (Resultados de esta tesis, Clapp y col, 1994). Adicionalmente, en radioinmunoensayo no se observó reacción cruzada entre este antisuero y una serie grande de péptidos neurohipofisarios (Clapp y cols, 1994). La naturaleza tipo PRL de los antígenos presentes en el SHN fue documentada asimismo a través de una serie de evidencias experimentales, a saber: (a) la detección bioquímica, en extractos neurohipofisarios, de proteínas inmunorreactivas de 23 y 14 kDa tanto al antisuero anti-PRL 16K como a anticuerpos poli y monoclonales anti-PRL 23K (Clapp y col, 1994; Torner y col, 1995); (b) la demostración de que medios condicionados por neurohipófisis en cultivo, enriquecidos con las proteínas de 23 y 14 kDa, tienen actividad biológica en dos bioensayos específicos para PRL: la proliferación de células derivadas de linfoma murino (Nb2), y la inhibición de la proliferación de células endoteliales. Ambas actividades biológicas se bloquean en presencia del antisuero anti-PRL 16K (López-Gómez y col, 1995). Finalmente (c), núcleos PV y SO aislados contienen el ARN mensajero para PRL (Clapp y col, 1994).

Las evidencias señaladas documentan y apoyan nuestra hipótesis de trabajo, originada en los estudios inmunocitoquímicos antes referidos, de que el gen de la PRL se expresa en el SHN y la PRL se procesa hacia variantes moleculares de diversos tamaños (Clapp y col, 1994). La forma más abundante en este sistema es una PRL de 14 kDa (Clapp y col, 1994; Torner, 1995), por lo cual hemos propuesto que la falta de detección de PRLs en el SHN referida en la literatura podría asociarse a la baja afinidad de la PRL 14K por los anticuerpos empleados en dichos estudios, ya que todos ellos se encuentran dirigidos contra la PRL completa (Fuxe y col, 1976; Toubeau y col, 1979; Hansen y col, 1982; Thompson, 1982; Emanuele y col, 1986; DeVito, 1988a).

Estudios adicionales, en apoyo a la producción local de PRLs por el SHN, mostraron que dichas PRLs no procedían de la adenohipófisis, que es la fuente principal de PRLs circulantes (Neill, 1974; Baulieu y Kelly, 1990; Neill y Nagy, 1994). Los estudios mencionados mostraron que la inmunorreactividad tipo PRL en el PV y SO no desaparece después de la hipofisectomía crónica (de tres semanas a un mes después de la extirpación de la hipófisis anterior y posterior) (Torner y col, 1995).

Con el fin último de estudiar la regulación y significado funcional de las PRLs neurohipofisiarias, en el presente trabajo analizamos la distribución celular de las PRLs inmunorreactivas en los núcleos PV y SO a través del hipotálamo y la comparamos con la observada para VP y OT. Dado que la mayoría de las neuronas magnocelulares de ambos núcleos contiene exclusivamente VP u OT y sólo un grupo muy reducido (1-2%) colocaliza a ambos péptidos (Baulieu y Kelly, 1990), semejanzas entre la distribución de las células positivas a PRL y la de una u otra población neuronal podría implicar la colocalización celular de las PRLs con uno u otro péptido neurohipofisiario y por ende sugerir mecanismos de regulación y/o funciones comunes entre la PRL y/o la VP o la OT.

La distribución celular de neuronas positivas a PRL, analizada por inmunocitoquímica en cortes secuenciales a través del hipotálamo mostró que éstas, tanto en el núcleo PV como en el SO, siguen un patrón muy similar al de las neuronas vasopresinérgicas. Adicionalmente, observamos neuronas magnocelulares con inmunorreactividad tipo PRL dispersas en el área anterior hipotalámica, en el núcleo circular, en la región periventricular lateral a los núcleos PV y en la región comprendida entre los núcleos PV y los SO, principalmente en sus zonas más caudales. También en estas regiones, el tipo de distribución seguido por las neuronas inmunorreactivas a PRL fue muy similar al de las células vasopresinérgicas. Para ilustrar con un ejemplo, una de las diferencias más claras entre la localización de neuronas positivas a VP y a OT se observa en el área periventricular caudal (300-700 μm) a la comisura anterior. En ella

existe una población muy importante de neuronas magnocelulares fuertemente inmunorreactivas a OT, pero prácticamente no se observan células productoras de PRLs ni de VP (Figura 3).

La distribución observada por nosotros para las células vaso y oxitocinérgicas a través del hipotálamo fue similar a la descrita por otros autores (Rhodes y col, 1981; Silverman y Zimmerman, 1983). La similitud entre la distribución de las células inmunorreactivas para PRLs y VP sugirió su colocalización en las mismas neuronas. Esta posibilidad fue demostrada con ensayos de doble marcaje con anticuerpos específicos anti-PRL y anti-VP generados en especies diferentes, a saber, en conejo y cobayo respectivamente.

El uso de doble inmunocitoquímica de fluorescencia permitió determinar que una gran parte, pero no todas las neuronas magnocelulares productoras de VP, contienen los antígenos tipo PRL. Este resultado era esperado, debido a que la población aparente detectada de células vasopresinérgicas es mayor a la de las células productoras de PRLs (Tabla 2). El análisis de estos resultados con microscopía confocal nos permitió corroborar estos hallazgos, pero además nos mostró la existencia de neuronas magnocelulares que presentan inmunoreactividad por PRLs, pero no para VP (Figuras 5 y 6). Estas neuronas negativas a VP presumiblemente podrían contener OT, ya que las neuronas magnocelulares de las regiones hipotalámicas sólo parecen contener a uno u otro de ambos péptidos (Reichlin, 1992; Sawchenko y col, 1992). Por tanto, estos hallazgos sugieren que, adicionalmente a las neuronas que colocalizan VP y PRLs, una población menos abundante podría colocalizar OT y PRLs. Estudios de doble marcaje con anticuerpos anti PRL y OT se requieren para documentar esta posibilidad.

Independientemente de que se colocalizara o no la marca de PRLs con la de VP, en todos los casos se observó que la inmunoreactividad de VP tiende a distribuirse en forma homogénea en el soma celular y con escasas zonas de mayor densidad de fluorescencia (Figuras 5 y 6). En cambio, la marca de PRLs presenta preferentemente un

patrón punteado muy definido. Esta distribución subcelular de ambos antígenos es aparente no sólo en el soma, sino también en las proyecciones neuronales. El patrón punteado observado con microscopía confocal ha sido asociado por otros autores con la distribución de los antígenos respectivos en vesículas de núcleo denso (Zhang y col, 1996). Para determinar si la distribución subcelular de las PRLs en este sistema se asociaba con vesículas de núcleo denso, y por tanto se diera el ingreso de dichas PRLs a la vía de secreción neuronal, estudiamos la localización de los antígenos tipo PRL a nivel de microscopía electrónica mediante la técnica de inmunoperoxidasa. Estos estudios corroboraron el que la marca debida a PRLs se asocia, tanto a nivel del soma como de las proyecciones celulares, con lo que parecen ser vesículas de núcleo denso (Figura 7). Estas tienden a encontrarse distribuídas en todo el soma celular, y algunas se observan asociadas al retículo endoplásmico rugoso (RER) (Figura 7a). También se observaron vesículas de alta densidad positivas a PRL en proyecciones neuronales (Figura 7c). La localización de PRLs inmunorreactivas en vesículas de núcleo denso coincide con reportes en la literatura donde se les ha observado en la región del hipotálamo medio basal (Nishizuka y col, 1990), la zona externa de la eminencia media (Siaud y col, 1989) y en extractos hipotalámicos (DeVito y col, 1987).

