

03086
A

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

UACPyP DEL CCH

CENTRO DE NEUROBIOLOGÍA

**ESTUDIO SOBRE EL SIGNIFICADO FUNCIONAL DE LAS
PROLACTINAS NEUROHIPOFISIARIAS**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS
P R E S E N T A E L
M. EN C. SALVADOR MEJIA GUERRERO

JURIQUILLA, QRO

2001

03086



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Esta tesis de doctorado se realizó bajo la dirección de la Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-Labora en el Centro de Neurobiología de Juriquilla, Qro.

El trabajo recibió constantemente el apoyo invaluable de los comentarios, críticas y sugerencias del Dr. Miguel Angel Morales Mendoza, así como del equipo material de su laboratorio en el Instituto de Investigaciones Biomédicas.

El jurado asignado para la evaluación de la tesis estuvo conformado de la siguiente manera:

Presidente: Dr. Carlos Arámburo de la Hoz

Secretario: Dra. María del Carmen Clapp Jiménez-Labora

Vocales: Dr. Mauricio Díaz Muñoz

Dra. Mercedes Perusquía Nava

Dra. Gabriela González Mariscal

Dr. Miguel A. Morales Mendoza

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Dra. Carmen Clapp todo el apoyo que brindó para la culminación del presente trabajo. Este apoyo no sólo consistió de los recursos materiales de su laboratorio, sino también de su guía y preocupación constante por lograr siempre la mejor calidad en el trabajo. Gracias Carmen.

Un agradecimiento muy especial al Dr. Miguel Angel Morales M., que siempre estuvo dispuesto a brindarnos su apoyo incondicional y a ayudarnos con sus comentarios y sugerencias a obtener los mejores resultados posibles.

Agradezco profundamente a los miembros del jurado, que con sus críticas y sugerencias ayudaron a mejorar no sólo la presentación, sino a aumentar y profundizar la comprensión y las reflexiones provocadas por los hallazgos logrados.

Agradezco también infinitamente el invaluable apoyo técnico de: Fernando López Barrera, por su ayuda en el manejo estadístico de los datos y su asesoría en el procesamiento de imágenes; de Gabriel Nava Pinto, por su asesoría en la realización de los experimentos de retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa; de Pilar Galarza, por su apoyo siempre presente en las (interminables) búsquedas bibliográficas y adquisición de datos, y; Pedro Medina (del I.I.B.), por su apoyo y asesoría en el manejo y procesamiento de materiales biológicos necesarios para los experimentos.

A todos aquellos que alguna vez me han apoyado y a quienes sería imposible nombrar. Sin ustedes esta tesis nunca se hubiera realizado.

INDICE

ARTICULOS PUBLICADOS	1
RESUMEN	2
SUMMARY	3
INTRODUCCIÓN	4
HIPÓTESIS	9
OBJETIVOS	9
MATERIALES Y MÉTODOS	10
RESULTADOS	14
Los estrógenos estimulan la expresión de prolactina en los núcleos paraventriculares y supraópticos.	14
Prolactina colocaliza con vasopresina en neuronas magnocelulares en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario.	16
El receptor de PRL se localiza tanto en neuronas magnocelulares vasopresinérgicas como oxitocinérgicas.	18
Prolactina y prolactina 16K estimulan la secreción de vasopresina al medio de incubación de explantes hipotálamo-neurohipofisarios.	21
DISCUSIÓN	25
CONCLUSIONES	40
APÉNDICES	41
Prolactina	41
Sistema hipotálamo-neurohipofisiario	45
Vasopresina y oxitocina	46
Prolactina y otros péptidos en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario	48
BIBLIOGRAFÍA	51

Los resultados expuestos en el presente trabajo han contribuido a la publicación de cinco artículos en revistas arbitradas de difusión internacional y se espera publicar uno más también en este tipo de revista. De estos cinco trabajos, uno fue publicado como primer autor (*Neuroendocrinology* 66; 151).

Los artículos publicados son los siguientes:

The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Nagano, M., Kelly, P.A., Mejía, S., Morales, M.A. y Martínez de la Escalera, G. (1994). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91; 10384.

Immunoreactive prolactins of the neurohypophyseal system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin. López-Gómez, F.J., Torner, L., Mejía, S., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1995) *Endocrine* 3; 573.

A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. Torner, L., Mejía, S., López-Gómez, F.J., Quintanar, A., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1995) *Endocrinology* 136; 5454

Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. Torner, L., Nava, G., Dueñas, Z., Corbacho, A., Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1999) *J. Endocr.* 161, 423.

Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. Mejía, S., Morales, M.A., Zetina, M.A., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1997) *Neuroendocrinology* 66; 151.

An autocrine prolactin-stimulated vasopressin secretion from rat hypothalamo-neurohypophyseal explants. Mejía, S., Torner, L., Morales, M.A., Martínez de la Escalera, G. Y Clapp, C. *Manuscrito en preparación.*

RESUMEN

El sistema hipotálamo-neurohipofisario comprende neuronas localizadas en los núcleos paraventricular (PV) y supraóptico (SO) del hipotálamo y sus terminales neurohipofisarias. Este sistema produce y secreta a la circulación las neurohormonas vasopresina (VP) y oxitocina (OT), pero también expresa un gran número de péptidos bioactivos, entre los que se encuentra la prolactina (PRL). Estudios previos han mostrado que el ARN mensajero de PRL se expresa en este sistema y se traduce hacia proteínas de masas moleculares de 23 y 14 kDa. Se ha propuesto que los péptidos activos localizados en neuronas vasopresinérgicas y oxitocinérgicas podrían funcionar como reguladores autócrinos o parácrinos de la secreción de las hormonas neurohipofisarias.

En esta tesis investigamos esta hipótesis para la PRL hipotálamo-neurohipofisaria a través de analizar: (a) si los estrógenos, reguladores de VP, OT y PRL (adenohipofisaria), afectan la expresión del ARN mensajero de PRL en los núcleos PV y SO; (b) si la PRL y su receptor se colocan con VP o con OT en las mismas neuronas, y; (c) si la PRL y un fragmento de 16 kDa de ésta, comparable a la PRL de 14 kDa neurohipofisaria, estimulan la secreción de VP por explantes hipotálamo-neurohipofisarios *in vitro*.

Los resultados obtenidos muestran que la expresión del ARN mensajero de PRL, evaluada por retrotranscripción y reacción en cadena de la polimerasa en núcleos PV y OT aislados es mayor en las hembras que en los machos y que en las hembras esta expresión se incrementa durante el estro. En apoyo a que este incremento puede deberse a los estrógenos, el tratamiento de animales ovariectomizados con estradiol aumentó la expresión del ARN mensajero de PRL en ambos núcleos. Ensayos de doble inmunocitoquímica demostraron la colocación de PRL y de VP en las mismas neuronas de los núcleos PV y SO y la localización del receptor de PRL tanto en las neuronas vasopresinérgicas como oxitocinérgicas de ambos núcleos. La PRL 23K y la PRL 16K estimularon significativamente la secreción de VP por explantes hipotálamo-neurohipofisarios y el efecto fue dependiente de la dosis.

Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que las PRLs pueden actuar como reguladores locales de la secreción de las neurohormonas del sistema hipotálamo-neurohipofisario, específicamente como factores autócrinos en la secreción de VP. Este efecto podría tener particular relevancia en condiciones fisiológicas asociadas a niveles altos de estrógenos circulantes.

INTRODUCCIÓN

Se conoce como sistema hipotálamo-neurohipofisiario al conjunto de neuronas magnocelulares localizadas en los núcleos supraópticos (SO) y paraventriculares (PV) del hipotálamo cuyas terminales axónicas conforman la neurohipófisis o hipófisis posterior. Este sistema se encuentra compuesto casi exclusivamente por dos poblaciones celulares: neuronas que secretan vasopresina (VP) y neuronas que secretan oxitocina (OT). Ambas hormonas son sintetizadas como prohormonas y posteriormente transportadas y procesadas hacia los péptidos activos en las proyecciones axonales vía la eminencia media hasta la neurohipófisis, de donde son liberadas a la circulación junto con las porciones moleculares precursoras (neurofisinas; Hatton, 1990).

Mientras que la VP tiene como funciones principales la regulación de la presión arterial y el equilibrio hídrico del organismo, la OT se relaciona principalmente con el trabajo de parto y la evacuación de leche durante la lactancia (Baulieu y Kelly, 1990; Reichlin, 1992). Estas dos neurohormonas, a pesar de ser las más conocidas, no son las únicas sintetizadas por el sistema hipotálamo-neurohipofisiario. Diversas evidencias muestran que las neuronas de este sistema expresan y secretan otros mensajeros peptídicos. Entre éstos se encuentran la dinorfina, las encefalinas, la angiotensina II, la colecistoquinina y otros (ver apéndice). Se han propuesto efectos tanto locales como sistémicos para algunos de estos péptidos neurohipofisarios (Sawchenko y cols, 1992), e incluso para las mismas VP y OT. Al respecto se considera que estas neurohormonas pudiesen tener efectos locales sobre el sistema estimulando su propia secreción (Jourdain y cols, 1999).

Evidencia experimental de nuestro laboratorio ha permitido incluir a la prolactina (PRL) entre el grupo de los péptidos producidos por el sistema hipotálamo-neurohipofisiario. Esta hormona, involucrada en una gran cantidad de funciones y sintetizada por una gran variedad de tejidos (Bole-Feysot y cols, 1998; Ben-Jonathan y cols, 1996, Sinha, 1995), es en realidad una familia molecular derivada de la expresión de un gen único donde su producto de 23 kDa (o PRL

23K) es sujeto a diversas modificaciones postraduccionales como la glicosilación, la fosforilación y la proteólisis (consultar Sinha, 1995).

Entre los tejidos descritos como productores de PRL se encuentra el nervioso y, en particular, el del hipotálamo (Ben-Jonathan y cols, 1996). En el hipotálamo, la detección inmunológica de PRL con el uso de anticuerpos dirigidos contra la forma de 23 kDa incluye preferencialmente a los núcleos arcuato y ventromedial (DeVito, 1988a; DeVito y cols, 1987; Emanuele y cols, 1986; Harlan y cols, 1989; Siaud y cols, 1989; Thompson, 1982; Toubeau y cols, 1979). Sin embargo, con el uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra un fragmento de 16 kDa de PRL (o PRL 16K; ver apéndice) se encontró inmunorreactividad en somas neuronales de los núcleos PV y SO, así como en sus proyecciones neurohipofisarias (Clapp y cols, 1994; Gutiérrez-Ospina, 1995). Este hallazgo contrastó, de manera sorpresiva, con otros reportes donde las neuronas de ambos núcleos no contenían PRL o la contenían en cantidades mucho menores a otros núcleos hipotalámicos (DeVito y cols, 1987; Emanuele y cols, 1986; Siaud y cols, 1989; Thompson, 1982; Toubeau y cols, 1979).

Este resultado inesperado fue corroborado por evidencias que documentan la producción, secreción y bioactividad de las PRLs en el sistema hipotálamo-neurohipofisario (López-Gómez y cols, 1995; Torner y cols, 1995). Con respecto a esto mencionaremos de forma breve que se observó que estas moléculas no desaparecen del hipotálamo de ratas hipofisectomizadas (procedimiento realizado para remover la hipófisis anterior, que es el principal sitio de síntesis de prolactina y que podría estar encargado de proveer de esta hormona a otros tejidos, incluido el nervioso) (Torner y cols, 1995). Además, el ARN mensajero para PRL se expresa en los núcleos PV y SO aislados (Clapp y cols, 1994; Torner y cols, 1995) y se traduce a proteínas de 23 y 14 kDa que poseen propiedades biológicas e inmunológicas específicas para esta familia hormonal (López-Gómez y cols, 1995). De hecho, dado que aproximadamente el 80% de la antigenicidad total en los extractos neurohipofisarios corresponde a la proteína de 14 kDa (Clapp y cols, 1994), se especula que la falta de detección de PRL en el sistema hipotálamo-neurohipofisario es consecuencia de que los anticuerpos dirigidos contra la PRL íntegra no reaccionan o lo hacen pobremente con la PRL de menor tamaño (Mejía y cols, 1997). En apoyo a esta posibilidad, en nuestro laboratorio no fue posible observar PRL hipotálamo-neurohipofisaria con el uso de

antisueros dirigidos contra PRL 23K (Clapp y cols, 1994). Creemos que la PRL de 14 kDa probablemente corresponde a un fragmento amino-terminal de PRL. Esta proteína es reconocida por anticuerpos policlonales y monoclonales dirigidos contra el extremo amino-terminal de PRL (Clapp y cols, 1994; Torner y cols, 1995), mas no por anticuerpos monoclonales dirigidos contra la región C-terminal (resultados no publicados). Más aun, la PRL neurohipofisiaria de 14 kDa inhibe la proliferación de células endoteliales en cultivo, efecto que comparte con el fragmento amino-terminal de la PRL de 16 kDa (López-Gómez y cols, 1995).

Ahora bien, la presencia de PRLs en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario nos llevó a preguntarnos cuál es su posible función. Al respecto, estas PRLs podrían actuar como mensajeros endócrinos o como mensajeros locales, ya sea autócrinos o parácrinos. Estas posibilidades se apoyan en que tanto explantes hipotálamo-neurohipofisiarios como neurohipófisis aisladas son capaces de secretar, de forma dependiente de calcio, a ambos péptidos al medio de incubación (Torner y cols, 1995). Más aun, el ingreso de las PRLs a la vía de secreción neuronal se apoya en su localización en los gránulos secretorios de estas neuronas (Mejía y cols, 1997). En apoyo a posibles acciones periféricas para la PRL neurohipofisiaria se ha detectado la presencia de una PRL de 14 kDa en la circulación y se encontró que el riñón, conocido órgano blanco de la PRL, puede unir con mayor afinidad fragmentos de esta hormona que a la PRL misma (Clapp y cols, 1989). Finalmente, la PRL de 14 kDa tiene efectos antiangiogénicos (López-Gómez y cols, 1995) y podría ejercerlos sistémicamente.

Existen también evidencias que apoyan el que las PRLs sean mensajeros locales de este sistema. La idea de que los péptidos neurohipofisiarios tienen una acción local surge, en parte, de que éstos suelen encontrarse en concentraciones bajas, de dos a tres órdenes de magnitud menores, con respecto a VP y OT (Cunningham y Sawchenko, 1991). Se considera que su dilución al ser secretadas a la circulación limitaría posibles acciones periféricas. Sin embargo, esta idea se ve reforzada por observaciones en diferentes bioensayos que muestran que algunos de estos neuropéptidos pueden afectar la secreción de VP o de OT. Por ejemplo, el uso de agonistas y antagonistas opioides permitió demostrar que la secreción de OT, pero no la de VP, es estimulada por dinorfina A (Bondy y cols, 1988), y no por encefalinas (Bicknell, 1985; Bicknell y cols, 1985). La dinorfina A se encuentra en células vasopresinérgicas mientras que las

encefalinas se localizan tanto en neuronas vasopresinérgicas como oxitocinérgicas (Martín y Voigt, 1981). En cambio colecistoquinina, que es sintetizada por células oxitocinérgicas, parece ser un potente secretagogo tanto de VP como de OT en las terminaciones neurohipofisarias (Bondy y cols, 1989). Otro ejemplo es la AII, que se sabe estimula la secreción de VP al medio de incubación de explantes hipotálamo-neurohipofisarios (Sladek y Joynt, 1979a). Asimismo, y como ya se mencionó anteriormente, también existe la posibilidad de que VP y/u OT afecten su propia secreción. Al respecto se ha observado la presencia de ambos nonapéptidos en medio de perfusión del área de los núcleos PV y SO, lo que implica su posible liberación local (Renaud y Bourque, 1991). Además, se sabe que en el núcleo SO existen elementos pre- y postsinápticos que contienen oxitocina. Algunas de estas sinapsis oxitocinérgicas ocurren sobre las propias neuronas que contienen OT y podrían representar la base anatómica para la acción autócrina de esta hormona sobre su secreción (Jourdain y cols, 1999; Theodosis, 1985).