Estos resultados sugieren el que las PRLs neurohipofisarias ingresan a la vía de secreción y son liberadas bajo condiciones fisiológicas por las terminales nerviosas de este sistema. Estos hallazgos corroboran observaciones de nuestro grupo que muestran la secreción de antígenos tipo PRL al medio de incubación de neurohipófisis y de explantes hipotálamo-neurohipofisarios *in vitro*.. Dicha secreción es menor en ausencia de Ca^{2+} y aumenta por despolarización por K^{+} en forma paralela a la observada para VP (Torner y col, 1995). Dadas las características neuroendócrinas del SHN es posible concebir el que dicho sistema constituyese una fuente de secreción adicional de PRLs a la circulación. En este sentido, observaciones recientes de nuestro grupo mostraron la presencia en la circulación de la rata de una PRL inmunorreactiva de 14 kDa similar a la

detectada en la neurohipófisis (Torner y col, 1995). Por otra parte, es factible que las PRLs secretadas por las terminales neurohipofisiarias tengan efectos locales autócrinos y/o parácrinos modulando, como se ha propuesto para otros péptidos colocados en este sistema (Marley y col, 1984; Jarvis y col, 1988 y 1989; van Wimersma Greidanus y Hellebrekers, 1991; Sawchenko y col, 1992; Renaud y Bourque, 1994).

Cuál podría ser el significado funcional de las PRLs neurohipofisiarias? Un denominador común de dicho sistema es su participación en la homeostasis de los fluidos extracelulares. En efecto, VP y en menor grado OT, se encuentran involucradas en la retención de Na⁺ y en la reabsorción de agua a nivel renal, además de que ambas son capaces de promover la contracción de vasos sanguíneos en casos de deshidratación aguda. Por su parte, entre los efectos mediados por PRL se encuentran acciones osmorregulatorias, tanto relacionadas como no relacionadas con la reproducción (Nicoll, 1974 y 1980). Los efectos osmorregulatorios no relacionados a la reproducción son de mayor relevancia en vertebrados inferiores, si bien también han sido observados en mamíferos (Nicoll, 1974). Estos efectos incluyen acciones directas sobre diversos epitelios, incluido el renal. En éste, la PRL inhibe la salida de sodio y estimula la retención de agua (Nicoll, 1974). Sin embargo, en los mamíferos las acciones osmorreguladoras de la PRL se manifiestan preferentemente sobre el epitelio mamario regulando la composición de la fase acuosa de la leche (Nicoll, 1974 y 1980). De acuerdo a lo anterior, podría proponerse como hipótesis de trabajo que la localización de las PRLs en el SHN podría implicar su participación en la mediación de los efectos regulatorios de dicho sistema sobre la regulación del equilibrio hídrico y de electrolitos del plasma. En este sentido, la acción de las PRLs neurohipofisiarias podría ser hormonal, siendo distribuída vía la circulación sistémica hacia órganos blanco como el riñón, y/o de tipo local, modificando la secreción de VP y/o OT.

CONCLUSIONES

Los resultados encontrados nos permiten concluir lo siguiente:

- 1.- La distribución de las células productoras de PRLs es semejante a la de las células vasopresinérgicas a través de los núcleos paraventriculares y supraópticos hipotalámicos.
- 2.- Los antígenos tipo PRL colocalizan con vasopresina en la mayoría de las neuronas magnocelulares inmunorreactivas. También se detectaron neuronas que aparentemente sólo contienen vasopresina o prolactinas.
- 3.- Los antígenos tipo PRL se encuentran en vesículas intracelulares de gran tamaño en las neuronas magnocelulares. Podrían encontrarse en vesículas diferentes a las que contienen vasopresina en la misma célula.

De estas conclusiones se desprende la siguiente hipótesis:

Miembros de la familia de las prolactinas son producidas por neuronas magnocelulares vasopresinérgicas del sistema hipotálamo-neurohipofisario.

APENDICE

Prolactina

Características Estructurales

En los mamíferos, el gen que codifica para la prolactina (PRL) es transcrito, y posteriormente traducido, según la especie, a una proteína constituida por 197-199 aminoácidos que posee un peso molecular aproximado de 23 kDa (PRL 23K). La secuencia primaria de esta hormona contiene seis dominios estructurales que, en conjunto, constan de 34 aminoácidos altamente conservados en la escala filogenética. Se ha sugerido que son estos dominios los responsables de las acciones fisiológicas comunes a las prolactinas de diferentes especies de mamíferos (Sinha, 1992; Xiong y col, 1992; Yasuda y col, 1986; Yasuda y col, 1991). La estructura terciaria de la PRL es mantenida mediante tres puentes disulfuro formados por los seis residuos de cisteína que contiene la proteína. Los enlaces se establecen entre cisteínas consecutivas y, en el caso de la rata, se forman entre cys-4 y cys-9, cys-56 y cys 172 y cys-189 y cys-197 generando, de esta forma, dos asas pequeñas terminales y un asa grande intermedia (Parlow y Shome, 1976).

La PRL existe como una familia de variantes moleculares que son, en su mayor parte, producto de modificaciones postraduccionales de la PRL 23K, que usualmente constituye alrededor del 80% de la PRL total circulante (Sinha, 1992). Entre ellas se encuentran formas de peso molecular variado (Aston y col, 1984; Cole y col, 1991; Bollengier y col, 1989; Sinha, 1992; Sinha y Gilligan, 1984), glicosiladas (Bollengier y col, 1989; Lewis y col, 1985; Sinha y Jacobsen, 1987), fosforiladas (Brooks y col, 1994; Wang y Walker, 1993), desamidadas (Graf y col, 1970; Nyberg y col, 1980), formas proteolíticamente modificadas, etc. Entre las formas modificadas por proteólisis se ha

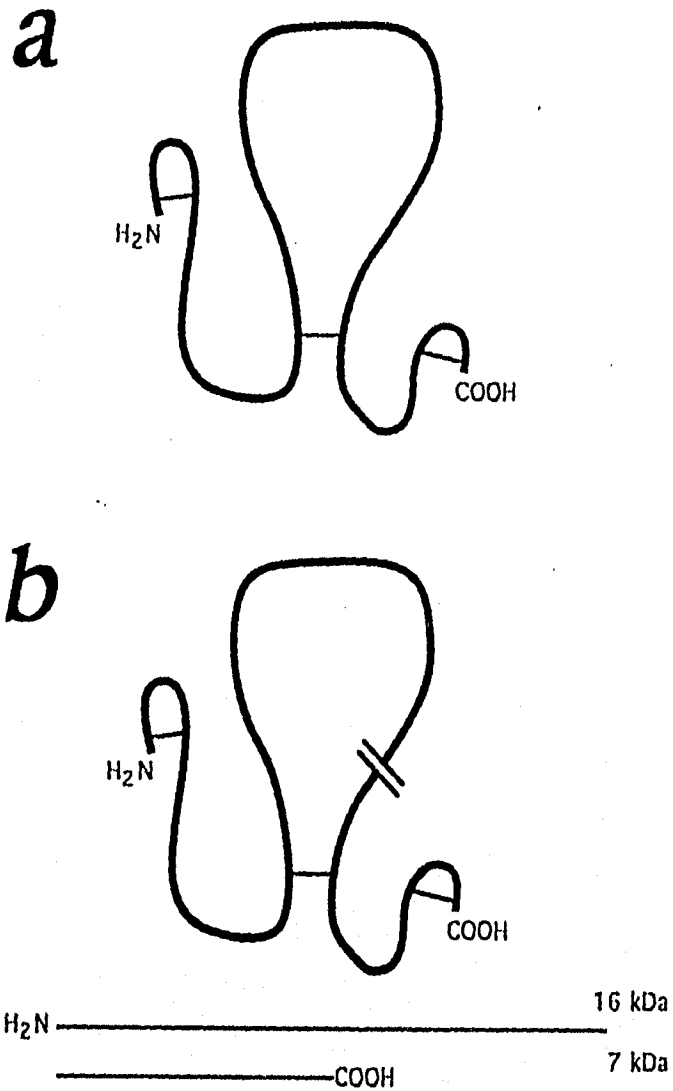


FIGURA A1. Estructura de la PRL 23K y 16K. En (a) se muestra la estructura de la PRL 23K de rata, junto con los tres enlaces disulfuro que estabilizan a la molécula. En (b) se encuentra representado el corte específico que sufre por incubación con la fracción lisosomal de glándula mamaria de rata lactante y que produce la prolactina cortada (PRLc). La reducción de ésta permite la separación de los dos fragmentos producto del corte y que se mantengan unidos por el puente disulfuro intermedio.

identificado una con un corte en el asa mayor (o prolactina cortada) (Mittra, 1980a y 1980b; Wong y cols, 1986) e incluso los dos fragmentos que pueden derivarse por la reducción de esta última y cuyo peso es de 16 kDa para el extremo amino terminal y 7kDa para el carboxilo terminal (Mittra, 1980a).