Con respecto a posibles efectos locales de las PRLs neurohipofisarias, se ha encontrado que el receptor para PRL se expresa en el hipotálamo, incluidos los núcleos PV y SO (Crume rolle-Arias y cols, 1993; Roky y cols, 1996). Esto sugiere que las PRLs del sistema neurohipofisario pudiesen ejercer efectos autócrinos y/o parácrinos sobre las neuronas de los núcleos PV y SO. Al respecto, en un estudio previo (Mejía, 1996; Mejía y cols, 1997) se observó que las neuronas que contienen PRL presentan una distribución muy similar a la de las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas, la cuál es diferente de la de las magnocelulares oxitocinérgicas. Así, en el núcleo PV, las neuronas vasopresinérgicas y las que contienen PRL se distribuyen preferencialmente en las regiones posteriores y centrales. En cambio, las neuronas oxitocinérgicas tienden a ocupar una región más anterior y se distribuyen en la periferia del núcleo. Similarmente, en el núcleo SO las neuronas positivas a PRL y las vasopresinérgicas tienden a aparecer en la región ventral del núcleo, mientras que las oxitocinérgicas ocupan la región dorsal y distal del mismo (ver Mejía, 1996). La colocalización celular de PRL y VP sugerida por dicho estudio permite especular sobre posibles mecanismos de regulación y efectos comunes de ambas hormonas. Se sabe que la PRL posee efectos osmorregulatorios sobre la concentración iónica de fluidos corporales en los diversos grupos de vertebrados (Nicoll, 1980) y algunos de estos efectos podrían involucrar a las PRLs neurohipofisarias gracias a acciones autócrinas de éstas sobre la liberación de VP. Alternativamente, las PRLs neurohipofisarias

MATERIALES Y METODOS

Anticuerpos. Se utilizó un antisuero anti-PRL 16K generado en conejo en una dilución de 1:500. La especificidad del antisuero anti-PRL 16K fue corroborada gracias a su inmunoadsorción con PRL 16K (1 μ M) y su falta de reactividad con otros péptidos hipotalámicos, incluidas VP y OT (ver Clapp y cols, 1994). Los antisueros policlonales anti-vasopresina y anti-oxitocina (donados por el Dr. W. Samson, University of Saint Louis, St. Louis, MO) se utilizaron a una dilución 1:1000. Los receptores a prolactina se analizaron utilizando el anticuerpo monoclonal U5 (donado por el Dr. P.A. Kelly, INSERM, Francia). El revelado se realizó con antisueros policlonales anti-IgG de conejo acoplados a rodamina (RITC) y a fluoresceína (FITC), así como con antisueros anti-IgG de ratón acoplados a los mismos fluoróforos (Jackson Immunoresearch Laboratories, Inc. Pennsylvania).

Prolactina 16K. Este fragmento fue generado *in vitro* mediante la proteólisis de un estándar de PRL de rata con extractos de glándula mamaria de acuerdo al método descrito (Clapp y cols, 1989).

Animales. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar con un peso de 200-250g que fueron mantenidas en periodos de luz-obscuridad de 12 h. En el caso de los ensayos de inmunocitoquímica, éstos fueron realizados con animales en la fase del estro (determinada por examen del exudado vaginal). Para los estudios de expresión de PRL en cerebro, la citología vaginal de las hembras fue monitoreada por tres ciclos consecutivos y fueron sacrificadas entre las 11:00 y las 12:00 de la mañana del día en que se encontraban en la fase de estro, proestro y diestro. A un grupo de hembras (n=12) se les ovariectomizó de forma bilateral bajo anestesia profunda (pentobarbital, 130 mg/kg) y a la mitad de éstas se le implantó de forma subcutánea una cápsula de liberación lenta de benzoato de estradiol (Torner y cols, 1999). Diez días después de ser ovariectomizadas, tanto las ratas control como la implantadas con la cápsula de estradiol fueron sacrificadas por decapitación y sus cerebros e hipófisis fueron congelados a -70°C .

Preparación de muestras. Animales bajo anestesia profunda (0.4 ml/kg de Anestosal) fueron perfundidos de forma intracardiaca con 250 ml de amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 7.4, en disolución salina isotónica fría (PBS). Subsecuentemente se perfundieron con paraformaldehído al 2% y ácido pícrico 0.18% en PBS frío por 3-5 min a flujo rápido y otros 45 min a flujo lento hasta completar 250 ml. Cerebro e hipófisis fueron postfijados 2 h a temperatura ambiente en el mismo fijador y posteriormente transferidos a sacarosa al 20% en PBS hasta la saturación del tejido. Las muestras fueron seccionadas a -16°C en un crióstato modelo 975C (American Optical Co., Buffalo, N.Y.).

Inmunocitoquímica. Se llevó a cabo de acuerdo al método descrito (Mejía y cols, 1997). Mencionaremos, en forma breve, que los cerebros fueron cortados en forma coronal entre los 800 y 1200 μm caudales a la comisura anterior. Los cortes, de un grosor de 25 μm en el caso de cerebro y de 12 μm en el de hipófisis fueron recogidos en laminillas previamente desengrasadas, tratadas con Vectabond (Vector Laboratories, Burlingame, CA), y bloqueadas por incubación

durante 1 h a temperatura ambiente en PBS adicionado de albúmina sérica bovina al 2% y suero normal de cabra al 2%. Subsecuentemente, las laminillas se incubaron con el anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Al término de la incubación se lavó el exceso de anticuerpo y se realizó el revelado con el anticuerpo secundario correspondiente (diluido 1:200 en todos los casos) incubando durante 2 h. Las muestras se lavaron, montaron en glicerol/PBS (50%/50%) y se analizaron por microscopía de epifluorescencia y confocal. En el caso de las muestras reveladas con un reactivo precipitable se siguió el mismo procedimiento. Sin embargo, en el revelado se utilizó un anticuerpo secundario biotinilado anti-conejo diluido 1:200 durante 1 h. Se lavó el exceso de anticuerpo y se incubó por 1 h más con el complejo biotina-avidina acoplado a peroxidasa de acuerdo al método recomendado (método ABC; Vector Laboratories, Burlingame, CA). Las muestras, después de lavarse, fueron expuestas a diaminobencidina (DAB) al 0.05% y peróxido de hidrógeno al 0.015% durante 3-4 min. Finalmente, el tejido fue montado en Entellan y analizado por microscopía de luz visible. Las células positivas se observaron cubiertas por un precipitado café. Para los experimentos de doble inmunocitoquímica la reacción se realizó incubando las muestras con los anticuerpos primarios de interés de forma simultánea (anti-receptor a PRL coincubado con anti-VP o anti-receptor a PRL coincubado con anti-OT) durante la noche y revelando posteriormente también por coincubación con los anticuerpos secundarios correspondientes (anti-IgG de conejo acoplado a fluoresceína en el caso de los anticuerpos Policlonales anti-VP y anti-OT, y anti-IgG de ratón acoplado a rodamina en el caso del anticuerpo monoclonal U5, ambos diluidos 1:200). El procesamiento posterior de las muestras fue igual al utilizado en la inmunofluorescencia sencilla y en ningún caso se observó reactividad cruzada (evaluada por fluorescencia) entre los anticuerpos primarios y secundarios.

Explantes hipotálamo-neurohipofisarios. Los animales fueron sacrificados por decapitación y el explante se tomó de la región ventral del hipotálamo mediante una aproximación caudal. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se eliminó la hipófisis anterior. El bloque de tejido se recuperó cortando en forma rostral al quiasma óptico, lateral a los núcleos paraventriculares y dorsal a los cuerpos mamilares. El tejido fue separado del cerebro a una profundidad de aproximadamente 2 mm y por inspección ocular se vio que incluyera los núcleos PV, SO, los núcleos accesorios magnocelulares, así como el tallo neurohipofisario y la neurohipófisis. Los explantes fueron colocados de forma individual en 1 ml de medio F-12K modificado por Kraign (Gibco BRL, Grand Island, NY) adicionado de 20% de suero fetal bovino, 1 mg/ml de glucosa, 100,000 U/ml de penicilina G y 100,000 µg/ml de estreptomina. El tejido fue colocado en un incubador-humidificador a 37°C en una atmósfera de O₂/CO₂ (95/5%) hasta el momento de su uso, que fue de 18 a 24 h después del aislamiento. El día del ensayo se realizó un lavado previo del explante con medio de incubación fresco y posteriormente se le incubó en el mismo por varios periodos consecutivos de 45 min (5 a 8 periodos, dependiendo del experimento). El medio de incubación de cada periodo se almacenó a -70°C.

Radioinmunoensayo de vasopresina. La VP liberada al medio de incubación fue medida por radioinmunoensayo. Tanto la curva patrón (1 a 1000 pg) de VP como las muestras problema fueron analizadas por duplicado diluidas en un volumen final de 800 µl con PBS 0.01M, pH 7.6. A cada tubo se adicionaron 100 µl del antisuero anti-vasopresina diluido previamente (1:2000 en PBS 0.01M, EDTA 0.05 M y suero normal de conejo 1:100) y 100 µl de [¹²⁵I]iodo-vasopresina (10,000 cpm) diluida en PBS 0.1M, BSA 0.1%. Las muestras fueron incubadas por 18-24 h a temperatura ambiente al cabo de las cuales se precipitó la [¹²⁵I]iodo-VP libre con 100 µl de una

disolución de carbón activado/dextrán (6.25 g/0.625 g en PBS, pH 7.6). Las muestras se centrifugaron 30 min a 3,500 rpm y la radioactividad del sobrenadante se cuantificó en un contador de centelleo.

Aislamiento de ARN, retrotranscripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Se utilizaron 40 núcleos PV y 40 núcleos SO por cada grupo experimental. Estos fueron aislados por la técnica de microextracción (Palkovits, 1983) a partir de rebanadas de cerebros congelados de 0.5 mm. El ARN total de núcleos PV y SO, de la corteza cerebral y de pituitaria anterior fue extraído por el método de fenol-cloroformo (Chomczynski y Sacchi, 1987). Los cebadores utilizados para la retrotranscripción fueron los siguientes: para PRL de rata se utilizó un cebador 5' correspondiente al exón 2 (5'-TGTTCTGGTGGCGACTGCCAGACACCT-3') y un cebador 3' complementario para el exón 4 (5'-TATCTTTTCGATCCCTTCGAGAAGCCG-3'). El producto esperado de la amplificación de estos dos cebadores es de 388 pb. Para la amplificación del ARNm de β -actina se utilizó el cebador 5': 5'-ATGGTGGGAATGGGTCAGAA-3' y el cebador 3': 5'-TCGTACTCCTGCTTGCTGA-3', cuyo producto esperado es de 876 pb.

El ARN total (1.5 μ g) fue retrotranscrito por 1 h a 37°C en 24 μ l de Tris-HCl 20 mM (pH 8.3) que contenían KCl 50 mM, MgCl₂ 2.5 mM, desoxirribonucleótidos (0.2 mM de cada uno), 600 ng del cebador oligo (dT), 5 U de RNAsina (Promega, Madison, WI, USA) y 200 U de transcriptasa inversa (del virus Moloney de leucemia murina). Después de la incubación la mezcla se calentó a 96°C por 5 min y se enfrió en hielo. Tres μ l de esta mezcla se adicionaron a la mezcla de reacción para PCR que incluyó 20 μ l de Tris-HCl 20 mM (pH 8.3), KCl 50 mM, MgCl₂ 2 mM, 200 μ M de cada desoxirribonucleótido, los dos cebadores en una concentración de 400 nM y 1 U de Taq DNA polimerasa. Después de desnaturalizar por 3 min a 94°C, la amplificación se realizó por 40 ciclos (cada ciclo constó de incubaciones sucesivas a 94°C por 30 s, a 65°C por 45 s y a 72°C por 45 s) seguidos por una incubación de 7 min a 72°C al final de la amplificación. Para actina se utilizó una temperatura de renaturalización de 55°C durante los 40 ciclos en lugar de la temperatura de 65°C utilizada para PRL.

Southern blot. La mezcla de amplificación fue procesada en un gel de agarosa 1.2% y transferida a membranas de Hybond-N (Amersham International, Amersham, Bucks, UK). Las membranas fueron hibridizadas con ADN complementario del gen de PRL (generosamente donado por R. Maurer, Oregon Health Sciences University, Portland, OR, USA). Las sondas fueron marcadas con [32P]dATP de acuerdo al método descrito (Feimberg & Vogelstein, 1983). La hibridación se realizó por 16 h a 68°C en una disolución SSC 5x (1x = NaCl 150 mM, citrato de sodio 15 mM, pH 7.0), SDS 0.5%, solución de Denhardt 6x y DNA de esperma de salmón 100 μ g/ml. Las membranas fueron lavadas dos veces a temperatura ambiente con SSC 2x y SDS 0.1%, tres veces a 68°C con SSC 0.1x y SDS 0.1% y expuestas a una película Kodak XAR-5. La placa expuesta a los productos de RT-PCR fue analizada por densitometría y la expresión del ARNm a PRL fue normalizada dividiendo su valor densitométrico entre el valor arrojado por la expresión del gene de β -actina correspondiente a esa misma muestra

Western blot. Las hipófisis posteriores (aproximadamente 5 mg) fueron sonicadas en 100 μ l de amortiguador de lisis (Tris-HCl 0.01 M, NaCl 0.14 M, Tritón X-100 1%, pH 8.0, adicionado de

0.2 U/ml de aprotinina y fluoruro de fenilmetilsulfonilo 1 mM). Los extractos de tejido, corregidos por concentración de proteína, fueron sometidos a electroforesis en condiciones reductoras y posteriormente transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con una dilución 1:500 de un antisuero anti-PRL 16K. El revelado se realizó con fosfatasa alcalina acoplada a un segundo anticuerpo utilizando un kit comercial (Bio-Rad Labs, Hercules, CA, USA). Se observó una relación lineal entre los valores de densidad óptica de diferentes concentraciones de los estándares de prolactina (PRL 23K y PRL 16K) y entre diluciones seriadas de extractos neurohipofisarios.

Análisis estadístico. El análisis estadístico de los resultados fue realizado por medio del método ANOVA seguido del método de la *t* de Student. Se reportan como significativas diferencias para $p < 0.05$.

RESULTADOS

Los estrógenos estimulan la expresión de prolactina en los núcleos paraventriculares y supraópticos.

Los estrógenos se encuentran entre los factores involucrados en la regulación positiva tanto de la expresión como de la secreción de las hormonas hipotálamo-neurohipofisarias (Hrabovszky y cols, 1998) y de la PRL adenohipofisaria (Ben-Jonathan y cols, 1996). Esto permitió proponer que los estrógenos podrían regular la expresión del ARN para PRL en los núcleos PV y SO. Para investigar esta posibilidad se determinó la expresión del ARNm de PRL en dichos núcleos en ratas machos y hembras bajo diversos estadios del ciclo estral, así como en hembras ovariectomizadas y hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos. El ARN total fue retrotranscrito y amplificado por medio de la reacción en cadena de la polimerasa usando dos oligonucleótidos complementarios al ADN del gen de PRL de rata. En todos los casos se observó solamente el producto de amplificación esperado de 388 pares de bases que corresponde al transcrito que codifica para la PRL. La identidad del producto de amplificación fue corroborada al ser reconocido en un *southern blot* por una sonda específica para PRL. De cada muestra se amplificó también el gen de la β -actina para determinar la eficiencia de la reacción de retrotranscripción y amplificación (Figura 1).

En ambos núcleos hipotalámicos la concentración aparente del transcrito amplificado tiende a ser mayor en hembras que en machos y varió en relación con el ciclo estral: mayor en ratas en estro con respecto a las ratas en proestro y diestro. Asimismo, en animales ovariectomizados el transcrito de PRL aumentó en aquellos tratados con estrógenos con respecto a los controles ovariectomizados sin tratamiento estrogénico. Estas diferencias resultaron ser estadísticamente significativas después de analizar por densitometría las bandas correspondientes a los transcritos de PRL y de corregirlos por los valores densitométricos de los transcritos de β -actina de las mismas muestras (Ver materiales y métodos y figura 1).