Funciones

La PRL posee un número considerable de acciones biológicas: hasta el momento le han sido atribuidas más de 80 acciones diferentes (Nicoll, 1974). En general, dichas funciones se han catalogado de forma que pertenezcan a alguna de las siguientes categorías: (1) balance hídrico y de electrolitos; (2) reproducción; (3) crecimiento y desarrollo; (4) efectos metabólicos; (5) acciones sobre estructuras ectodérmicas e integumentarias; (6) efectos conductuales, y; (7) efectos inmunomoduladores (Nicoll, 1974; Nicoll, 1980). Sin embargo, de estas acciones no todas se encuentran representadas o tienen la misma importancia para todos los tipos de vertebrados. Así, por ejemplo, los efectos osmorreguladores representan el papel predominante de la hormona entre los peces. En los anfibios, las funciones relacionadas con el crecimiento y el metabolismo son las que adquieren mayor relevancia, mientras que en mamíferos y aves predominan las acciones relacionadas con la reproducción (Nicoll, 1974; Nicoll, 1980).

En los mamíferos, las acciones más estudiadas de esta hormona se han concentrado en la glándula mamaria, donde estimula tanto el crecimiento del epitelio alveolar (Elias, 1980), como su diferenciación y su actividad secretora (Topper y Freeman, 1980). De hecho, la actividad secretora de la glándula mamaria comprende una estimulación general de los mecanismos biosintéticos intracelulares. La PRL no sólo estimula la síntesis de proteínas presentes en la leche (caseína, α -lactoalbúmina, p-lactoglobulina, transferrina, etc.), sino también la de enzimas involucradas en la síntesis de componentes como la lactosa, los lípidos específicos de la leche, etc. (Shiu y Friesen, 1980). Asimismo, la PRL estimula la transcripción de los genes ribosomales,

promoviendo la acumulación del ARN ribosomal en las células mamarias (Shiu y Friesen, 1980; Topper y Frieman, 1980).

Durante la lactancia también se ponen de manifiesto las acciones osmorregulatorias de la PRL, ya que para la producción de leche la glándula mamaria transporta grandes volúmenes de fluido isotónico. La PRL ejerce funciones osmorreguladoras que permiten mantener las diferencias entre la composición iónica de la leche y la del plasma (la leche tiene, comparada con el plasma, concentraciones bajas de sodio y cloro y altas de potasio). Dichas funciones osmorreguladoras resultan de la modificación del transporte activo de iones a través de la membrana del epitelio (Shiu y Friesen, 1980).

Se ha demostrado, además, que la PRL incrementa la capacidad de la glándula mamaria para atraer y retener a las células plasmáticas secretoras de anticuerpos del tipo IgA, que se encuentran presentes en la leche. Esto, junto con la determinación de que existe proliferación de células del sistema inmune en la leche, ha permitido proponer que estas observaciones son consecuencia de los efectos inmunomoduladores de esta hormona (Shiu y Friesen, 1980).

La PRL ejerce, además, efectos conductuales que influyen sobre la lactancia. Su presencia, en conjunto con las hormonas ováricas, es indispensable para la inducción de la conducta materna en varias especies de vertebrados (Meites, 1988). Por otra parte, si bien su administración en ausencia de esteroides no modifica la conducta materna, en presencia de éstos la estimula en diversas especies (Nicoll, 1974).

Fuentes de Producción

La principal fuente de producción de PRL y sus variantes moleculares es la hipófisis anterior, aunque existen también diversas fuentes extrahipofisarias, a saber: los linfocitos, el estroma del endometrio decidual, el miometrio uterino, la glándula mamaria y el tejido nervioso (Nicoll, 1980).

a) **Adenohipófisis.** Las células adenohipofisiarias secretoras de PRL, o lactotropos, se encuentran distribuidas en forma homogénea en la adenohipófisis, aunque se ha propuesto que son más abundantes en los bordes externos de la glándula y en la región más cercana a la hipófisis intermedia (Papka y col, 1986). Estas células se distinguen por su forma poligonal, por poseer un retículo endoplásmico rugoso que presenta un patrón laminar (a menudo concéntrico), por su aparato de Golgi grande y por la forma irregular y el gran tamaño de sus gránulos secretorios, que va desde 130 a 900 nm (Baker y col, 1969; Baulieu y Kelly, 1990; Papka y col, 1986; Tougard y Tixier-Vidal, 1988). Se considera que los lactotropos constituyen un 40-50% de las células adenohipofisiarias (Tougard y Tixiel-Vidal, 1988), aunque su número y actividad secretora varía de acuerdo a las condiciones fisiológicas del organismo. Esto es debido a que se encuentran influenciadas tanto por estímulos endógenos (hormonas esteroidales, etc.) como por estímulos exógenos (estimulación del cérvix uterino, succión de las crías durante la lactancia, etc.).

Todas las variantes moleculares descritas para la PRL se encuentran representadas en la adenohipófisis (Sinha, 1995). Por otra parte, es sobre la célula adenohipofisiaria donde se han llevado a cabo la mayor parte de los estudios encaminados a analizar la regulación de la secreción de esta familia hormonal. A continuación se describe muy someramente algunos de los aspectos de la regulación de la secreción de la PRL por las células adenohipofisiarias.

Se ha observado que tanto el número de lactotropos como la concentración adenohipofisiaria de PRL son mayores en la hembra que en el macho, lo que se traduce en niveles mayores de PRL circulante en la hembra desde el inicio de la función ovárica (Tougard y Tixier-Vidal, 1988). Además, en la hembra los niveles de PRL siguen un patrón determinado. En la rata este patrón se caracteriza por un aumento marcado de la prolactina circulante en la tarde y la noche del proestro, que se correlaciona con un aumento previo en los niveles circulantes de estrógenos (Neill, 1974).

Entre los estímulos exógenos que afectan la secreción adenohipofisiaria de PRL quizá el más importante es la estimulación producida por la succión del pezón durante la lactancia. La succión por parte de las crías provoca la activación de reflejos neuroendócrinos que traen consigo la secreción adenohipofisiaria de PRL, así como de las demás hormonas involucradas en la secreción láctea (hormonas adenocorticotrófica o ACTH, estimulante de la tiroides o TSH, del crecimiento o GH) y de la OT de origen neurohipofisiario. Esta última provoca la contracción de las células mioepiteliales que recubren los alveolos y conductos mamarios, produciendo elevación de la presión intraglandular y la evacuación de leche (Elias, 1980; Clapp et al, 1987).

La estimulación de la transcripción y secreción de PRL en la adenohipófisis se encuentra sujeta también a regulación de tipo hipotalámico y sistémico. Por ejemplo, la hormona tirotrópica parece estimular tanto la síntesis como la secreción de la PRL por el lactotrofo (Neill y Nagy, 1994). Otros factores hipotalámicos involucrados en la estimulación de la secreción de la PRL son el péptido intestinal vasoactivo (vasoactive intestinal peptide, VIP), la serotonina y algunos péptidos opioides (Neill y Nagy, 1994). Entre los factores sistémicos estimuladores de su síntesis y liberación se encuentran los estrógenos, la norepinefrina y la insulina (Neill y Nagy, 1994).