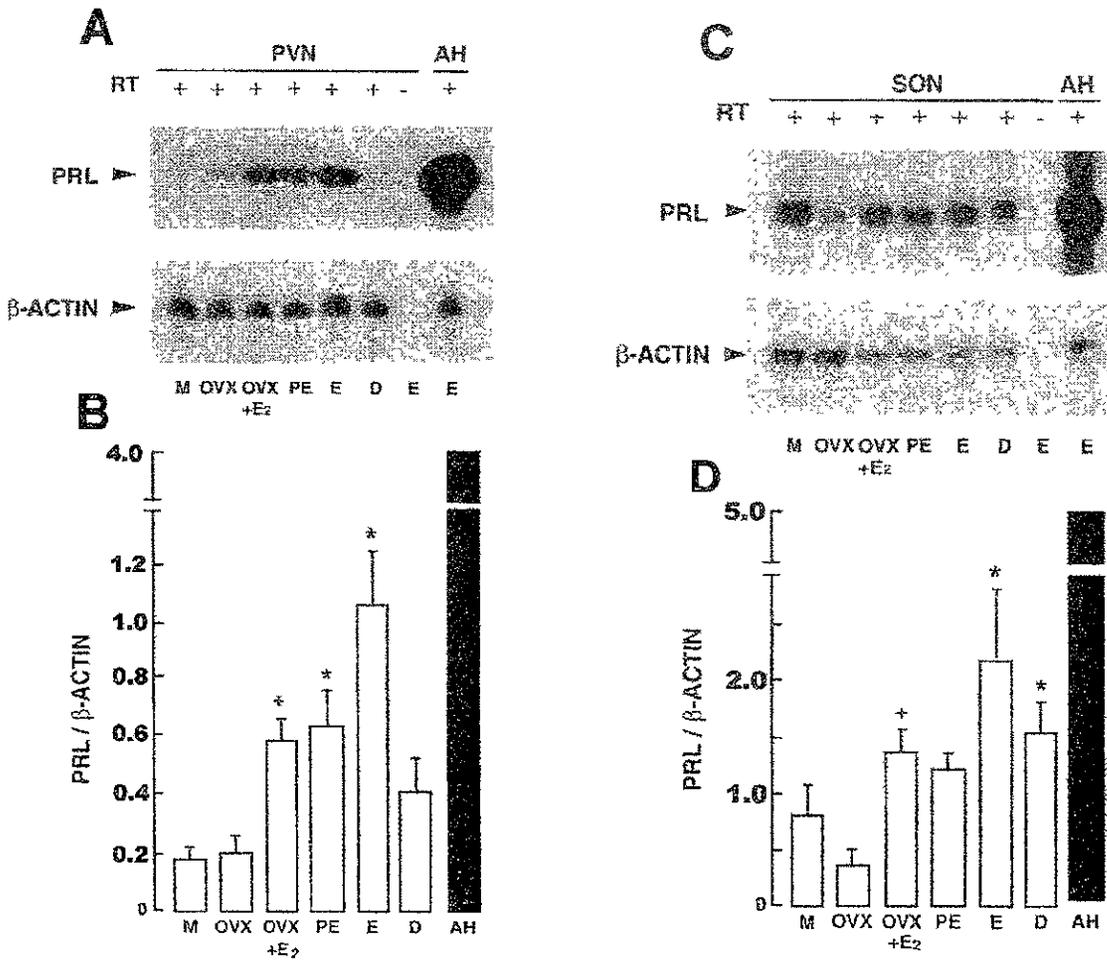


Figura 1. Análisis por RT-PCR del ARN total de núcleos PV (A y B) y núcleos SO (C y D) de ratas macho (M) y ratas hembra ovariectomizadas (OVX), ovariectomizadas tratadas con estrógenos (OVX+E₂) y en varios estadios del ciclo estral. Las hembras ciclantes fueron sacrificadas en las fases de proestro (PE), estró (E) y diestro II (D) del ciclo. (A y C) Southern blot de los productos de RT-PCR de ambos núcleos hipotalámicos e hipófisis anterior (AH) en presencia y ausencia de transcriptasa inversa. Los productos de PCR para PRL y β-actina son de 388 y 876 pares de bases respectivamente (B y D) Relación entre los productos amplificados para PRL y β-actina de expresados como promedio±error estándar (n=3). Los datos fueron cuantificados por densitometría (*p<0.05 vs macho u ovariectomizada).

Prolactina colocaliza con vasopresina en neuronas magnocelulares del sistema hipotálamo-neurohipofisiario.

De acuerdo a lo reportado (Clapp y cols, 1994) los anticuerpos anti-PRL 16K marcaron positivamente tanto neuronas magnocelulares (de un diámetro aproximado de 30 μm) como procesos neuronales en los núcleos PV y SO del hipotálamo (Figura 2). Como ya se mencionó, el análisis de cortes secuenciales a lo largo de ambos núcleos mostró que la distribución de las neuronas positivas a PRL es muy semejante a la de las neuronas magnocelulares vasopresinérgicas, lo que sugirió que ambos antígenos podrían estar colocalizados (Mejía, 1996). Es por ello que, para cumplir con uno de los objetivos de esta tesis, examinamos mediante ensayos de doble inmunofluorescencia la colocalización de PRL y VP en las mismas neuronas.

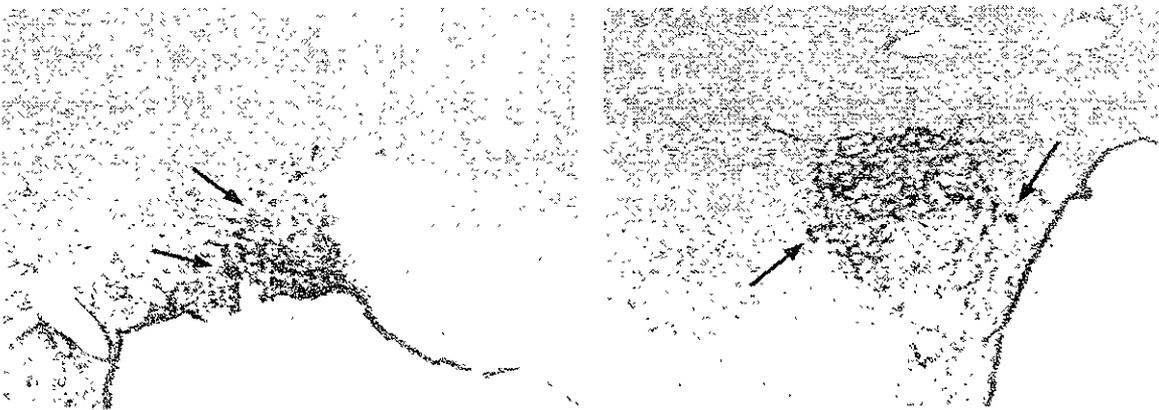


Figura 2. Distribución de las neuronas positivas a PRL 16K en los núcleos PV y SO. Tinción, por medio de la técnica de la peroxidasa, de neuronas y procesos inmunorreactivos a PRL en los núcleos PV (a) y SO (b). Se aprecian neuronas de tipo magnocelular de aproximadamente 30 μm (se señalan con flechas algunos ejemplos). Asimismo, se pueden observar varios procesos inmunorreactivos en la vecindad de los núcleos (flechas pequeñas) (Calibración: 50 μm).

Con ayuda del análisis por microscopía confocal se revisaron cortes seriados de los núcleos PV y SO teñidos para ambos antígenos. El análisis de los resultados mostró marca para PRL en la mayoría de las neuronas vasopresinérgicas de ambos núcleos (Figura 3). También fueron encontradas tanto neuronas como procesos celulares vasopresinérgicos que no contenían inmunoreactividad tipo PRL (Figuras 3c, 3f y 4) Aunque no se determinó su número, éste parece menor al de la población que presentó ambas marcas. Asimismo, fueron detectadas algunas neuronas dispersas que sólo contenían la marca a PRL (Figuras 3f y 4). Debido a que las

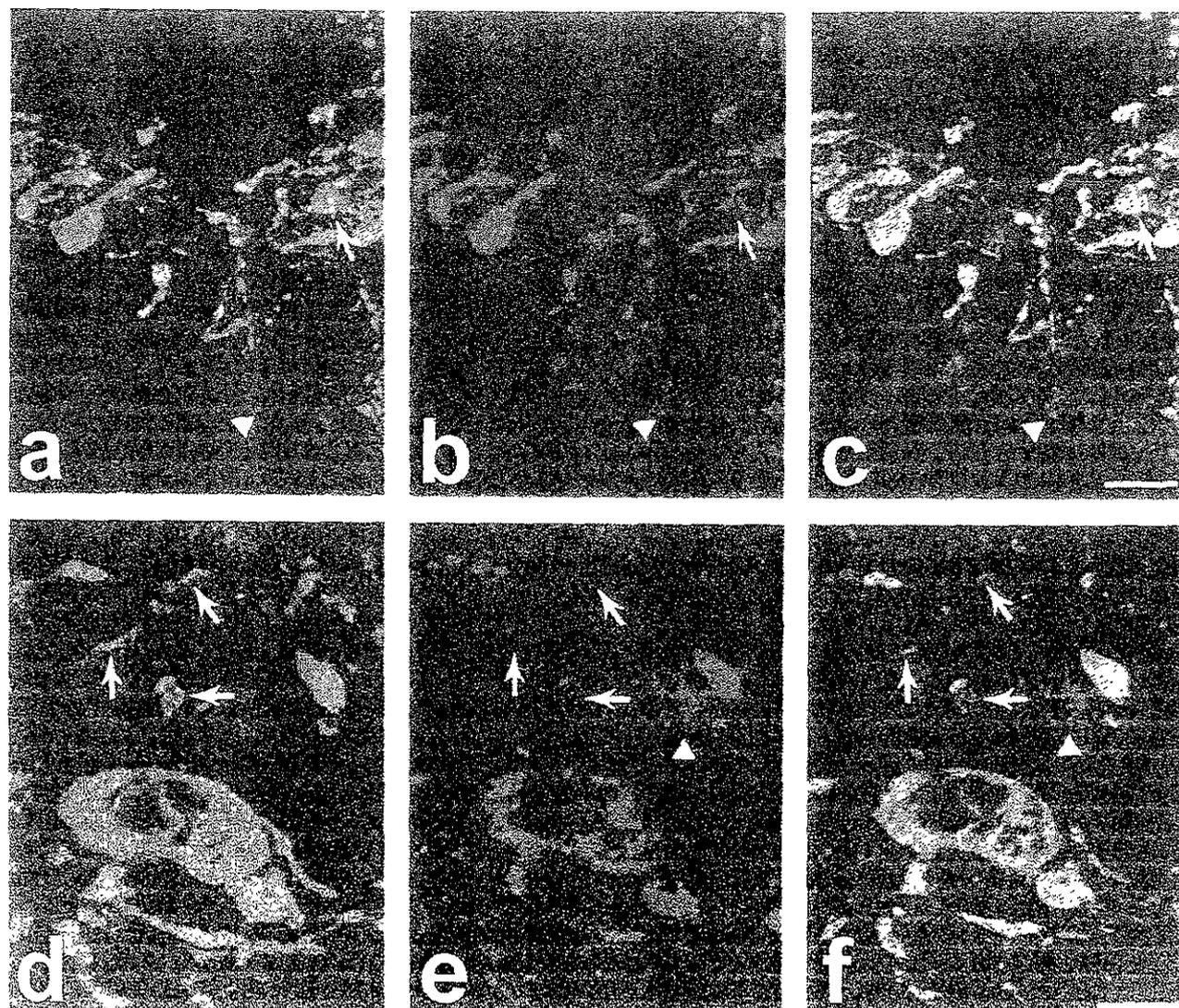


Figura 3. Colocalización de inmunoreactividad tipo PRL 16K y tipo VP en somas y procesos neuronales de los núcleos SO y PV. Fotografías representativas de secciones de los núcleos SO (a-c) y PV (d-f) procesadas por doble inmunocitoquímica para VP y PRL 16K. VP se observa en verde (representativo de fluoresceína, a y d), mientras que PRL 16K se observa en rojo (representativo de rodamina, b y e). c es la superposición digital de los dos canales a y b, mientras que f lo es de d y e, en donde los elementos en los que existe doble marca se ven en amarillo. Se señalan células y procesos teñidos sólo para VP (flechas) y para PRL 16K (cabezas de flecha). Barra de calibración de a, b y c: 50 μ m. Barra de calibración de d, e y f: 25 μ m (Tomada de Mejía y cols. 1997).

neuronas magnocelulares sólo parecen ser de dos tipos, vasopresinérgicas u oxitocinérgicas, es probable que las neuronas que sólo se marcan para PRL sean de tipo oxitocinérgico. Serán necesarios estudios de doble inmunocitoquímica con PRL y OT para confirmar esta suposición.



Figura 4. Fotografía representativa de una sección del núcleo PV procesada por doble inmunocitoquímica para VP y PRL 16K. VP se observa en verde, mientras que PRL 16K se observa en rojo. Nuevamente, los elementos donde existe doble marca se presentan en amarillo. Al centro una neurona presenta la marca correspondiente a ambos antígenos (flecha grande). Asimismo, alrededor de ésta se aprecian varias proyecciones también positivas para ambos antígenos. En la parte superior se observan algunas proyecciones que sólo son inmunopositivas para VP (cabezas de flecha), mientras que en la parte inferior izquierda se muestra una neurona que sólo es positiva para PRL 16K (flecha pequeña) (Barra de calibración: 10 μ m).

El receptor de PRL se localiza tanto en neuronas magnocelulares vasopresinérgicas como en oxitocinérgicas.

De acuerdo a estudios previos el receptor a PRL se localiza en diversas regiones del cerebro (Crumeyroлле-Arias y cols, 1993; Roky y cols, 1996). Dentro del hipotálamo la distribución de éste es relativamente ubicua, ya que incluye los núcleos SO, PV, periventricular, perifornical, dorsolateral, ventromedial, y neuronas dispersas cercanas a los cuerpos mamilares y a lo largo de la pared del tercer ventrículo (Roky y cols, 1996). La presencia del receptor de PRL tanto en los núcleos PV como en los SO sustenta posibles acciones locales de las PRLs sintetizadas en las neuronas magnocelulares de ambos núcleos.

Los estudios de localización referidos se basaron en el uso del anticuerpo monoclonal denominado U5, desarrollado por el Dr. P A. Kelly (INSERM, Francia), y que reconoce una

región extramembranal del receptor a PRL que es distinta del sitio de unión a esta hormona. En nuestras manos este anticuerpo permitió identificar somas neuronales positivos en las regiones hipotalámicas previamente reportadas, incluyendo a los núcleos PV y SO (Figura 6a y 6b). Este anticuerpo se utilizó en experimentos de doble inmunocitoquímica para examinar la colocalización del receptor de PRL con VP y OT. Los resultados se analizaron por microscopía confocal (Figura 5) y de fluorescencia (Figura 6).

Como se puede apreciar en la figura 5, en el núcleo PV las células inmunorreactivas al receptor de PRL son más abundantes que las células inmunorreactivas a OT. El doble marcaje para estos antígenos mostró que la mayoría de las neuronas marcadas para OT colocalizan la marca para el receptor a PRL, aunque también permitió observar algunas neuronas positivas a OT que no contienen dicho receptor (resultado no mostrado). En cambio, mientras que la doble inmunofluorescencia mostró nuevamente mayor abundancia de neuronas magnocelulares positivas al receptor a PRL que a VP, en todos los casos observamos que las neuronas vasopresinérgicas también contenían inmunoreactividad para el receptor a PRL (Figura 6, comparar **a** con **b** y **c** con **d**).

Estudios adicionales utilizando las mismas regiones hipotalámicas de varios experimentos independientes permitirán evaluar estas diferencias. La localización del receptor a PRL tanto en células vasopresinérgicas como en células oxitocinérgicas permite especular sobre posibles acciones autócrinas y parácrinas de las PRL sobre los somas de dichas neuronas.

Para tratar de determinar si las PRLs podrían tener efectos de tipo local al nivel de las terminaciones neurohipofisarias se examinó la presencia del receptor de PRL en secciones de la hipófisis posterior. Sin embargo, en ningún caso logramos obtener señal positiva para el receptor a dicha hormona en el tejido neurohipofisario (Resultados no mostrados).