Sin embargo, la secreción de PRL se encuentra sujeta principalmente a regulación inhibitoria por parte de factores hipotalámicos, entre los que destaca la dopamina (DA). Esta bioamina es capaz de inhibir tanto la síntesis como la liberación de PRL por los lactotrofos adenohipofisarios (Ben-Jonathan, 1985; Lamberts y Macleod, 1990; Martínez de la Escalera y Weiner, 1992). Además de DA, otros factores hipotalámicos, tales como el ácido γ -amino-butírico (GABA), la somatostatina, la hormona estimulante de los melanocitos y el péptido asociado a la hormona liberadora de gonadotropinas han sido implicados también en la inhibición de la secreción de la PRL (Neill y Nagy, 1994).

b) Producción Extrahipofisiaria. En el estroma del endometrio decidual y en el miometrio uterino se han detectado moléculas con bioactividad tipo PRL que

comparten con ella características inmunoquímicas (Gellersen y col, 1991; Golander y col, 1978), además de que expresan el ARN mensajero de la PRL (Takahashi, 1984). Sin embargo, la PRL de origen decidual se encuentra codificada por un gen con una región promotora ligeramente diferente a la del gen de la PRL adenohipofisiaria (Takahashi y col, 1984). Este hecho determinaría una regulación diferente de su expresión. Se ha propuesto que la PRL sintetizada por estos tejidos podría estar involucrada en el mantenimiento del cuerpo lúteo y la tonicidad del fluido amniótico, así como en el proceso de implantación y desarrollo del feto (Soares y cols, 1991).

En el sistema inmune se expresa el gen de la PRL en diversos tipos celulares, a saber en los esplenocitos (Montgomery y col, 1987), linfocitos y monocitos (Gagnerault, 1993; Montgomery y col, 1987; Montgomery y col, 1990; Montgomery y col, 1992). En estas células se han caracterizado diversas variantes de la PRL, que difieren principalmente en su peso molecular (Baglia y col, 1991; Di Matia, 1988; Montgomery y col, 1990; Montgomery y col, 1992). Se ha propuesto que los efectos inmunomoduladores de la PRL sobre este tipo de células podrían deberse, al menos en parte, a su acción autócrina y parácrina (Gala, 1991).

En la glándula mamaria también se ha detectado, mediante hibridización *in situ* y Northern blot, el transcrito para la PRL. Este ha sido encontrado específicamente en las células del epitelio acinar mamario durante el embarazo y la lactancia (LeProvost y col, 1994; Steinmetz y col, 1993). El transcrito hallado tiene una secuencia idéntica a la del que codifica para PRL en la adenohipófisis, además de que parece involucrar el mismo promotor (LeProvost y col, 1994, Steinmetz y col, 1993).

Otro tipo de tejido donde se ha reportado consistentemente la presencia de PRL es el nervioso. Estudios de inmunocitoquímica han localizado los antígenos tipo PRL principalmente en las neuronas y tractos nerviosos del hipotálamo (Fuxe y col, 1976; Harlan y col, 1991; Nishizuka y col, 1990; Paut-Pagano y col, 1993; Shivers y col, 1989; Siaud y col, 1989; Tobeau y col, 1979; Thompson, 1982). Sin embargo, también se ha

descrito material con inmunorreactividad tipo PRL en homogenados de médula espinal, tallo cerebral y en el líquido cefalorraquídeo de la rata (DeVito, 1988a y 1988b; De Vito, 1989b; Emanuele y col, 1986; Emanuele y col, 1987; Emanuele y col, 1989). Además, se ha demostrado que el material inmunorreactivo, obtenido del fraccionamiento cromatográfico de distintas áreas cerebrales, posee efectos mitogénicos en bioensayos específicos para esta hormona (Emanuele y col, 1986; Emanuele y col, 1987; Emanuele y col, 1989). Estos hallazgos han sido corroborados por la determinación de la existencia del ARN mensajero para esta hormona en el hipotálamo y por el análisis de mapas de digestión trípica de las moléculas tipo PRL involucradas.

Como funciones específicas de la PRL de origen cerebral se ha sugerido que ésta podría ser responsable tanto de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) (Azad y col, 1990) como la proliferación de células gliales (astrocitos) en cultivo (De Vito y col, 1993a y 1993b).

Recientemente, evidencias experimentales descritas en secciones presentadas a continuación, han permitido incluir, dentro del sistema nervioso central, al sistema hipotálamo-neurohipofisario como fuente de producción y secreción de PRLs.

Sistema Hipotálamo-neurohipofisario

Anatomía General

El hipotálamo está formado por dos tipos de neuronas: el primer tipo incluye a aquellas con las características propias de células nerviosas, que se encuentran involucradas en la recepción, integración, conducción y transmisión sináptica de mensajes. Adicionalmente a dichas características neuronales clásicas, las neuronas que componen el segundo grupo tienen propiedades de células endócrinas, sintetizan mensajeros químicos de naturaleza peptídica, los cuáles son transportados a lo largo de

sus axones que culminan en redes de capilares y de esta manera son vertidos a la circulación sistémica (Baulieu y Kelly, 1990).

Las células del sistema hipotálamo-neurohipofisiario (SHN) pertenecen al segundo grupo mencionado y son de tipo magnocelular, ya que tienen un diámetro de 20-30 μm , mayor al común de las neuronas. Estas conforman una parte importante de los dos pares de núcleos anteriores hipotalámicos: los núcleos paraventriculares (PV), situados a cada lado del tercer ventrículo, y los supraópticos (SO), situados por encima del tracto óptico (Figura 9) (Reichlin, 1992). Sin embargo, también forman parte de este sistema los núcleos accesorios magnocelulares, que en conjunto pueden contribuir hasta con el 50% de las neuronas que proyectan hacia la neurohipófisis (Cunningham y Sawchenko, 1991; Silverman y Zimmermann, 1983). La mayoría de los axones de estas neuronas llegan al infundíbulo y penetran en la neurohipófisis. En ésta, los axones divergen en todas direcciones, terminando cerca de redes de capilares fenestrados. Los otros constituyentes de la neurohipófisis son las células gliales, denominados pituicitos (Reichlin, 1992). Hasta el momento no se ha determinado si los pituicitos tienen alguna función con respecto a la actividad neuroendócrina de este sistema. Las arterias que alimentan a la hipófisis posterior son ramas de las arterias inferiores hipofisiarias, que a su vez son subsidiarias de la carótida interna (Baulieu y Kelly, 1990).

Los productos de secreción de las neuronas magnocelulares hipotalámicas son sintetizados en el retículo endoplásmico y transportados al aparato de Golgi, donde son concentrados en gránulos secretorios, los cuales son transportados a la terminal del axón (lo que es conocido como transporte axoplásmico) (Bean y col, 1994). En las terminales neurohipofisiarias se observan frecuentemente engrosamientos (conocidos como cuerpos de Herring), que miden de 10 a 20 μm y acumulan gránulos secretorios, sirviendo como sitios de almacenamiento (Baulieu y Kelly, 1990). En la terminal, la liberación del contenido de los gránulos ocurre por exocitosis en respuesta a la propagación del potencial de acción. De esta manera los neuropéptidos hipotalámicos