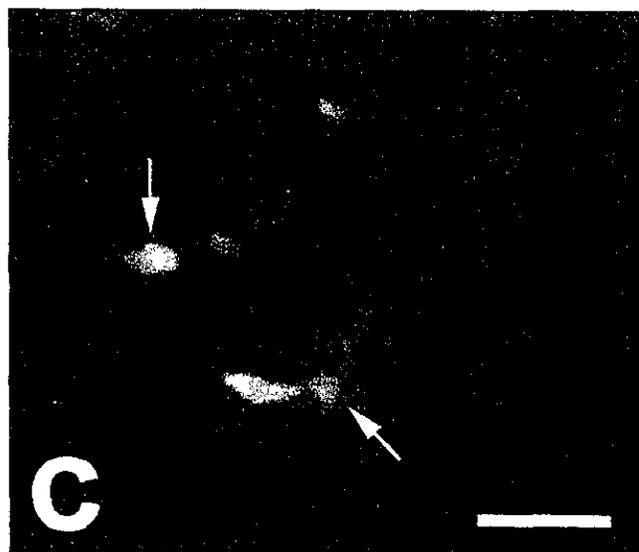
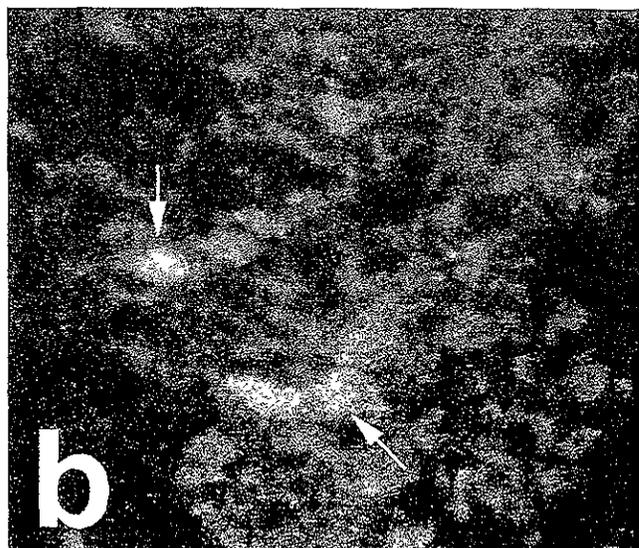
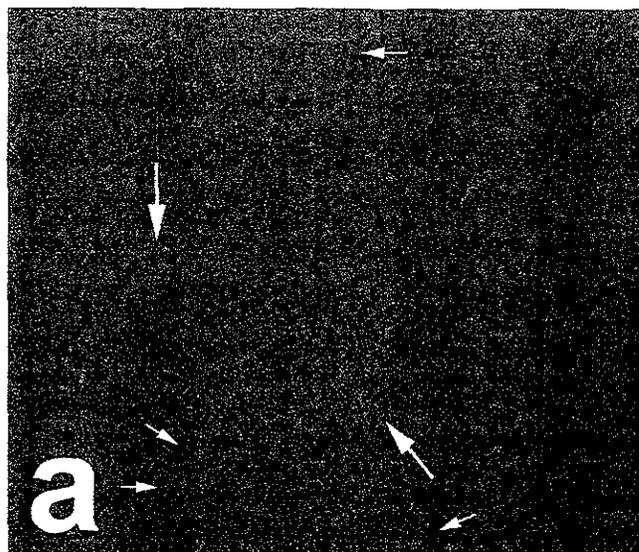


Figura 5. Doble inmunocitoquímica analizada por microscopía confocal de la marca asociada al receptor a PRL y a OT en neuronas magnocelulares del núcleo PV. El receptor a PRL se observa en color rojo (a, representativo de rodamina) mientras que OT se observa en verde (c, representativo de fluorescína). En b se muestra la superposición digital de a y c, donde se observan en amarillo los elementos donde coinciden ambas marcas (flechas). En a se señalan algunas neuronas positivas sólo para el receptor a PRL (flechas pequeñas) (Barra de calibración: 50 μ m).

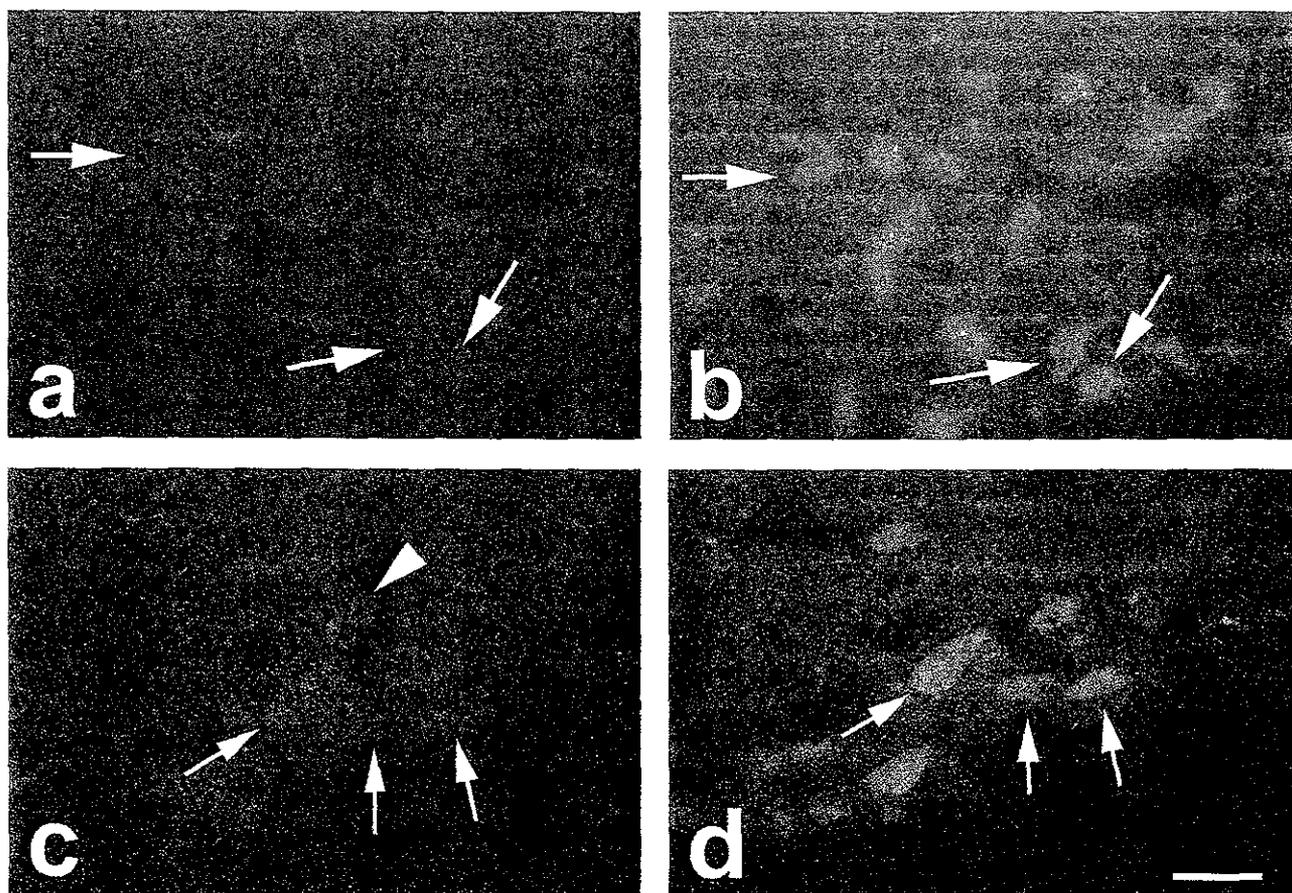


Figura 6. Doble inmunocitoquímica, analizada por epifluorescencia, de la marca asociada a VP y al receptor a PRL en neuronas magnocelulares de los núcleos PV (a y b) y SO (c y d). El receptor a PRL se observa nuevamente en rojo (a y c), mientras que VP se observa en verde (b y d). En ambos núcleos se señalan con flechas algunas células representativas donde se observa la coexistencia de ambos antígenos. En c se muestra una célula que sólo es positiva al receptor a PRL (cabeza de flecha) (Barra de calibración: 50 μ m).

Prolactina y prolactina 16K estimulan la secreción de vasopresina al medio de incubación de explantes hipotálamo-neurohipofisarios.

Para poner a prueba la hipótesis de un posible efecto local de PRL sobre la liberación de VP se incubaron explantes del sistema hipotálamo-neurohipofisario de rata en presencia de preparaciones estándar de PRL 23K o de PRL 16K y se determinaron los niveles de VP en el medio de incubación. Inicialmente, se establecieron como condiciones de incubación adecuadas para realizar los experimentos un periodo de preincubación de 18-24 h seguido de periodos consecutivos de incubación de 45 min. Bajo estas condiciones la liberación basal de VP fue de 313.3 ± 170 pg/explante/h (n=12) y se mantuvo estable a lo largo de los diferentes periodos

(Figura 7). Estos niveles fueron comparables a los previamente reportados en estudios similares (entre 200 y 350 pg/explante/h; Sladek y Knigge, 1977; Sladek y Joynt, 1979b). Para analizar la capacidad de los explantes de responder a factores estimulatorios, éstos fueron expuestos a angiotensina II (AII; figuras 7 y 8A), conocido secretagogo de VP (Sladek y Joynt, 1980; DeVito y cols, 1991). La AII en una concentración 1 μ M aumentó aproximadamente un 50% la concentración de VP en el medio de incubación. Este aumento sólo se observó durante el periodo de exposición a dicho secretagogo, ya que la liberación de VP retornó a sus niveles basales en su ausencia (Figura 7). El efecto de AII fue dependiente de la dosis y llegó a ser de dos veces el basal con la dosis máxima utilizada de 10 μ M (Figura 8A).

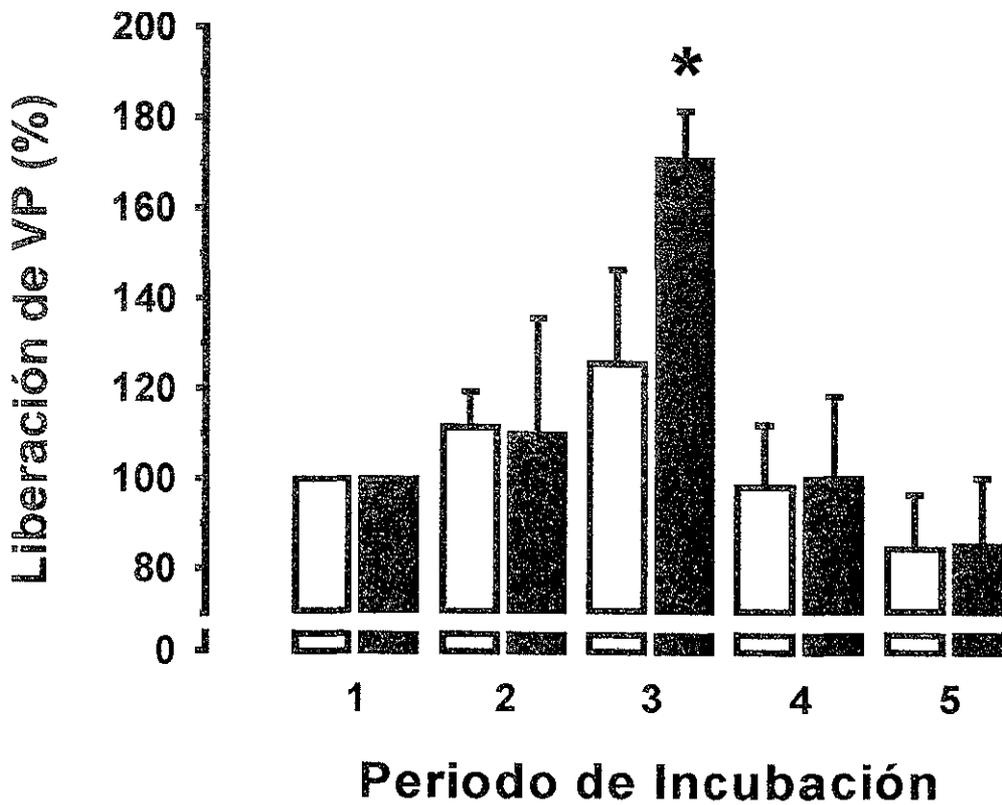


Figura 7. Liberación de VP por explantes hipotálamo neurohipofisarios durante cinco periodos de incubación consecutivos de 45 min cada uno. La VP presente en el medio fue medida por radioinmunoensayo. Se incubaron dos series de explantes: una que no fue sometida a estímulo alguno (barras claras) y una segunda serie que fue expuesta a una concentración 1 μ M de AII durante el tercer periodo de incubación (barras oscuras). Las barras representan promedio \pm error estándar (n=3).

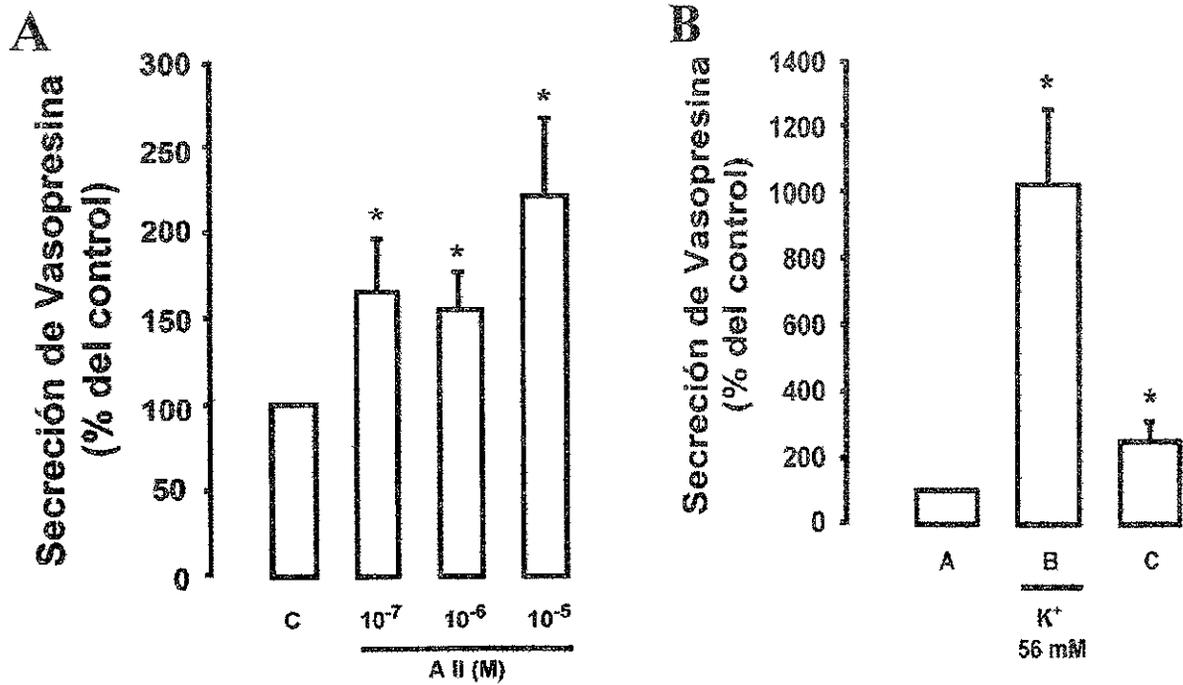


Figura 8. Efecto de A II (A) y despolarización por potasio (K⁺, 56 mM) (B) sobre la liberación de VP al medio de incubación de explantes hipotálamo-neurohipofisarios. La vasopresina liberada al medio de incubación fue medida por radioinmunoensayo (las barras representan el promedio±error estándar, n=6). *p<0.5 vs periodo previo sin tratamiento.

Asimismo, la actividad secretora de los explantes fue valorada en respuesta a una concentración despolarizante de K⁺ (56 mM). Esta concentración de potasio estimuló cerca de diez veces la liberación de VP al medio de incubación (figura 8B).

Comprobada la capacidad de respuesta de los explantes hipotálamo-neurohipofisarios se procedió a determinar si PRL 23K y/o PRL 16K eran capaces de afectar la liberación de VP en ellos. En la figura 9 se muestra que dosis nanomolares tanto de PRL 23K como de PRL 16K fueron capaces de estimular la liberación de VP de forma significativa. Como se puede observar al comparar ambas gráficas, PRL 16K tiende a ser más potente que PRL 23K. Este efecto fue dependiente de la dosis y el efecto máximo observado fue de 50% y de 70% por sobre la liberación basal de VP para PRL 23K y PRL 16K, respectivamente.

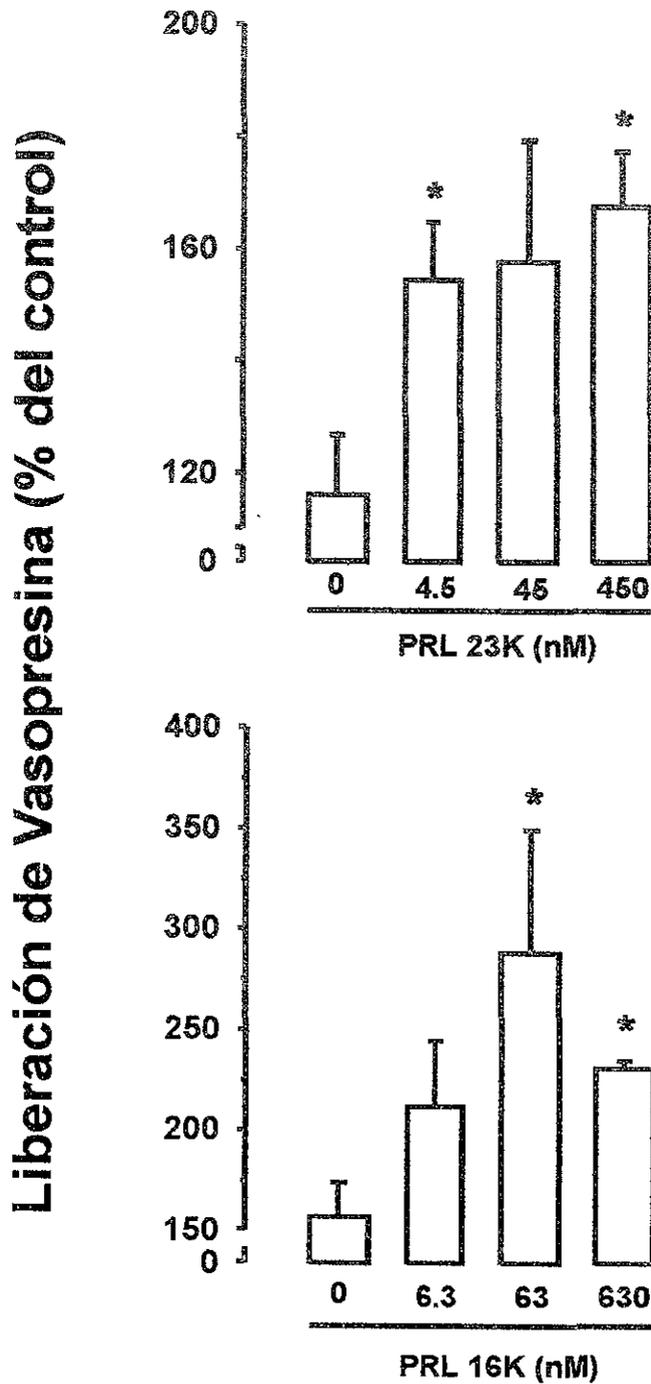


Figura 9. Efecto de PRL 23K (panel superior) y PRL 16K (panel inferior) sobre la liberación de VP al medio de incubación de explantes hipotálamo-neurohipofisarios. Los explantes fueron incubados con las concentraciones indicadas de ambas formas de PRL y la vasopresina liberada al medio de cultivo fue medida por radioinmunoensayo (las barras representan el promedio±error estándar, n=6). *p<0.5 contra el control sin tratamiento.

DISCUSION

En la presente tesis investigamos la posible relevancia funcional de las PRLs hipotálamo-neurohipofisarias como reguladores locales de la secreción hormonal. Con este propósito corroboramos la presencia de PRL en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario y determinamos que los estrógenos estimulan la expresión del ARN mensajero de PRL en los núcleos paraventriculares y supraópticos. Asimismo, determinamos que los receptores de PRL se encuentran tanto en neuronas magnocelulares de tipo vasopresinérgico como oxitocinérgico en estos núcleos. Finalmente, observamos que la PRL y su fragmento de 16 kDa estimulan la liberación de VP por explantes hipotálamo-neurohipofisarios.

Hoy en día es ampliamente aceptada la noción de que diversas formas moleculares de PRL se localizan y producen en el sistema nervioso central. Entre las variantes reportadas se encuentran la PRL nativa de 23 kDa de masa molecular (PRL 23K), formas poliméricas (principalmente dímeros y trímeros), PRL cortada y formas pequeñas con masas moleculares desde 8 hasta 22 kDa (revisado por Ben-Jonathan y cols, 1996). Al parecer todas estas variantes podrían proceder de la modificación postraduccional de PRL 23K dado que, a excepción de un solo reporte que no ha sido confirmado (Emanuele y cols, 1992), en el cerebro no se han encontrado ARN mensajeros diferentes al que codifica para la PRL monomérica.

Ahora bien, la distribución de estos miembros de la familia de la PRL se ha prestado a gran controversia. Por ejemplo, los estudios sobre la antigenicidad tipo PRL en neuronas del sistema nervioso central tienden a arrojar discrepancias significativas entre los distintos laboratorios. La localización inmunológica de PRLs se ha asociado preferencial, aunque no únicamente, a los núcleos arcuato y ventromedial (DeVito, 1988a; DeVito y cols, 1987; Emanuele y cols, 1986; Harlan y cols, 1989; Siaud y cols, 1989; Thompson, 1982; Toubeau y cols, 1979), si bien algunos estudios no han detectado inmunorreactividad tipo PRL en dichos núcleos (Paut-Pagano y cols, 1993). Asimismo, en el núcleo PV y el SO Toubeau y colaboradores (1979) detectaron PRL inmunorreactiva, mas no lo hizo el grupo de Harlan (1989). Adicionalmente, en estos estudios fue necesario utilizar colchicina, que inhibe el transporte axonal de proteínas, para poder

detectar a la PRL (Harlan y cols, 1989; Nishizuka y cols, 1990; Paut-Pagano y cols, 1993; Siaud y cols, 1989; Toubeau y cols, 1979). Otra fuente de variación es la heterogeneidad molecular de la PRL cerebral. Por ejemplo, DeVito reporta tres proteínas inmunorreactivas tipo PRL con masas moleculares aparentes de 24, 16 y 12 kDa (DeVito, 1988b), mientras que el grupo de Emanuele reporta que la mayor parte de las PRLs hipotalámicas son de mayor masa molecular que la PRL adenohipofisiaria (Emanuele y cols, 1986).

Independientemente de su procedencia, de su especificidad y de la potencia del reconocimiento antigénico, en todos los estudios mencionados se ha hecho uso de anticuerpos dirigidos contra la PRL 23K. En nuestro laboratorio, el uso de anticuerpos policlonales dirigidos contra la PRL 23K no permitió detectar PRL inmunorreactiva en los núcleos PV y SO del hipotálamo de la rata. Esta observación coincide con otros reportes donde las neuronas de ambos núcleos no parecen contener o contienen PRL en cantidades mucho menores a otros núcleos hipotalámicos (DeVito y cols, 1987; Emanuele y cols, 1986; Siaud y cols, 1989; Thompson, 1982; Toubeau y cols, 1979). Sin embargo, anticuerpos policlonales dirigidos contra la PRL 16K marcan preferentemente los núcleos PV y SO, aun en ausencia de colchicina. La inmunorreactividad tipo PRL 16K no sólo muestra cuerpos neuronales en los núcleos PV y SO, sino también en los núcleos accesorios magnocefalares (resultados no mostrados). Además, se detectan fibras inmunorreactivas tanto en la eminencia media como en la neurohipófisis (Clapp y cols, 1994). Estudios de Western blot muestran que la forma molecular predominante en la neurohipófisis corresponde a una PRL con un peso molecular aparente de 14 kDa (Clapp y cols, 1994). Este hallazgo parece resolver la controversia de la presencia de PRL en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, ya que implica que en dicho sistema la PRL se encuentra presente, pero es estructuralmente heterogénea, de manera que su detección depende del uso de anticuerpos capaces de detectar sus distintas isoformas.

En base a la localización de los determinantes antigénicos reconocidos por antisueros anti-PRL y el análisis por Western-blot de los mismos, la PRL de 14 kDa parece corresponder al extremo amino terminal de la molécula (Clapp y cols, 1994). Más aun, la PRL 14K comparte determinantes biológicos con las PRLs de 23 y 16 kDa, ya que no sólo estimula la proliferación de las células Nb2 (línea derivada de un linfoma murino y que es utilizada como un bioensayo

específico para PRLs), sino que también inhibe la proliferación de células endoteliales en cultivo (López-Gómez y cols, 1995). Este último es un efecto específico de la PRL 16K que no comparte con la PRL completa (Ferrara y cols, 1991; Clapp y cols, 1993).

Ahora bien, ¿cuál es el origen de las PRLs inmunorreactivas en el sistema hipotálamo-neurohipofisario? En apoyo a su producción local nuestros hallazgos (Torner y cols, 1995) coinciden con reportes en la literatura donde la PRL inmunorreactiva presente en el hipotálamo no desaparece en animales hipofisectomizados (DeVito, 1988a; Emanuele y cols, 1986; Paut-Pagano y cols, 1993; Toubeau y cols, 1979). Esto es importante porque ha sido propuesto que la PRL sistémica de origen adenohipofisario puede ser transportada al sistema nervioso central vía sus receptores en los plexos coroides (Mangurian y cols, 1992). Adicionalmente, también es posible que la PRL adenohipofisaria sea conducida mediante transporte retrógrado a través del sistema portal hipofisario hasta el hipotálamo (Walsh y cols, 1987). Por tanto los resultados en los animales hipofisectomizados descartan a la hipófisis anterior como fuente exclusiva de la PRL hipotalámica. Sin embargo, la prueba más contundente de que las PRLs detectadas en el sistema nervioso central tienen un origen local se desprende de la detección de su ARNm en este sistema. Reportes anteriores ya habían informado sobre la expresión del gen de PRL en el hipotálamo de la rata (DeVito y cols, 1992; Wilson III y cols, 1992), aunque su ARNm no se había localizado en núcleos específicos. En nuestro laboratorio se mostró que los núcleos PV y SO aislados expresan el ARNm que codifica para la PRL nativa de 23 kDa (Clapp y cols, 1994; Torner y cols, 1995; Torner y cols, 1999). La expresión de este mensajero apoya la naturaleza de PRL de las proteínas inmunorreactivas presentes en el sistema. Asimismo, dado que no se encontró un transcrito de menor tamaño, es posible proponer que la PRL 14K resulte del procesamiento proteolítico de la PRL 23K (Clapp y cols, 1994). Al respecto, también se reportó que extractos de núcleos PV y de neurohipófisis procesan enzimáticamente a la PRL hacia el fragmento de 16 kDa (Clapp y cols, 1994) y por lo tanto que dicho sistema contiene enzimas capaces de generar fragmentos equivalentes de PRL. Al respecto, no ha sido dilucidado si la PRL 14K es generada a partir de PRL 23K mediante un procesamiento posterior de la PRL 16K. En su conjunto, los hallazgos anteriores indican que el sistema hipotálamo-neurohipofisario produce PRL y sus fragmentos moleculares.

Se desconoce cual podría ser la relevancia funcional de las PRLs neurohipofisarias. Al igual que para los otros péptidos activos localizados en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario, es posible especular acerca de posibles acciones locales o sistémicas. Al respecto, el análisis de los mecanismos reguladores de la expresión y secreción de la PRL por este sistema podría proveer información relevante acerca de su posible asociación con funciones o estadios fisiológicos particulares. En este sentido, probables candidatos a regular a la PRL neurohipofisaria son los factores que afectan a la VP y la OT. Entre estos factores destacan los estrógenos, ya que se sabe que estas hormonas, además de regular positivamente a la VP y la OT, son determinantes para la expresión y secreción de la PRL adenohipofisaria. Los estrógenos se encuentran entre los factores involucrados en la regulación positiva tanto de la expresión como de la secreción de las hormonas hipotálamo-neurohipofisarias (Hrabovszky y cols, 1998). Las neuronas magnocelulares expresan receptores a estrógenos (Hrabovszky y cols, 1998; Österlund y cols, 1998) y los estrógenos no sólo estimulan la secreción de VP y OT (Slowsky y cols, 1979; Wang y cols, 1995; Yamaguchi y cols, 1979), sino que además la concentración de ambas hormonas varía a lo largo del ciclo estral y en respuesta al tratamiento con estrógenos (Crowley y cols, 1978). Más aun, la expresión de algunos péptidos colocalizados con VP, como son dinorfina, galanina y angiotensina II, aumenta en respuesta a estrógenos (Levin y Sawchenko, 1993). En cuanto a PRL, su gen tiene un elemento de amplificación de la respuesta a estrógenos en la región distal no traducida (Maurer y cols, 1990) y los estrógenos han sido ampliamente reconocidos como activadores de su transcripción tanto en la hipófisis anterior como en el cerebro (para una revisión consultar Ben Jonathan y cols, 1996). Además, los niveles de PRL hipotalámica son mayores en ratas hembra que en machos, y los estrógenos incrementan no sólo la expresión del gen de PRL, sino también la liberación de esta hormona por explantes hipotalámicos (DeVito 1988a, DeVito y cols, 1987, 1991 y 1992). Por todo ello se decidió investigar si, específicamente en los núcleos PV y SO, los estrógenos juegan algún papel en la expresión del gen de PRL.

En apoyo a un posible efecto estimulador de los estrógenos los niveles del ARN mensajero de PRL se asociaron con el estadio hormonal de los animales. Se detectó una señal aparentemente mayor en las hembras que en los machos y el valor más alto se presentó durante el estro. Estos cambios son similares a aquellos observados en la hipófisis anterior, donde se sabe

que el aumento del ARN mensajero para PRL durante el proestro-estro es determinado por el incremento en estrógenos circulantes que ocurre entre diestro y proestro (Haisenleder y cols, 1989). La posibilidad de que el incremento aparente en el ARN mensajero de PRL observado durante el estro en los núcleos PV y SO hipotalámicos pudiera deberse a una acción estrogénica se apoya en la observación de que el tratamiento con estrógenos también aumenta dicha señal en ambos núcleos de animales ovariectomizados. Estas observaciones apoyan la hipótesis de que los estrógenos incrementan la transcripción del gen de PRL en el sistema hipotálamo-neurohipofisario.

Adicionalmente, en forma consistente con el incremento de su ARN mensajero, estudios llevados a cabo en el laboratorio mostraron que la PRL 23K neurohipofisaria aumenta significativamente durante el proestro y el estro, así como en respuesta al tratamiento con estradiol en los animales ovariectomizados (Torner y cols, 1999). Sin embargo, en contraposición al aumento observado en la PRL nativa, la PRL 14K no mostró un aumento asociado al estadio estral del animal ni al tratamiento con estrógenos (Torner y cols, 1999). Esta discrepancia pudiera deberse a una disminución en la proteólisis de PRL 23K por efecto de los estrógenos. (Torner y cols, 1999). En apoyo a que los estrógenos reduzcan la actividad de las proteasas neurohipofisarias capaces de generar al fragmento amino-terminal de 14 kDa de la PRL se observó que el estándar de PRL 23K es procesado más eficientemente hacia PRL 16K por extractos de neurohipófisis de ratas ovariectomizadas no tratadas con estrógenos que por extractos neurohipofisarios de ratas ovariectomizadas que sí son tratadas con estrógenos (Torner y cols, 1999). Esta aparente regulación estrogénica de la actividad enzimática no resulta del todo inesperada. Se ha observado que la actividad de la catepsina D, una proteasa de aspártico presente en los lisosomas y que ha sido implicada en la proteólisis de PRL hacia PRL 16K (Baldocchi y cols, 1993), es regulada por estrógenos tanto en el útero (Elangovan y Moulton, 1980) como en células tumorales mamarias (Westley y May, 1987). Las implicaciones funcionales de los efectos estrogénicos sobre PRL en el sistema hipotálamo-neurohipofisario son desconocidas.