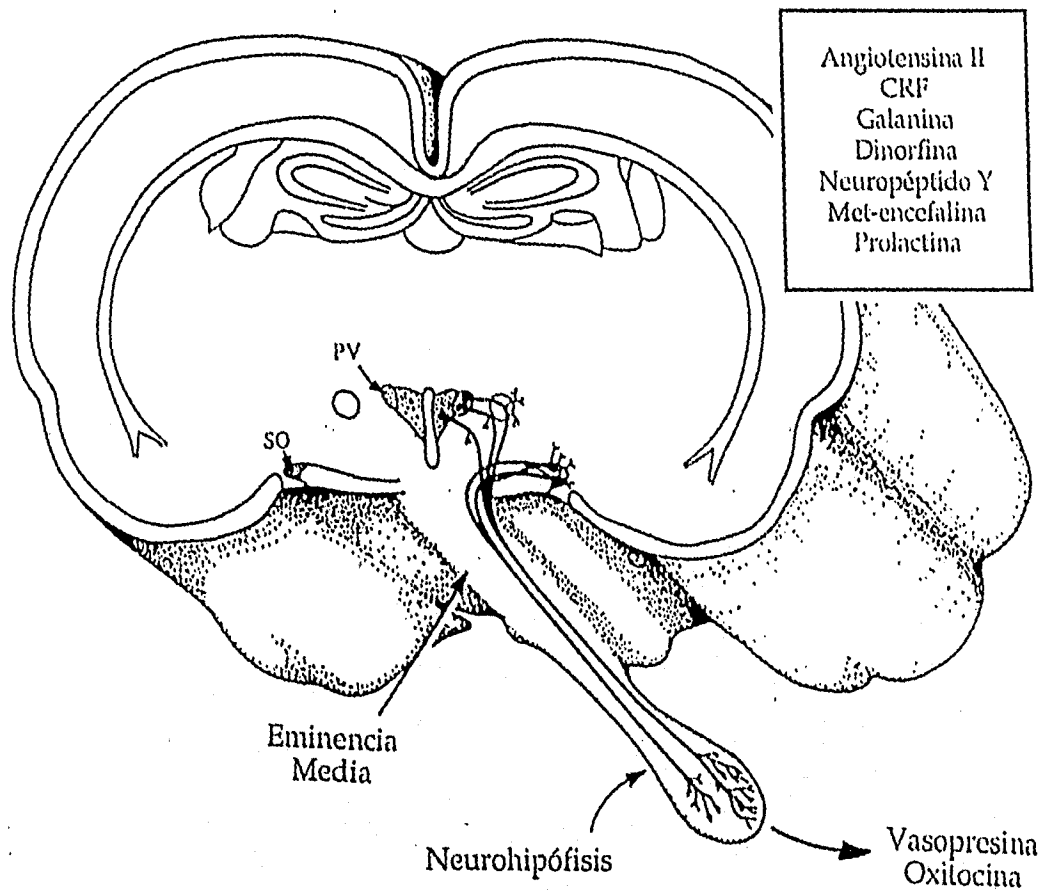


FIGURA A2. Representación del sistema hipotálamo-neurohipofisiario de la rata. Se muestra un dibujo de un corte coronal del cerebro de rata en la región del hipotálamo. Se ilustran los núcleos paraventriculares (PV) y los supraópticos (SO), así como la eminencia media y la neurohipófisis. En la parte superior derecha de la figura se muestran algunos ejemplos de las hormonas de tipo peptídico descritas en este sistema pero cuya función en éste no ha sido descrita.

son secretados a la circulación general (Bauleu y Kelly, 1990; Reichlin, 1992).

Principales Péptidos: Vasopresina y Oxitocina

Las principales sustancias biológicamente activas que son liberadas por el lóbulo neural hipofisiario son clasificadas como de propiedades antidiuréticas (conservadoras de agua) u oxitócicas (contractoras del útero). Estas sustancias, conocidas como vasopresina (VP) y oxitocina (OT), además de ser producidas por células nerviosas del SHN, son sintetizadas también por otros tipos neuronales en otras regiones del sistema nervioso central. Las principales acciones fisiológicas de la VP son la control de la excreción de agua por el riñón, por lo que juega un papel importante en la regulación de la presión osmótica de los fluidos extracelulares y en la regulación de la presión arterial. Por otra parte, las acciones fisiológicas mejor conocidas de la OT son la contracción de las células mioepiteliales de la glándula mamaria (que ayudará a la evacuación de la leche) y la contracción de las células del músculo liso del miometrio uterino durante el parto.

Estos dos mensajeros son sintetizados como prohormonas en el cuerpo neuronal y son sujetos a procesamiento proteolítico durante el transporte axonal. En ambos casos el resultado son dos moléculas proteicas: la hormona (que para ambos casos corresponden a nonapéptidos con un puente disulfuro en la posición 1-6) y un péptido acompañante de aproximadamente 10 kDa conocido como neurofisina de tipo I (en el caso de la OT) o de tipo II (en el caso de VP) (Reichlin, 1992). Existe una gran homología entre los dos nonapéptidos resultantes, pues las dos hormonas difieren sólo por los aminoácidos de sus posiciones 3 y 8. Esto se ha sugerido como una de las razones de que, a altas concentraciones, la OT es capaz de producir los efectos característicos de la VP y viceversa (Jard, 1990).

Hasta el momento se han identificado dos tipos de VP en los mamíferos. El tipo más abundante es la arginina vasopresina (que tiene una arginina en la posición 8),

mientras que en el cerdo y otras especies de esa familia la hormona natural es la lisina vasopresina (con una lisina en la posición 8). En cambio, sólo se conoce un tipo de OT para todas las especies en que se ha descrito su existencia (Jard, 1990).

Tanto VP como OT son producidas por neuronas localizadas en los núcleos magnocelulares hipotalámicos que, como ya se dijo, están constituidos por los núcleos PV y SO. Sin embargo, también son producidas por neuronas de los núcleos accesorios magnocelulares hipotalámicos, que en la rata incluyen el núcleo paraventricular rostral, los núcleos fornicales anterior y posterior, el núcleo circular y las células que aparecen en forma irregular entre los núcleos paraventricular y supraóptico (donde generalmente se asocian a véculas) (Cunningham y Sawchenko, 1991; Silverman y Zimmerman, 1983). También se han identificado neuronas de tipo parvicelular (de menos de 20 μm) que sintetizan VP y que se localizan principalmente en el núcleo supraquiasmático, el núcleo PV parvicelular, y otros sitios extrahipotalámicos, como son la amígdala, el septo ventrolateral y la base de la estría terminal (Jard, 1990; Renaud y Bourque, 1991).

Como se ha mencionado, la gran mayoría de los axones de las neuronas de tipo magnocelular del SHN terminan en la neurohipófisis, donde liberan sus productos a la circulación. Sin embargo, existen además fibras vasopresinérgicas provenientes de neuronas parvicelulares que terminan en el sistema portal hipofisiario en la eminencia media (Jard, 1990). Asimismo, se han descrito fibras tanto vaso como oxitocinérgicas, que proyectan hacia numerosas zonas del cerebro y médula espinal (Revisado por Silverman y Zimmerman, 1983).

Se considera generalmente que la VP y la OT son producidas por diferentes poblaciones neuronales, ya que la colocación de ambos péptidos en una misma célula sólo se ha observado en aproximadamente 2-3% de las neuronas magnocelulares (Mezey y Kiss, 1991). No obstante, se han reportado casos especiales, como los primeros días de la lactancia, donde el número de células que sintetizan ambos péptidos aumenta considerablemente (hasta un 17 % del total de neuronas magnocelulares [Mezey y Kiss,

1991]). La distribución de las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas difiere de las oxitocinérgicas a través de los núcleos PV y SO (Rhodes y col, 1981). En el núcleo SO la distribución de las neuronas vasopresinérgicas es más ventral a la de las oxitocinérgicas (Rhodes y col, 1981). Asimismo, en el núcleo PV las neuronas vasopresinérgicas se circunscriben principalmente a la región látero dorsal del núcleo y ocupan un área menor que las células oxitocinérgicas, que se encuentran principalmente en la región medial y hacia la periferia del núcleo (Rhodes y col, 1981; Cunningham y Sawchenko, 1991).

Tanto VP como OT producen sus efectos a través de receptores localizados en la superficie de sus tejidos blanco. En el caso de VP, han sido descritos dos tipos de receptores funcionales: el V₂, que se ha identificado sólo en los túbulos renales y que se acopla al sistema de la adenilato ciclasa, y; el V₁, que fue descrito en hígado y el músculo liso de vasos sanguíneos, y que parece acoplarse al sistema de fosfoinosítidos/Ca²⁺ (Jard, 90). Los receptores para OT han sido caracterizados en el músculo uterino y la glándula mamaria, encontrándose que, funcionalmente, son homólogos al tipo V₁ de los receptores de VP (Jard, 1990). Como ya se mencionó, los receptores para uno de estos mensajeros son capaces de reconocer, con baja afinidad, al otro mensajero. Es por ello que, a altas dosis, tanto VP como OT son capaces de inducir todos los efectos de la otra hormona (Jard, 1990).