Si bien los resultados en las hembras ciclantes sugieren la participación de los estrógenos en la regulación de la producción (y posiblemente en la secreción) de las PRLs

neurohipofisiarias, estos efectos podrían ser característicos de una situación fisiológica particular. Ello es porque existen al menos otros dos factores relacionados con los estrógenos que pueden tener una gran influencia en la síntesis de PRLs hipotalámicas y que deben ser tomados en cuenta. Uno es la expresión y control de los receptores a estrógenos (RE) en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario y el otro la presencia de Pit-1 en el mismo sistema.

Los RE existen como dos subtipos; alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$). En el humano ambos receptores muestran un solo sitio de alta afinidad a estradiol (Kuiper y cols, 1997; Kuiper y cols, 1998). El descubrimiento del $RE\beta$ sugirió la existencia de al menos dos vías extra de respuesta a estrógenos: una en tejidos que expresan exclusivamente $RE\beta$ y otra donde se expresan ambos subtipos (Kuiper y Gustafsson, 1997; Petterson y cols, 1997), aunque también existe la posibilidad de que exista una vía de señalización de estrógenos independiente de ambos subtipos de receptores (Das y cols, 2000). Además, dentro de un mismo órgano parece ser frecuente que los subtipos del RE se expresen en diferentes tipos celulares (Byers y cols, 1997; Österlund y cols, 1998; Hrabovszky y cols, 2000), por lo que podrían tener diferentes acciones biológicas. Por ejemplo, en ratones a los que se noqueó la expresión del $RE\beta$, contrariamente a lo que ocurre en ratones con noqueo de $RE\alpha$, tanto machos como hembras presentan comportamiento sexual normal (Ogawa y cols, 1999). Por otra parte, existe regulación diferencial de ambos. Por ejemplo, en el cerebro el estradiol decrementa los niveles de expresión de $RE\alpha$ en el núcleo arcuato, hipotálamo ventromedial y núcleo cortical posterolateral de la amígdala (Österlund y cols, 1998). Con respecto al $RE\beta$ parece ser menos clara la regulación de su expresión, pues estradiol incrementa sus niveles en el núcleo arcuato (Österlund y cols, 1998), pero los reduce en el núcleo PV (Patisaul y cols, 1999). Además, estudios sobre la conformación de $ER\alpha$ y $ER\beta$ mostraron que ligandos diferentes tienen efectos diferentes sobre la conformación de ambos receptores (van den Bemd y cols, 1999). Estos pueden influir de manera opuesta tanto en su estabilidad (van den Bemd y cols, 1999) como en sus efectos (Jones y cols, 1999). En resumen, la existencia de diferentes subtipos de RE, sus patrones diferentes de expresión y los factores reguladores presentes en un momento dado serán los que expliquen las diferencias de respuesta a estrógenos entre especies y poblaciones celulares (Kuiper y cols, 1998)

Con respecto a Pit-1, éste es un activador de la expresión de PRL en respuesta a estrógenos que ha sido estudiado principalmente en la adenohipófisis (ver Ben-Jonathan y cols, 1996) y cuyo ARN mensajero ha sido detectado sólo en núcleos PV de ratas en estro. Sin embargo, la estimulación e inhibición de la síntesis de PRL es diferente en cada tejido donde ésta se expresa (Revisar Ben-Jonathan y cols. 1996) y los estudios de la interacción de Pit-1 con el receptor a estrógenos se han realizado normalmente con el RE α , siendo que en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario de roedores y monos parece no haber expresión de este receptor, sino de la forma beta del mismo (Österlund y cols, 1998; Alves y cols, 1998; Gundlach y cols, 2000). Por otra parte, la interacción de Pit-1 con el receptor a estrógenos depende también de otros factores proteicos, que pueden ser activadores e inhibidores, e incluso entre los de un mismo tipo competir por el sitio de unión al receptor a estrógenos (Ying y Lin, 2000). Finalmente, aunque los estrógenos y Pit-1 normalmente incrementan la expresión del gen de PRL, ésta puede ocurrir en ausencia de ambos (Gellersen y cols, 1994; Gellersen y cols, 1995) y sitios amplificadores diferentes pueden dar respuestas diferentes al mismo complejo agonista-receptor (Paech y cols, 1997). Esta serie de hallazgos resalta la importancia de determinar no sólo qué tipo de estímulos pueden influenciar tanto la síntesis como la liberación de PRLs neurohipofisarias, sino también de determinar en qué tipo de situaciones lo hacen.

Ahora bien, el sistema hipotálamo-neurohipofisiario se encuentra constituido casi en su totalidad por dos poblaciones celulares: neuronas magnocelulares de tipo vasopresinérgico, y neuronas magnocelulares de tipo oxitocinérgico (Hatton, 1990). Adicionalmente, se ha descrito una tercera población de neuronas magnocelulares capaces de sintetizar tanto VP como OT. Esta población representa el 2-3% del total, aunque se incrementa considerablemente bajo distintos estadios fisiológicos como la lactancia (Mezey y Kiss, 1991). La pregunta al inicio de esta tesis fue: ¿cuáles de estas neuronas sintetizan PRL? En estudios previos se intentó responder esta pregunta a través del análisis de la distribución de las células inmunorreactivas a PRL 16K, VP y OT en cortes secuenciales de los núcleos SO y PV del hipotálamo (Mejia, 1996). La determinación de la distribución de las neuronas inmunorreactivas a VP y OT concuerda con la reportada (Rhodes y cols, 1981; Hatton, 1990) y nos muestra, al compararla con la distribución de neuronas inmunorreactivas a PRL 16K, que estas últimas siguen un patrón equivalente al de las células vasopresinérgicas a lo largo de todo el hipotálamo. Por lo tanto, estos estudios

sugirieron que las PRLs podrían estar colocalizadas con VP en las mismas neuronas magnocelulares hipotalámicas. En esta tesis ampliamos y apoyamos esta conclusión mediante estudios de doble inmunocitoquímica. El uso simultáneo de anticuerpos anti-PRL 16K y anti-VP mostró que tanto en los núcleos PV como en los SO ambas marcas se colocalizan en la mayoría de las neuronas observadas. La colocalización de PRL 16K con VP en las mismas células podría implicar tanto mecanismos comunes de regulación de la producción de ambas hormonas como efectos comunes y/o coordinados para las dos.

Con respecto a los receptores a PRL, tanto éstos como PRL pueden ser detectados en varias regiones cerebrales (consultar las revisiones de Ben-Jonathan y cols, 1996 y de Bole-Feysot y cols, 1998). Sin embargo, y como ya se mencionó, el consenso general con respecto a PRL es de que sólo existen cuerpos neuronales inmunorreactivos a ésta en el hipotálamo. Esto sugiere la posibilidad de que PRL sea expresada en éste y de ahí sea distribuída a diferentes regiones del cerebro, cerebelo y médula espinal, donde podría tener funciones locales mediadas por sus receptores. Una posibilidad adicional surge de la detección continua del receptor a PRL en el plexo coroides (Walsh y cols, 1987; Roky y cols, 1996; Pi y Grattan, 1998a), donde incluso parece sintetizarse en cantidades mucho mayores con respecto a otras regiones cerebrales (Nagano y Kelly, 1994). Como también ya se mencionó, ya se ha demostrado que PRL puede alcanzar el plexo coroides por transporte retrógrado desde la adenohipófisis y pasar de aquél al tejido nervioso (Walsh y cols, 1987; Mangurian y cols, 1992). De esta manera, tanto PRLs de origen nervioso como de origen hipofisiario (o una combinación de ellas) podrían estar afectando la fisiología cerebral.

La expresión de PRL en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario y, en particular en los núcleos PV y SO, nos hace preguntarnos si dicha hormona podría tener funciones locales en esta parte del sistema nervioso central. Evidencias de apoyo a acciones locales de la PRL son el que tanto los receptores a PRL (Roky y cols, 1996; Pi y Grattan, 1998a) como sinapsis inmunorreactivas a PRL (Nishizuka y cols, 1990) han sido detectadas en el hipotálamo de la rata, incluidos los núcleos PV y SO. Como parte de esta tesis se realizaron ensayos de fluorescencia con un anticuerpo anti-receptor a PRL que corroboraron reportes anteriores en donde se describe su presencia en somas neuronales de los núcleos PV y SO (Roky y cols, 1996). Experimentos de

doble inmunofluorescencia mostraron que la gran mayoría de las neuronas vasopresinérgicas colocalizan al receptor de PRL. No se pudieron apreciar neuronas que solamente reaccionaran con el anticuerpo anti-VP y no con el anti-receptor de PRL. En cambio, la población oxitocinérgica parece estar dividida en dos subpoblaciones: una con inmunorreactividad tipo receptor a PRL y otra que no la presenta. Cabría preguntarse si la distribución de ambas subpoblaciones sigue algún patrón determinado o si ambas se encuentran mezcladas al azar. Debido a la influencia de OT y PRL en la reproducción, también habría que preguntarse si estas subpoblaciones varían dependiendo del estado hormonal del animal, sobre todo entre ratas hembras (en sus diferentes estadios del ciclo estral), hembras ovariectomizadas, hembras en diferentes estados de gestación y hembras lactantes.

Una variable que también se debe tomar en cuenta es la existencia de la forma corta y larga del receptor a PRL en el hipotálamo de la rata (Ouhtit y cols, 1993). Su distribución en diferentes poblaciones celulares no necesariamente es igual, ya que se sabe que la proporción de dichas isoformas varía de núcleo a núcleo (Ouhtit y cols, 1993). En el hipotálamo existe una mayor proporción de la forma corta del receptor en el plexo coroides, núcleo PV y núcleo SO, mientras que la forma larga del receptor predomina en el núcleo arcuato, periventricular hipotalámico, área preóptica y núcleo supraquiasmático (Pi y Grattan, 1998b). Si bien sólo la forma larga del receptor a PRL es capaz de activar las cascadas de señalización intracelulares descritas para PRL (Lesueur y cols, 1991; O'Neal y Yu-Lee, 1994), no se descarta el que la interacción de PRL con la isoforma corta del receptor presente en el hipotálamo produzca posibles respuestas fisiológicas a través de cascadas alternativas de transducción de señales. De hecho, es posible que las diferencias de proporción de ambos receptores entre los núcleos les permita a éstos responder de diferentes formas a un mismo estímulo. Por ejemplo, se ha observado en ratas macho que el contacto con crías induce conducta materna y que ésta se asocia tanto con el aumento de la concentración de PRL sérica como de la expresión del ARN mensajero de su receptor largo, pero no del corto, en el hipotálamo (Sakaguchi y cols, 1996).

Dado que los receptores a PRL se expresan en neuronas del sistema hipotálamo-neurohipofisario se decidió explorar la posibilidad de que PRL tenga acciones locales en éste. Para ello y, dada la colocalización de PRL y su receptor en neuronas vasopresinérgicas, se

decidió evaluar un posible efecto de las PRLs sobre la liberación de VP por explantes de este sistema incubados *in vitro*. En estos experimentos se decidió utilizar a las PRLs completa de 23K y a la PRL 16K. La PRL 23K se encuentra presente en el sistema hipotálamo-neurohipofisario y es la variante utilizada siempre como ejemplo de la interacción de PRL con sus receptores clásicos (para una revisión consultar Bole-Feysot y cols, 1998). La PRL 14K es la isoforma más abundante en el sistema hipotálamo-neurohipofisario y comparte determinantes antigénicos y biológicos con la PRL 16K (Clapp y cols, 1994; López-Gómez y cols, 1995; Mejía y cols, 1997). En ausencia de una preparación pura de PRL 14K se utilizó a la PRL 16K.

Contrariamente a la funcionalidad de nueve días de los explantes hipotálamo-neurohipofisarios observada por el grupo de Sladek (Sladek y Knigge, 1977; Sladek y Joynt, 1979b), nuestros explantes mostraron ser responsivos a diferentes estímulos hasta un máximo de tres días después de obtenidos. Una posible razón para explicar las diferencias es la extensión de la región abarcada por el explante. En el caso de los experimentos de Sladek se eliminaron los núcleos PV y sólo se obtuvo el fragmento hipotalámico correspondiente a los núcleos SO, eminencia media e hipófisis posterior. En nuestro caso decidimos obtener la región correspondiente a ambos núcleos para tener el sistema hipotálamo-neurohipofisario lo más completo posible. Sin embargo, esto aumenta el tamaño del explante y hace más difícil el intercambio de gases y nutrientes *in vitro*, lo cuál podría reflejarse en una menor funcionalidad del tejido en incubación.

También fue evaluada la viabilidad de los explantes, que fue considerada como (a) su capacidad para liberar VP de manera estable durante varios periodos de incubación consecutivos y (b) su capacidad de responder a un estímulo secretor de VP. Se observó que la mejor reproducibilidad en cuanto a liberación de VP al medio de incubación se obtenía en aquellos tejidos incubados por 24-48 h. En vista de este resultado decidimos utilizar explantes obtenidos 24 h antes del experimento. En esta parte de nuestros estudios se observó que, al igual que con el grupo de Sladek (Sladek y Knigge, 1977), durante la incubación de neurohipófisis aisladas ocurre una liberación masiva de VP y su consecuente depleción en pocas horas. Esta liberación ocurre de manera tan rápida que no permite evaluar el posible efecto de PRL u otros moduladores de la liberación de VP sobre las terminales neurohipofisarias. Cabe recordar que el

hecho de no haber detectado inmunorreactividad tipo receptor a PRL en la neurohipófisis no implica su ausencia, debido a que esta técnica no tiene la sensibilidad necesaria para detectar bajas concentraciones de antígenos.

El establecimiento de la funcionalidad del método incluyó el uso de AII y una alta concentración de potasio (K^+ 56 mM). AII es un secretagogo de esta hormona (Sladek y Joint, 1980), mientras que el K^+ en altas concentraciones provoca la despolarización de la membrana y la consecuente liberación de productos de secreción, incluida la VP. En nuestro laboratorio la respuesta del explante a AII es menor a estudios reportados, donde se muestran dosis efectivas para la liberación de VP tan bajas como 10 nM (Sladek y Joynt, 1979a). Igualmente, la magnitud del efecto es menor en nuestras manos, ya que mientras nuestros explantes aumentan la liberación de VP al doble del basal en presencia de una concentración 10 mM de AII, Sladek obtiene un aumento en la liberación de VP cuatro veces mayor al basal con la misma dosis (Sladek y Joynt, 1979a). Como ya se mencionó, una razón posible para explicar esta disminución en la funcionalidad del explante podría estar dada por el tamaño del mismo. A pesar de ello, la constancia de la liberación basal de VP y la reproducibilidad de su comportamiento en presencia de ambos estímulos nos indicó que los explantes eran viables y podían responder a factores externos.

Tanto PRL 23K como PRL 16K estimularon de manera dependiente de la dosis la liberación de VP al medio de incubación. Consideramos que sería muy aventurado calcular una EC50 basándonos en nuestros datos debido a dos factores: (a) consideramos que los puntos en las curvas dosis-respuesta que tenemos no son suficientes para hacer un análisis confiable de ellas, y; (b) se necesitaría probar dosis más altas de ambas PRLs para garantizar que se ha alcanzado la saturación del efecto. Al menos en el caso de PRL 23K, se esperaría que la exposición de los explantes a concentraciones más altas de la misma produjeran el efecto campana típico de esta hormona (consultar Sinha, 1995). Las dosis máximas de PRL utilizadas (alrededor de 0.5 μ M para ambas) aumentan la liberación de VP poco más de un 50%. Este efecto es similar al producido por AII en concentraciones semejantes en nuestros experimentos. Aquí cabe señalar que es probable que las concentraciones reales de ambas PRLs estén siendo sobreestimadas dada la producción local que se presenta en el sistema. Por otra parte y contrario

a estos resultados, el grupo de Sladek, utilizando dosis equivalentes a las usadas por nosotros, mostró que PRL no tiene efecto sobre la secreción de VP por explantes hipotálamo-neurohipofisarios de ratas lactantes (Ghosh y Sladek, 1995). Desconocemos las razones de la disparidad entre los resultados. Al respecto podríamos especular diferencias asociadas al estadio fisiológico o a la naturaleza del implante. Por ejemplo, es posible que durante la lactancia el sistema hipotálamo-neurohipofisario pudiese estar produciendo y liberando una mayor cantidad de PRL bioactiva que al ocupar sus receptores saturaría el efecto e impediría la detección de alguna acción debida a PRLs exógenas. Adicionalmente, los explantes del grupo de Sladek carecen del núcleo PV. Podría ser que el efecto de la PRL se manifestara preferentemente sobre las neuronas de dicho núcleo. Para evaluar estas posibilidades sería necesario, primero, validar esta observación en nuestros explantes. Habiendo corroborado esta observación, podría intentarse bloquear la secreción de VP con el uso de anticuerpos dirigidos contra PRL.