Adicionalmente a las funciones descritas, se ha propuesto que ambos péptidos pudiesen funcionar como mensajeros a nivel local (parácrinos y/o autócrinos) en el sistema nervioso central, y en particular, en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario (Sawchenko y col, 1992). Por ejemplo, se ha descrito la presencia de los receptores para ambas hormonas en distintas regiones del cerebro, incluidos los núcleos magnocelulares hipotalámicos (Renaud y Bourque, 1991). También se ha observado la presencia de ambos nonapéptidos en medio de perfusión del área de los núcleos PV y los SO, lo que implica su liberación local (Renaud y Bourque, 1991).

Colocalización con otros Péptidos. Actualmente es claro que las neuronas magnocelulares hipotalámicas contienen péptidos bioactivos que coexisten con VP y/o OT. Los péptidos colocalizados en las células magnocelulares se encuentran en concentraciones de 2-3 órdenes de magnitud menores a aquellas de VP y OT, por lo que se presupone que su posible secreción a la circulación sistémica sea de poca relevancia funcional (Sawchenko y col, 1992). Es por ello que se ha propuesto que el significado funcional de estos péptidos radique en la regulación local, en particular de la secreción de VP, OT, o de ambas (Cunningham y Sawchenko, 1991; Sawchenko y col, 1992).

Entre los primeros estudios realizados que determinaron la colocalización de algún péptido en este sistema se encuentran los de Martin y Voigt (1981). Ellos demostraron, mediante técnicas de inmunocitoquímica a nivel de microscopía de luz, la colocalización de OT con met-enkefalina, mientras que VP se encuentra colocalizada, aunque no siempre, con leu-enkefalina en las terminales nerviosas neurohipofisarias. La colocalización de estos péptidos opioides también ha sido analizada a nivel de gránulos secretorios (Renaud y Bourque, 1991). En apoyo a que la función de estos opioides sea el inhibir la secreción de OT a nivel de las terminales nerviosas, se mostró que met-enkefalina reduce la secreción de OT al medio de incubación de explantes neurohipofisarios (Leng y col, 1994). Otro péptido opioide presente en las neuronas vasopresinérgicas es la dinorfina, que se encuentra en todas las neuronas magnocelulares que contienen esa hormona (Watson y col, 1982). Se cree que ésta, al igual que la met-enkefalina, tiene como posible función el inhibir la liberación de OT a nivel de las terminales nerviosas en la neurohipófisis (Leng y col, 1994)

Además de estos péptidos, se han identificado en uno u otro tipo de las neuronas del SHN otros péptidos, a saber: el neuropéptido Y, la galanina, la hormona liberadora de corticotropinas, el glucagon, la colecistoquinina y la angiotensina II (Renaud y Bourque, 1991; Scheithauer y col, 1992). A continuación se presentan, en forma breve, algunas de las observaciones que se han realizado al respecto de posibles acciones de los

péptidos identificados en neuronas magnocelulares del sistema hipotálamo neurohipofisiario. Cabe aclarar que no se pretende abarcar todos los estudios acerca de el efecto de una determinada hormona en este tipo de células, sino sólo mencionar las observaciones que parecen dar una idea más clara acerca de su posible función fisiológica.

El neuropéptido Y (NPY) consta de 36 aminoácidos y está relacionado con la familia de polipéptidos pancreáticos. Este se encuentra presente en terminales axónicas que hacen sinapsis en somas magnocelulares tanto del núcleo PV como del SO, siendo algunas de estas terminales también inmunorreactivas para VP (Sawchenko y Pfeiffer, 1988), aunque también ha sido observado en la eminencia media y la neurohipófisis (Larsen y col, 1994). La evidencia de su posible función en el sistema nervioso central está dada por la observación de que su inyección directamente en el NSO produce un aumento en los niveles plasmáticos de VP y el hecho de que, a nivel celular, su aplicación sobre neuronas del núcleo SO posee una influencia excitatoria débil (Renaud y Bourque, 1991). En forma más reciente, también se ha reportado que es capaz de potenciar, *in vitro*, la liberación de VP a nivel de la neurohipófisis (Larsen y col, 1994).

La galanina se colocaliza con VP en las neuronas de ambos núcleos, en el PV como en el SO. Adicionalmente, se ha detectado también en los somas de neuronas oxitocinérgicas y en los procesos axonales neurosecretorios en la neurohipófisis (Gaymann y Martin, 1989). Por otra parte, la galanina se encuentra ampliamente distribuída en el cerebro (Gaymann y Martin, 1989). Sin embargo, hasta el momento no se sabe si posee alguna función central.

La colecistoquinina, que es un péptido gastrointestinal de los mamíferos, es sintetizada también en el cerebro, donde se ha propuesto que se relaciona con la sensación de saciedad y los mecanismos de ingestión de alimentos (Baile y col, 1986). El que este péptido pueda tener un papel en la regulación central de VP y OT es indicado, principalmente, por su presencia en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, su

colocalización con fibras y células oxitocinérgicas y el que sus niveles en el lóbulo neural disminuyen marcadamente durante la lactancia y los estados hiperosmolares (Renaud y Bourque, 1990). Además, se ha reportado: (a) que la inyección de colecistoquinina en el ventrículo lateral eleva los niveles plasmáticos de VP (Marley y col, 1984); (b) que cuando se aplica de forma exógena durante registro extracelular in vivo ésta excita a la mayoría de las neuronas del núcleo supraóptico (Jarvis y col, 1988); (c) infusiones de colecistoquinina en el medio de perfusión de explantes del hipotálamo de la rata puede producir liberación tanto de VP como de OT en el área de la neurohipófisis (Jarvis y col, 1989), y; (d) concentraciones bajas (10^{-8} - 10^{-10} M) de colecistoquinina son capaces de liberar OT y VP de neurohipofisis aisladas (Bondy y col, 1989).

La angiotensina circulante tiene funciones involucradas con la regulación del sistema cardiovascular y la regulación del balance de fluidos corporales (van Wimersma Greidanus y Hellebrekers, 1991). Parte de estas acciones se llevan a cabo mediante su influencia, tanto directa como indirecta, en la liberación de VP. La posibilidad de que tenga efectos locales en la neurohipofisis se ha originado por la determinación de que esta molécula se encuentra presente en neuronas magnocelulares del núcleo PV y en sus terminales neurohipofisiarias (Renaud y Bourque, 1991).

BIBLIOGRAFIA

- Aston, R., Young, K., van den Berg, H. y Ivanyi, J. (1984) Identification of M_r variants of prolactin with monoclonal antibodies. *FEBS Letters* 171, 192.
- Azad, N., Duffner, L., Paloyan, E.B., Reda, D., Kirsteins, L., Emanuele, N.V. y Lawrence, A.M. (1990) Hypothalamic prolactin stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from male rat hypothalamus. *Endocrinology* 127; 1928.
- Baglia, L.A., Cruz, D. y Shaw, J.E. (1991) An Epstein-Barr virus-negative burkitt lymphoma cell line (sfRamos) secretes a prolactin-like protein during continuous growth in serum free-medium. *Endocrinology* 128; 2266.
- Baile, C.A., McLaughlin, C.L. y Della-Fera, M.A. (1986) Role of cholecystokinin and opioid peptides in control of food intake. *Physiol. Rev.* 66; 172.
- Baker, B.L., Rees Midgley, A., Jr., Gersten, B.E. y Yu, Y.-Y. (1969) Differentiation of growth hormone- and prolactin-containing acidophils with peroxidase-labeled antibody. *Anat. Rec.* 164; 163.
- Baulieu, E.-E. y Kelly, P.A. Eds. (1990) *En Hormones. From molecules to disease*, Hermann Publishers in Arts and Science, París, Francia.
- Bean, A.J., Zhang, X. y Hokfelt, T. (1994) Peptide secretion: what do we know? *FASEB J.* 8; 630.
- Ben-Jonathan, N. (1985) Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Reviews* 6; 564.
- Bollengier, F., Velkeniers, B., Hooghe-Peters, E., Mahler, A. y Vanhaelst, L. (1989) Multiple forms of rat prolactin and growth hormone in pituitary cell subpopulations separated using a Percoll gradient system: disulfide-bridged dimers and glucosylated variants. *J. Endocr.* 120; 201.
- Bondy, C.A., Jensen, R.T., Brady, L.S. and Gainer, H. (1989) Cholecystokinin evokes secretion of oxytocin and vasopressin from rat neural lobe independent of external calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86; 5198.
- Brooks, C.L., Isaacs, L.A. y Wicks, J.R. (1994) Preparative purification of phosphorylated and nonphosphorylated bovine prolactin. *Mol. Cell Endocrinol.* 99; 301.
- Clapp, C. (1987) Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* 121; 2055.
- Clapp, C., Martínez de la Escalera, G., Aguayo, D. y Mena, F. (1987) Regulación Integrativa de la Lactancia. *Bol. Est. Med. Biol.* Vol. 35, pag 63-107. México.
- Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Nagano, M., Kelly, P., Mejía, S., Morales, M.A. y Martínez de la Escalera, G. (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophysial system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91; 10384.