Es de llamar la atención el hecho de que la magnitud del efecto observado sobre la liberación de VP sea semejante para las dos formas de PRL utilizadas en estos estudios. La teoría aceptada actualmente propone que la PRL 23K activa a sus receptores a través de inducir su dimerización, y que esto ocurre en forma secuencial. Inicialmente la PRL se une a un receptor a través de una región en su molécula denominada sitio 1. Posteriormente otra región de la hormona (sitio 2) interacciona con un segundo receptor, provocando la homodimerización del mismo (Bole-Feysot y cols, 1998). De acuerdo a esta teoría la PRL 16K, al estar provista únicamente del sitio 1 de unión al receptor, no podría comportarse como un agonista completo de éste, sino que lo haría como un agonista parcial o un antagonista de PRL 23K. En apoyo a que PRL 16K pudiese comportarse como un agonista parcial se ha observado que tanto ésta como la PRL 14K son capaces de estimular la proliferación de células Nb2 (López-Gómez y cols, 1995). Esta observación podría apoyar la posibilidad de que la activación parcial del receptor a PRL sea suficiente para activar a su vez las cascadas de señalización asociadas a la liberación de VP en el sistema hipotálamo-neurohipofisario. Alternativamente, aparte de los receptores clásicos a PRL 23K, se han descrito en riñón, cerebro e hígado sitios de unión a PRL 16K que son específicos, saturables y de alta afinidad (Clapp y cols, 1989), y que podrían representar receptores propios a este fragmento de PRL. Estos probables receptores se han detectado también en el endotelio vascular (Clapp y Weiner, 1992). La presencia de receptores específicos para PRL 16K en el

sistema hipotálamo-neurohipofisiario implicaría que el efecto de este fragmento sobre la liberación de VP pudiese incluir acciones tanto vía receptores clásicos a PRL como vía receptores propios. La adición de ambos efectos podría redundar en una acción equivalente a la de la PRL íntegra.

Cabe también especular acerca de la localización del efecto autócrino de ambas PRLs. Si bien no se lograron detectar los receptores de PRL en la neurohipófisis, no se puede descartar su presencia en este tejido. Esto es debido a que las técnicas inmunocitoquímicas no tienen la sensibilidad suficiente para detectar bajas concentraciones de antígenos. La señal de la marca del anticuerpo monoclonal, si bien es clara también es débil. Dado que el 80% de los receptores de PRL se localizan en el aparato de Golgi de las células detectadas (Bole-Feysot y cols, 1998), no es de sorprender que su detección por un anticuerpo poco sensible se aprecie en el soma neuronal y no en sus proyecciones nerviosas. Estudios posteriores permitirán determinar si el efecto autócrino de estas PRLs es producido sobre las terminales neurohipofisiarias, los cuerpos neuronales vasopresinérgicos o en ambos. Una parte de estos estudios podría comprender la evaluación de la presencia de receptores a PRL en la neurohipófisis con ayuda de la microscopía electrónica, la cuál permite detectar antígenos que se encuentran en concentraciones menores a las que detecta la microscopía de luz visible.

Por otra parte, debemos recordar que, aunque normalmente se asume que las neuronas magnocelulares de los núcleos PV y SO proyectan sus terminales a la neurohipófisis, esta no es la realidad completa. Hay una gran cantidad de proyecciones que se originan en estos núcleos, que terminan en el sistema portal hipofisiario, y que mediante su liberación a este nivel pueden influir en la síntesis y secreción de hormonas adenohipofisiarias (ver por ejemplo Jacobowitz, 1988) También se ha observado la presencia de ambos nonapéptidos en el medio de perfusión del área de los núcleos PV y SO, lo que implica su liberación local (Renaud y Bourque, 1991). Y, por si fuera poco, existen una gran cantidad de proyecciones que se originan en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario y que se dirigen hacia otras regiones del sistema nervioso, como por ejemplo el hipotálamo lateral, tallo cerebral o la médula espinal (Hatton, 1990) El uso de explantes donde se presume se encuentra el sistema hipotálamo-neurohipofisiario completo no permite saber si la liberación, tanto basal como estimulada de VP, ocurre solamente al nivel de

las terminales neurohipofisiarias o también, por ejemplo, al nivel de la eminencia media en el sistema portal hipofisiario.

Además, la inclusión de un grupo neuronal en un núcleo cerebral es una herramienta arbitraria que se utiliza para facilitar los estudios que se hacen en el SNC y no implica el tener una población homogénea dentro de un cierto núcleo. Un ejemplo interesante acerca de la posibilidad de que existan diferentes respuestas a un mismo estímulo en un mismo núcleo lo presenta el siguiente resultado: en ratas ovariectomizadas, altas dosis de triiodotironina elevan los niveles de ARN mensajero para OT en el núcleo PV, mientras que tratamiento con estradiol no tiene efecto. Cuando a estos animales además de ovariectomizarlos se les tiroidectomizó los niveles de ARN mensajero para OT se elevaron dramáticamente en presencia de estrógenos. Si a estos últimos se les administra tanto triiodotironina como estrógenos los niveles de RNA mensajero para OT no se elevan. Por tanto, triiodotironina interfiere con la inducción estrogénica de la expresión de OT. Sin embargo, se observó que subdivisiones particulares de los núcleos PV respondían de manera diferente a este tipo de tratamiento, especialmente la región anteroventral y ventromedial de la subdivisión parvicelular de los núcleos PV (Dellovade y cols, 1999). ¿Por qué resulta tan interesante este ejemplo? Primero que nada es una demostración clara de que el estímulo de la expresión de una hormona en un tejido no depende de un solo factor, sino de una serie de ellos. Segundo, y más importante para nosotros, nos recuerda que un tejido consiste de poblaciones heterogéneas. Normalmente tendemos a considerar a los núcleos PV y SO como una unidad compuesta de dos tipos celulares principales que responden de manera semejante a los mismos estímulos. Como ya se mencionó anteriormente y se demuestra en estos experimentos del grupo de Pfaff (Dellovade y cols, 1999), este no es el caso. Las poblaciones de un núcleo cerebral pueden ser y son heterogéneas.

En nuestro caso, resultaría interesante saber si el estímulo de PRL sobre liberación de VP es general o si influye de manera preferencial en algún subgrupo de neuronas o de terminales vasopresinérgicas. Nosotros observamos la estimulación de la liberación de VP en presencia de PRL. El grupo de Sladek ha observado en explantes del sistema hipotálamo-neurohipofisiario de ratas lactantes que PRL no tiene efecto ni sobre la liberación ni sobre la expresión de VP (Ghosh y Sladek, 1995). En el caso de ellos se utilizan explantes de los que se han eliminado los núcleos

PV. ¿Es posible que las diferencias entre sus resultados y los nuestros sean debidas a una respuesta diferente por parte de los núcleos PV y los SO? Si es así, ¿cómo responde cada subgrupo celular a este estímulo? ¿y qué otros factores están influyendo en estos resultados? ¿influye el estado hormonal del animal antes del sacrificio, la ausencia de otros estímulos hormonales, la ausencia de otros núcleos hipotalámicos, concentración o depleción de metabolitos, etc? El campo es muy amplio y las posibilidades casi infinitas. Sólo estudios en condiciones más controladas y que traten de evaluar el conjunto y no por separado los factores que influyen en la síntesis y liberación de VP u OT podrán darnos una idea clara de los procesos que se llevan a cabo en el sistema hipotálamo-neurohipofisario.

CONCLUSIONES

En conclusión, los resultados de esta tesis son consistentes con el que:

1. Los estrógenos estimulan la expresión del ARN mensajero de PRL en los núcleos PV y SO del hipotálamo.
2. Tanto PRL como su receptor se encuentran localizados en neuronas vasopresinérgicas del sistema hipotálamo-neurohipofisiario. El receptor de PRL parece estar presente en la mayor parte de las neuronas vasopresinérgicas y solamente en una subpoblación de las oxitocinérgicas.
3. La PRL 23K y su fragmento amino-terminal de 16 kDa estimulan la secreción de VP por explantes hipotálamo-neurohipofisiarios *in vitro*. El efecto de ambas PRLs es dependiente de la dosis y es comparable en magnitud al reportado para la AII.

En resumen, los hallazgos de este trabajo confirman evidencias previas sobre la expresión de PRL en neuronas magnocelulares del sistema hipotálamo-neurohipofisiario, y apoyan posibles efectos locales de variantes moleculares de esta hormona sobre dicho sistema. En particular, los resultados obtenidos sugieren efectos autócrinos de las PRLs neurohipofisiarias sobre la secreción de VP. Dado que los estrógenos estimulan la expresión de la PRL neurohipofisiaria, este efecto estimulador podría tener relevancia particular en condiciones fisiológicas asociadas al aumento de los estrógenos circulantes.

APENDICES

Prolactina

El gen que codifica para la prolactina (PRL) es transcrito y traducido, dependiendo de la especie, a una proteína constituida por 197-199 aminoácidos que posee un peso molecular aproximado de 23 kDa (PRL 23K). La estructura terciaria de esta molécula es mantenida por 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 dos asas pequeñas terminales y un asa grande intermedia (Parlow y Shome, 1976).

Sin embargo, esta hormona existe como una familia de variantes moleculares que son, en su mayor parte, producto de modificaciones postraduccionales de la PRL 23K, que es la forma molecular predominante (Sinha, 1992). Entre dichas variantes se encuentran formas de diversos pesos moleculares (Aston y cols, 1984; Bollengier y cols, 1989; Cole y cols, 1991; Sinha, 1992; Sinha y Gilligan, 1984), variantes glicosiladas (Bollengier y cols, 1989; Lewis y cols, 1985; Sinha y Jacobsen, 1987), fosforiladas (Brooks y cols, 1994; Wang y Walker, 1993), desamidadas (Graf y cols, 1970; Nyberg y cols, 1980) y formas proteolíticamente modificadas. Entre estas últimas se ha identificado una variante con cortes en el asa mayor entre los aminoácidos 145 y 149, o prolactina cortada (Baldozzi y cols, 1993; Mitra, 1980a y 1980b; Wong y cols, 1986). La reducción del puente disulfuro intermedio rompe a esta PRL cortada en un fragmento amino-terminal de 16 kDa (PRL 16K) y en un fragmento carboxilo terminal de 6 kDa (PRL 6k)

A la PRL se le han atribuido un gran número de acciones biológicas, incluidas en 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 y 1980). De estas acciones, no todas se encuentran representadas o tienen la misma importancia para todos los tipos de vertebrados. 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 y 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, γ -lactoglobulina, transferrina, etc.), sino también de las enzimas involucradas en la síntesis de componentes de la leche 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 Freeman, 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 (Shiu y Friesen, 1980). Este efecto, aunado a acciones sobre la proliferación de células del sistema inmune en la leche, son parte de las acciones inmunomoduladoras de la PRL durante la lactancia (Shiu y Friesen, 1980).

La PRL ejerce además efectos conductuales que influyen sobre la lactancia. Por ejemplo su presencia, en conjunto con las hormonas ováricas, es indispensable para la inducción de la conducta materna en varias especies de vertebrados (Meites, 1988), incluidos los mamíferos (Lucas y cols, 1998). 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), incluyendo también a los mamíferos (Bridges y cols, 1997)

La fuente principal de producción de PRL y algunas de sus variantes moleculares es la hipófisis anterior o adenohipófisis (ver Sinha, 1995). En ella, las células secretoras de PRL o lactotropos, se encuentran distribuidas en forma relativamente homogénea, 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 cols, 1986). Normalmente se considera que los lactotropos constituyen un 40-50% de las células adenohipofisarias (Tougard y Tixier-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 (estrógenos y otras hormonas esteroidales, etc.) como por estímulos exógenos (estimulación del cérvix uterino, succión de las crías durante la lactancia, etc.).

Se ha observado que tanto el número de lactotropos como la concentración adenohipofisaria 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 esta hormona siguen un patrón determinado. En la rata este patrón se caracteriza por un aumento marcado de la PRL circulante en la tarde y la noche del proestro, que se correlaciona con un aumento previo en los niveles circulantes de estrógenos (Neill, 1974).

El lactotropo, como ya se dijo, es el sitio principal de síntesis de PRL. Sin embargo, existen diversas fuentes extrahipofisarias de PRL, entre las que se encuentran los linfocitos, el estroma del endometrio decidual, el miometrio uterino, la glándula mamaria y el tejido nervioso (Nicoll, 1980). Por ejemplo, en el estroma del endometrio decidual y en el miometrio uterino se han detectado moléculas con bioactividad tipo PRL que comparten con ella características inmunocitoquímicas (Gellersen y cols, 1991; Golander y cols, 1978), además de que expresan el ARN mensajero de la PRL (Takahashi y cols, 1984). En el sistema inmune, el gen de la PRL es expresado en esplenocitos, linfocitos y monocitos (Gagnerault, 1993; Montgomery y cols, 1987, 1990 y 1992) en forma de variantes que difieren entre sí principalmente en su peso molecular (Baglia y cols, 1991; Di Matia y cols, 1988, Montgomery y cols, 1990 y 1992) y que podrían

tener acciones autócrinas y parácrinas sobre estas células (Gala, 1991), ya que las mismas contienen el receptor de PRL (Matera y cols, 2000).

Otro sitio donde se ha reportado consistentemente la presencia de PRL es el tejido nervioso. Estudios de inmunocitoquímica han localizado antígenos tipo PRL principalmente en las neuronas y tractos nerviosos del hipotálamo (Fuxe y cols, 1976; Harlan y cols, 1989; Nishizuka y cols, 1990; Paut-Pagano y cols, 1993; Shivers y cols, 1989; Siaud y cols, 1989; Thompson, 1982; Toubreau y cols, 1979), aunque también mediante Western Blots se ha encontrado PRL en homogenizados de médula espinal, tallo cerebral y en el líquido cefalorraquídeo de la rata (DeVito, 1988a, 1988b y 1989; Emanuele y cols, 1986, 1987 y 1989). Además, se ha demostrado que el material inmunorreactivo obtenido del fraccionamiento cromatográfico de las distintas áreas cerebrales posee efectos mitogénicos en bioensayos específicos para esta hormona (Emanuele y cols, 1986, 1987 y 1989). Estos hallazgos han sido apoyados tanto por la determinación de la existencia del ARN mensajero para esta hormona en el hipotálamo como por el análisis de mapas de digestión triptica de las moléculas tipo PRL involucradas. Más recientemente, en nuestro laboratorio hemos encontrado que la inmunoreactividad tipo PRL se asocia principalmente a dos proteínas (de 23 y 14 kDa) en las neuronas vasopresinérgicas magnocelulares.

¿Cuál es la función de la PRL en el sistema nervioso central? Al parecer puede tener funciones específicas en éste, pues se ha sugerido que podría ser la responsable tanto de inhibir la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (Azad y cols, 1990) como de estimular la proliferación de células gliales en cultivo (DeVito y cols, 1993a y 1993b). Sin embargo, es posible que no sean éstas sus únicas funciones. Candidatos adicionales incluyen acciones centrales sobre la regulación de la concentración iónica de los fluidos corporales, efecto regulado por el hipotálamo y donde diversas evidencias apuntan a la PRL (revisado por Pfaff y cols, 1994).