-
- Cole, E.S., Nichols, E.H., Lauziere, K., Edmunds, T., McPherson, J.M. (1991) Characterization of the microheterogeneity of recombinant primate prolactin: implication for posttranslational modifications of the hormone *in vivo*. *Endocrinology* 129; 2639.
- Cunningham, E.T., Jr. y Sawchenko, P.E. (1991) Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *TINS* 14; 406.
- DeVito, W.J. (1988a) Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocr.* 47; 284.
- DeVito, W.J. (1988b) Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 150; 599.
- DeVito, W.J. (1989a) Comparison of brain and pituitary immunoreactive prolactin by peptide mapping and lectin affinity chromatography. *J. Endocr.* 125; 2439.
- DeVito, W.J. (1989b) Immunoreactive prolactin in the hypothalamus and cerebrospinal fluid of male and female rats. *Neuroendocrinology* 50; 182.
- DeVito, W.J., Connors, J.M. y Hedge, G.A. (1987) Immunoreactive prolactin in the rat hypothalamus: in vitro release and subcellular localization. *Neuroendocrinology* 46; 155.
- DeVito, W.J., Avakian, C., Stone, S. y Okulics, W.C. (1993) Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes is mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J. Neurochem.* 60; 835.
- DeVito, W.J., Okulics, W.C., Stone, S. y Avakian, C. (1993) Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130; 2549.
- Di Matia, G.E., Gellersen, Bohnet, H.G. y Friesen, H.G. (1988) A human B-lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* 122; 2508.
- Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Martinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. y Lawrence, A.M. (1986) Hypothalamic prolactin: characterization by radioimmunoassay and bioassay and response to hypophysectomy and restraint stress. *Neuroendocrinol.* 44; 217.
- Emanuele, N.V., Metcalfe, L., Wallock, L., Tentler, J., Hagen, T.C., Beer, C.T., Martinson, D., Gout, P.W., Kirsteins, L. y Lawrence, A.M. (1987) Extrahypothalamic brain prolactin: characterization and evidence for independence from pituitary prolactin *Brain Res.* 421; 255.
- Emanuele, N.V., Azad, N., Luckey, J.P., Engel, J., Melon, G., Metcalfe, L., Gout, P.W., Beer, C.T., Kirsteins, L. y Lawrence, A.M. (1989) Presence of prolactin-like immunoreactivity and bioactivity in rat spinal cord. *Neuroendocrinology* 49; 331.
- Elias, J.J. (1980) The role of prolactin in normal mammary gland growth and function. En "Hormonal Proteins and Peptides". Vol. VIII, pag. 37-74. Academic Press Inc., U.S.A.
- Fuxe, K., Hokfelt, T., Eneroth, P., Gustafsson, J.A. y Skett, P. (1976) Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminales of rat hypothalamus. *Science* 196; 899.
- Gagnerault, M.C., Touraine, P., Savino, W., Kelly, P.A. y Dardenne, M. (1993) Expression of prolactin receptors in murine lymphoid cells in normal and autoimmune situations. *J. Immunol.* 150; 5673.

-
- Gala, R.R. (1991) Prolactin and growth hormone in the regulation of the immune system. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 198; 513.
- Gaymann, W. y Martin, R. (1989) Immunoreactive galanin-like material in magnocellular hypothalamo-neurohypophysial neurones of the rat. *Cell Tissue Res.* 255; 139.
- Gellersen, N., Bonhoff, A., Hunt, N. y Bohnet, H.G. (1991) Decidual-type prolactin expression by the human myometrium. *Endocrinology* 129, 158.
- Golander, A., Hurley, T., Barret, J., Hize, A. y Handwerker, S. (1978) Prolactin synthesis by human chorion-decidual tissue: a possible source of amniotic fluid prolactin. *Science* 202, 311.
- Graf, L., Cseh, G., Nagy, I. y Kurcz, M. (1970) An evidence for deamidation of prolactin monomer. *Acta Biochim. Biophys. Acad. Sci. Hung.* 5; 299.
- Hansen, B.L., Hansen, G.N. y Hagen, C. (1982) Immunoreactive material resembling ovine prolactin in perikarya and nerve terminals of the rat hypothalamus. *Cell Tissue Res.* 226; 121
- Harlan, R.E., Shivers, B.D., Fox, S., Kaplove, K.A., Schachter, B.S. y Pfaff, D.W. (1989) Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology* 49; 7.
- Jard, S. (1990) Vasopressin and Oxytocin. Pp. 283-302. En *Hormones: from molecules to disease*. Eds. E.-E. Baulieu y P.A. Kelly. Hermann Publishers in Arts and Science, Paris, France.
- Lamberts, S.W.J. y Macleod, R.M. (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 6; 564.
- Larsen, P.J., Jukes, K.E., Chowdrey, H.S., Lightman, S.L. y Jessop, D.S. (1994) Neuropeptide-Y potentiates the secretion of vasopressin from the neurointermediate lobe of the rat pituitary gland. *Endocrinology* 134; 1635.
- Leng, G., Bicknell, J., Brown, D., Bowden, C., Chapman, C. y Russell, J.A. (1994) Stimulus induced depletion of pro-enkephalins, oxytocin and vasopressin and pro-enkephalin interaction with posterior pituitary hormone release *in vitro*. *Neuroendocrinology* 60; 559.
- LeProvost, F., Leroux, C., Martin, P., Gayue, P. y Djiane, J. (1994) Prolactin gene expression in ovine and caprine mammary gland. *Neuroendocrinology* 60; 305.
- Lewis, U.J., Singh, R.N.P., Sinha, Y.N. y Vanderlaan, W.P. (1985) Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 116; 359.
- López-Gómez, F.J., Torner, L., Mejía, S., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1995) Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin. *Endocrine* 3; 573.
- Martin, R. y Voigt, K.H. (1981) Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature* 289; 502.
- Martínez de la Escalera, G. y Weiner, R.I. (1992) Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrine Reviews* 13; 241.
- Meites, J. (1988) Biological Functions of Prolactin in Mammals. En *Prolactin gene family and its receptors*. Ed. K. Hoshino. págs. 123-130. Elsevier Science Publishers, N.Y.
-

-
- Mezey, E. y Kiss, J.Z. (1991) Coexpression of vasopressin and oxytocin in hypothalamic supraoptic neurons of lactating rats. *Endocrinology* 129; 1814.
- Mitra, I. (1980a) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95; 1750.
- Mitra, I. (1980b) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. *In vivo* mammary mitogenic activity of the N-terminal 16K moiety. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 95; 1760.
- Montgomery, D.W., Zukoski, C.F., Shah, G.N., Buckley, A.R., Pacholczyk, T. y Russell, D.H. (1987) Concanavalin A-stimulated murine splenocytes produce a factor with prolactin-like bioactivity and immunoreactivity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 145; 692.
- Montgomery, D.W., Lefevre, J.A., Ulrich, E.D., Adamson, C.R. y Zukoski, C.F. (1990) Identification of prolactin-like proteins synthesized by normal murine lymphocytes. *Endocrinology* 127; 2601.
- Montgomery, D.W., Shen, G.K., Ulrich, E.D., Steiner, L.L., Parrish, P.R. y Sukoski, C.F. (1992) Human thymocytes express a prolactin-like mRNA and synthesize bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* 131; 3019.
- Neill, J.D. (1974) Prolactin: Its Secretion and Control. En "Handbook of Physiology". Sección 7, vol. 4. pag. 469-488. E. Knobil y W.H. Sawyer (Eds.) Am. Physiol. Society. Washington, D.C.
- Neill, J.D. y Nagy, G.M. (1994) Prolactin secretion and its control. En *The Physiology of Reproduction*. Eds Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, New York.
- Nicoll, C.S. (1974) Physiological actions of prolactin. En Handbook of Physiology, sección 7, vol. 4, parte 2. Knobil, E. y Sawyer, W.H. (Editores). American Physiological Society, Bethesda, MA.
- Nicoll, C.S. (1980) Ontogeny and evolution of prolactin functions. *Fed. Proc.* 39; 2563.
- Nishizuka, M., Shivers, B.D., Leranath, C. y Pfaff (1990) Ultrastructural characterization of prolactin-like immunoreactivity in rat medial basal hypothalamus. *Neuroendocrinology* 51; 249.
- Nyberg, F., Roos, P. y Wide, L. (1980) Human pituitary prolactin: Isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Biochim. Biophys. Acta* 625; 255.
- Papka, R.E., Yu, S.M. y Nikitovitch-Winer, M.B. (1986) Use of immunoperoxidase and immunogold methods in studying prolactin secretion and application of immunogold labelling for pituitary hormones and neuropeptides. *Am. J. Anat.* 175, 289.
- Parlow, A.F. and Shome, B. (1976) Rat prolactin: The entire linear aminoacid sequence. *Fed. Proc.* 35; 219.
- Paut-Pagano, L., Roky, R., Valatx, J.-L., Kitahama, K. y Jouvett, M. (1993) Anatomical distribution of prolactin-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroendocrinology* 58; 682.
- Reichlin, S. (1992). En "Williams Textbook of Endocrinology". 8th. Edition. Capítulo 5: Neuroendocrinology, pags. 135-205. Wilson, J.D. y Foster, D.W., Eds. W.B. Saunders Co., Philadelphia, U.S.A.
- Renaud, L.P. y Bourque, C.W. (1991) Neurophysiology and neuropharmacology of hypothalamic magnocellular neurons secreting vasopressin and oxytocin. *Progress in Neurobiology* 36; 131.

-
- Rhodes, C.H., Morrell, J.I. y Pfaff, D.W. (1981) Immunohistochemical analysis of magnocellular elements in rat hypothalamus: distribution and numbers of cells containing neurophysin, oxytocin, and vasopressin. *J. Comp. Neurol.* 198; 45.
- Sawchenko, P.E. y Pfeiffer, S.W. (1988) Ultrastructural localization of neuropeptide-Y and galanin immunoreactivity in the paraventricular nucleus of the hypothalamus of the rat. *Brain Res.* 474; 231.
- Sawchenko, P.E., Imaki, T. y Vale, W. (1992) Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Foundation Symposium* 168; p 16-42.
- Scheithauer, B.W., Horvath, E. y Kovacs, A. (1992) Ultrastructure of the neurohypophysis. *Microscopy Research and Technique* 20; 177.
- Shiu, R.P.C. y Friesen, H.G. (1980) Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Ann. Rev. Physiol.* 42; 83.
- Shivers, B.D., Harlan, R.E., y Pfaff, D. (1989) A subset of neurons containing immunoreactive prolactin is a target for estrogen regulation of gene expression in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* 49; 23.
- Siaud, P., Manzoni, O., Balmefrezol, M., Barbanel, G., Assenmachjer, I. y Alonso, G. (1989) The organization of prolactin-like-immunoreactive neurons in the rat central nervous system. *Cell Tissue Res.* 255; 107.
- Silverman, A.-J. y Zimmerman, E.A. (1983) Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.* 6; 357.
- Sinha, Y.N. (1992) Prolactin Variants. *Trends Endocrinol. Metab.* 3; 100.
- Sinha, Y.N. (1995) Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews* 16; 354.
- Sinha, Y.N. y Gilligan, T.A. (1984) A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidences of mammary tumors. *Endocrinology* 114; 2046.
- Sinha, Y.N. y Jacobsen, B.P. (1987) Glycosylated prolactin in the murine pituitary: detection by a novel assay and alteration of concentrations by physiological and pharmacological stimuli. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 148; 505.
- Soares, M.J., Faria, T.N., Roby, K.F. y Deb, S., (1991) Pregnancy and the prolactin family of hormones: coordination of anterior pituitary uterine and placental expression. *Endocrine Reviews* 12; 402.
- Steinmetz, R.W., Grant, A.L. y Malven, P.V. (1993) Transcription of prolactin gene in milk secretory cells of the rat mammary gland. *J. Endocrinol.* 136; 271.
- Takahashi, H., Nabesima, Y., Nabesima, Y.I., Ogata, K. y Takeuchi, S. (1984) Molecular cloning and nucleotide sequence of DNA complementary to human decidual prolactin mRNA. *J. Biochem.* 95, 1491.
- Thompson, S.A., (1982) Localization of immunoreactive prolactin in ependyme and circumventricular organs of rat brain. *Cell Tissue Res.* 225; 79.
- Topper, Y.J. y Freeman, C.S. (1980) Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiol. Rev.* 60; 1049.
-

-
- Torner, L.M., Mejía, S., López-Gómez, F.J., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1995) A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* **136**; 5454.
- Toubeau, G., Desclin, J., Parmentier, M. y Pasteels, J.L. (1979) Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J. Endocr.* **83**; 261.
- Tougard, C. y Tixier-Vidal, A. (1988) Lactotropes and gonadotropes. En "The Physiology of Reproduction". Vol. 2 pag. 1305-1335, E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). Raven Press, New York, U.S.A.
- van Wimersma Greidanus, T.B. y Hellebrekers, L.J. (1991) en *Brain Endocrinology*, segunda edición. Editado por Marcella Motta, Raven Press, Ltd. N.Y., USA.
- Wang, Y.-F. y Walker, A.M. (1993) Dephosphorylation of standard prolactin produces a more biologically active molecule: evidence for antagonism between nonphosphorylated and phosphorylated prolactin in the stimulation of Nb2 cell proliferation. *Endocrinology* **133**, 2156.
- Watson, S.J., Akil, H., Fischli, W., Goldstein, A., Zimmerman, E.A., Nilaver, G. y Greidanus, V. (1982) Dynorphin and vasopressin: common localization in magnocellular neurons. *Science* **216**; 85.
- Wong, V.L.Y., Compton, M.M. y Witorsch, R.J. (1986) Proteolytic modification of rat prolactin by succellar fractions of the rat lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **881**; 167.
- Xiong, F., Chin, R.A. y Hew, C.L. (1992) A gene encoding chinook salmon prolactin: gene structure and potential cis-acting elements. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* **1**; 155.
- Yasuda, A., Itoh, H. y Kawauchi, H. (1986) Primary structure of chum salmon prolactins: occurrence of highly conserved regions. *Arch. Biochem. Biophys.* **244**; 528
- Yasuda, A., Yamaguchi, K., Kobayashi, T., Yamamoto, K., Kikuyama, S. y Kawauchi, H. (1991) The complete aminoacid sequence of prolactin from bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**; 218.
- Zhang, Xu, Aman, K. and Hoekfelt, T. (1996) *J. Comp. Neurol.* Aceptado para publicación.