Sistema Hipotálamo-neurohipofisiario

El hipotálamo se encuentra formado por dos tipos de neuronas: el primero incluye a aquellas con las características propias de células nerviosas y que se encuentran involucradas en la recepción, integración, conducción y transmisión sináptica de mensajes. Adicionalmente a dichas características neuronales clásicas, las neuronas que componen al segundo grupo tienen propiedades de células endócrinas: éstas 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 (Reichlin, 1992). Sin embargo, también forman parte de este sistema los núcleos accesorios magnocelulares 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 NPV y los NSO (donde generalmente se asocian a vénulas [Cunningham y Sawchenko, 1991; Silverman y Zimmerman, 1983]). Estos núcleos accesorios, en conjunto, pueden contribuir hasta con el 50% de las neuronas que proyectan hacia la neurohipófisis (Cunningham y Sawchenko, 1991; Silverman y Zimmerman, 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 concentrados por el aparato de Golgi en gránulos secretorios, los cuales son transportados a la terminal del axón (Bean y cols, 1994). En las terminales neurohipofisarias se encuentran frecuentemente engrosamientos, conocidos como cuerpos de Herring, que miden de 10 a 20 μm y acumulan este tipo de gránulos, 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 son vertidos a la circulación sistémica (Baulieu y Kelly, 1990; Reichlin, 1992).

Vasopresina y Oxitocina.

Las principales hormonas que son liberadas por el lóbulo neural hipofisario son clasificadas como de propiedades antidiuréticas (conservadoras de agua) u oxitócicas (contractoras del útero). Tanto vasopresina (VP) como 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 acciones fisiológicas más conocidas de la VP son el control de la excreción de agua por el riñón y la regulación de la presión arterial, lo que la hace jugar un papel importante en la regulación de la presión osmótica de los fluidos extracelulares. Por otra parte, las acciones fisiológicas mejor conocidas de la OT son la contracción de las células mioepiteliales de la glándula mamaria (que determinan la evacuación de 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: la hormona (que en ambos casos corresponde a un nonapéptido 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, pues estas hormonas difieren sólo por los aminoácidos de sus posiciones tres y ocho. Esto se ha sugerido como una de

las razones de que, a altas concentraciones, cada una de ellas sea capaz de producir los efectos característicos de la otra (Jard, 1990).

Hasta el momento se han identificado dos tipos de VP en los mamíferos. El tipo más abundante es la arginina vasopresina (con una arginina en la posición 8), mientras que en el cerdo y otras especies de esa familia la forma predominante 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 y por neuronas de tipo parvicelular (de menos de 20 μm) que se localizan principalmente en el núcleo supraquiasmático, el núcleo paraventricular 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 de 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).

Normalmente se considera que VP y 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 lo largo de los núcleos PV y SO (Rhodes y cols, 1981). En los núcleos SO las primeras ocupan una posición más ventral que las segundas y tienden a colocarse de manera proximal al quiasma óptico. En los núcleos PV, las

neuronas vasopresinérgicas se circunscriben principalmente a la región látero dorsal del núcleo y ocupan un área menor que las oxitocinérgicas, que se encuentran principalmente en la región medial y hacia la periferia del núcleo (Cunningham y Sawchenko, 1991; Rhodes y cols, 1981).

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 V_2 , que se ha identificado sólo en los túbulos renales y que se acopla al sistema de la adenilato ciclasa, y; el V_1 , que fue descrito en hígado y el músculo liso de los vasos sanguíneos, y que parece acoplarse al sistema de fosfoinosítidos/ Ca^{2+} (Jard, 1990). Los receptores para OT han sido caracterizados en el músculo uterino y la glándula mamaria, encontrándose que funcionalmente son homólogos al tipo V_1 de los receptores a VP (Jard, 1990). Como ya se mencionó, los receptores para uno de estos mensajeros son capaces de reconocer, aunque 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 (de forma parácrina y/o autócrina) en el sistema nervioso central y, en particular, en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario (Sawchenko y cols, 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 el medio de perfusión del área de los núcleos PV y SO, lo que implica su posible liberación local (Renaud y Bourque, 1991).

Prolactina y Otros Péptidos en el Sistema Hipotálamo-neurohipofisiario.

Hoy en día es ampliamente aceptado que las neuronas pertenecientes al sistema hipotálamo-neurohipofisiario contienen una gran variedad de péptidos bioactivos que coexisten con VP y/o OT. La gran mayoría de estos péptidos han sido localizados por métodos inmunocitoquímicos, casi siempre en tejido de animales tratados de forma previa con colchicina. Debido a que este agente inhibe el transporte axonal, se ha asumido que de esta forma se puede

evaluar la capacidad de una neurona para sintetizar un antígeno dado debido a que les permite acumularse en el soma celular y poder así ser detectados de forma inmunocitoquímica. Sin embargo, esto ha despertado controversia alrededor de la detección de muchos antígenos, pues se ha sugerido que el tratamiento con colchicina causa estrés *per se* en el animal, y éste es un modulador importante de la expresión génica en este sistema (Cortés y cols, 1990). Independientemente de la forma en que se haya encontrado cada uno de los péptidos descritos, los índices de expresión basal de éstos tanto en axones como en terminales nerviosas son generalmente bajos. El contenido de péptidos colocalizados en la hipófisis posterior se encuentra en un intervalo de dos a cuatro órdenes de magnitud menores a los de cualquier hormona nonapeptídica (Brownstein y Mezey, 1986), haciendo improbable que cualquiera de ellos actúe a su vez como una hormona. Es por ello que se ha propuesto que puedan ser reguladores autócrinos o parácrinos de la liberación de VP y OT (Cunningham y Sawchenko, 1991; Sawchenko y cols, 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 al nivel de microscopía de luz, la colocalización de OT con met-enkefalina en las terminales nerviosas neurohipofisarias. En cambio VP se encuentra colocalizada, aunque no siempre, con leu-enkefalina en sus terminales nerviosas. 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 leu- y met-enkefalina sea el inhibir la secreción de OT al nivel de las terminales nerviosas se mostró que la segunda reduce la secreción de OT al medio de incubación de explantes neurohipofisarios (Leng y cols, 1994). Además de estos opioides, se han identificado en uno u otro tipo de las neuronas del SHN una gran cantidad de péptidos, de los cuáles se muestran algunos de los ejemplos más representativos en la tabla 1. Entre estos péptidos se encuentra PRL, descrita en nuestro laboratorio como perteneciente a los péptidos expresados por las neuronas vasopresinérgicas magnocelulares hipotalámicas (Clapp y cols, 1994; López-Gómez y cols, 1995; Torner y cols, 1995; Mejía y cols, 1997). Esta hormona, aunque había sido encontrada repetidamente en el hipotálamo, no había sido asociada con el sistema hipotálamo-neurohipofisario (DeVito y cols, 1987; Emanuele y cols, 1986; Siaud y cols, 1989; Thompson, 1982; Toubeau y cols, 1979). Su presencia en éste,

sin embargo, no resulta del todo sorprendente, ya que se asocia con funciones de balance osmótico tanto en leche como en fluido amniótico. Estas funciones podrían ser controladas a nivel hipotalámico, ya que es precisamente éste, y sobre todo VP, quién se encarga de la regulación del equilibrio osmótico del organismo en general.

Aunque cada vez es mayor la cantidad no sólo de hormonas peptídicas, sino también de precursores de neurotransmisores descritos en este sistema, la mayoría de los estudios realizados se limitan a describir la existencia de estos mensajeros. En la mayoría de los casos no se sabe de estudios que hayan sido realizados para determinar las posibles implicaciones de cada una de

Colocaliza con

VP y OT

Péptidos derivados de prodinorfina
Péptido tipo glucagon I
Galanina
Dinorfina

VP

Leu-encefalina
Angiotensina II
Péptido intestinal vasoactivo
Péptido histidina-isoleucina
Prolactina

OT

Met-encefalina
Colecistoquinina
Hormona liberadora de tiotropinas
Factor liberador de corticotropina

Tabla 1. Ejemplos de sustancias colocalizadas en neuronas neuroendocrinas del sistema hipotálamo-neurohipofisiario (Tomado de Grifford y cols, 1994; Meister, 1993; Sawchenko y cols, 1992; Silverman y Zimmerman, 1983, y; Villar y cols, 1990).

estas moléculas en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario. En parte, esto es debido a la dificultad que se presenta al tratar de estudiar el efecto de una hormona en un sistema tan complejo y que no puede ser aislado de manera adecuada. Es por ello que en la mayoría de los estudios realizados ha sido necesario limitarse al uso de técnicas inmunocitoquímicas, exposición directa *in vivo* a diferentes hormonas y neurotransmisores y cultivo de explantes del sistema. Sin embargo, a pesar de estas limitantes, poco a poco se comienza a dilucidar el papel que pueden jugar en la fisiología general del organismo cada uno de estos mensajeros químicos.

BIBLIOGRAFIA

- Alves, S.E., López, V., McEwen, B.S. y Weiland, N.G. (1998) Differential colocalization of estrogen receptor β (ER β) with oxytocin and vasopressin in the paraventricular and supraoptic nuclei of the female rat brain. An immunocytochemical study. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**; 3281.
- Aston, R., Young, K., van den Berg, H. e Ivanyi, J. (1984) Identification of *M*₁ 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.
- Bakowska, J.C. y Morrell, J.I. (1997) Atlas of the neurons that express mRNA for the long form of the prolactin receptor in the forebrain of the female rat. *J. Comp. Neurol.* **386**; 161.
- Baldocchi, R.A., Tan, L., King, D.S. y Nicoll, C.S. (1993) Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin; evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* **133**; 935.
- Baulieu, E.-E. y Kelly, P.A. Eds. (1990) *En Hormones, From molecules to disease*, Hermann Publishers in Arts and Science, Paris, Francia.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J.L., Allen, D.L. y Steinmetz, R.W. (1996) Extrapituitary prolactin; distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews* **17**; 639.
- Bean, A.J., Zhang, X. y Hokfelt, T. (1994) Peptide secretion: what do we know? *FASEB J.* **8**; 630.
- Bicknell, R.J. (1985) Endogenous opioid peptides and hypothalamic neuroendocrine neurones. *J. Endocrinol.* **107**; 437.
- Bicknell, R.J., Chapman, C. y Leng, G. (1985) Neurohypophysial opioids and oxytocin secretion: source of inhibitory opioids. *Exp. Brain Res.* **60**; 192.
- Bolc-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. y Kelly, P.A. (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Rev.* **19**; 225.
- 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: disulphide-bridged dimers and glucosylated variants. *J. Endocr.* **120**; 201.
- Bondy, C.A., Gainer, H. y Russell, J.T. (1988) Dynorphin A inhibits and naloxone increases the electrically stimulated release of oxytocin but not vasopressin from the terminals of the neural lobe *Endocrinology* **122**; 1321.
- Bondy, C.A., Jensen, R.T., Brady, L.S. y Gainer, H. (1989) Cholecystokinin evokes secretion of oxytocin and vasopressin from rat neural lobe independent of external calcium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**; 5198.

- Bridges, R.S., Robertson, M.C., Shiu, R.P., Sturgis, J.D., Henríquez, B.M. y Mann, P.E. (1997) Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology* **138**; 756.
- Brooks, C.L., Isaacs, L.A. y Wicks, J.R. (1994) Preparative purification of phosphorylated and nonphosphorylated bovine prolactine. *Mol. Cell Endocrinology* **99**; 301.
- Brownstein, M.J. y Mezey, E. (1986) Múltiple chemical messengers in hypothalamic magnocellular neurons. En Hokfelt, T., Fuxe, K. Y Pernow, B. (Eds) "Coexistence of neuronal messengers; a new principle in chemical transmisión". *Progress in Brain Research*. Elsevier, Amsterdam. Págs. 161-189.
- Byers, M., Kuiper, G.G., Gustafsson, J.A. y Park-Sarge, O.K. (1997) Estrogen receptor-beta mRNA expression in rat ovary: down-regulation by gonadotropins. *Mol. Endocrinol.* **11**; 172-82
- Chomczynski, P. y Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-choloform extraction. *Analytical Biochemistry* **162**; 156.
- Clapp, C., Sears, P.S. y Nicoll, C.S. (1989) Binding studies with intact rat prolactin and a 16K fragment of the hormone. *Endocrinology* **125**; 1054.
- Clapp, C. y Weiner, R.I. (1992) A specific, high affinity, saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cells. *Endocrinology* **130**; 1380.
- Clapp, C., Martial, J.A., Guzman, R.C., Rentier-Delrue, F. y Weiner, R.I. (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* **133**; 1292.
- Clapp, C., Torner, L., Gutiérrez-Ospina, G., Alcántara, E., López-Gómez, F.J., Nagano, M., Kelly, P.A., Mejía, S., Morales, M.A. y Martínez de la Esclaera, G. (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDA fragment with activity like 16-kDA prolactin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**; 10384.
- 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.
- Cortés, R., Ceccatelli, S., Schalling, M. Y Hökfelt, T. (1990) Differential effects of intracerebroventricular colchicine administration on the expression of mRNAs for neuropeptides and neurotransmitter enzymes, with special emphasis on galanin: an *in situ* hybridization study. *Synapse* **6**; 369.
- Crowley, W.R., O'Donohy, T.L., George, J.M y Jacobowitz, D.M. (1978) Changes in pituitary oxytocin and vasopressin during the estrous cycle and after ovarian hormones: evidence for mediation by norepinephrine. *Life Sci.* **23**; 2579.
- Crumeyroлле-Arias, M. Latouche, J., Jammes, H., Djiane, J., Kelly, P.A., Reymond, M.J. y Haour, F. (1993) Prolactin receptors in the rat hypothalamus: Autoradiographic localisation and characterization. *Neuroendocrinology* **57**: 457.
- Cunningham, E.T. Jr. y Sawchenko, P.E (1991) Reflex control of magnocellular vasopressin and oxytocin secretion. *TINS* **14**; 406.
- Das, S.K., Tan, J., Raja, S., Halder, J., Paria, B.C y Dey, S.K. (2000) Estrogen targets genes involved in protein processing, calcium homeostasis, and Wnt signaling in the mouse uterus independent of estrogen receptor-alpha and -beta. *J. Biol. Chem.* **275**, 28834.

- Dellovade, T.L., Zhu, Y.S. y Pfaff, D.W. (1999) Thyroid hormones and estrogen affect oxytocin gene expression in hypothalamic neurons. *J. Neuroendocrinol.* **11**; 1.
- DeVito, W.J. (1988a) Distribution of immunoreactive prolactin in the male and female rat brain: effects of hypophysectomy and intraventricular administration of colchicine. *Neuroendocrinology* **47**; 284.
- DeVito, W.J. (1988b) Heterogeneity of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **150**, 599.
- DeVito, W.J. (1989) 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., Stone, S. y Avakian, C. (1991) Stimulation of hypothalamic prolactin release by veratridine and angiotensin in the female rat: effect of ovariectomy and estradiol administration. *Neuroendocrinology* **54**; 391.
- DeVito, W.J., Avakian, C., Stone, S. y Ace, C. (1992) Estradiol increases prolactin synthesis and prolactin messenger ribonucleic acid in selected brain regions in the hypophysectomized female rat. *Endocrinology* **131**; 2154.
- DeVito, W.J., Avakian, C., Stone, S. y Okulics, W.C. (1993a) 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. (1993b) 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.
- Dutt, A., Kaplitt, M.G., Kow, L.M. y Pfaff, D.W. (1994) Prolactin, central nervous system and behaviour: A critical review. *Neuroendocrinology* **59**; 413.
- Elangovan, S. y Moulton, B.C. (1980) Progesterone and estrogen control of rates of synthesis of uterine cathepsin D. *J. Biol. Chem.* **255**; 7474.
- 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.
- 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. *Neuroendocrinology* **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

- Emanuele, N.V., Jurgens, J.K., Halloran, M.M., Tentler, J.J., Lawrence, A.M. y Kelley, M.R. (1992) The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol.* **6**; 35.
- Ferrara, N., Clapp, C. y Weiner, R. (1991) The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* **129**; 896.
- Fuxe, K., Hökfelt, T., Eneroth, P., Gustafsson, J.A. y Skett, P. (1976) Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals 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.
- Gellersen, N., Bonhoff, A., Hunt, N. y Bohnet, H.G. (1991) Decidual-type prolactin expression by the human myometrium. *Endocrinology* **129**, 158.
- Gellersen, B., Kempf, R., Telgmann, R. y DiMattia, G.E. (1994) Nonpituitary human prolactin gene transcription is independent of Pit-1 and differentially controlled in lymphocytes and in endometrial stroma. *Mol. Endocrinol.* **8**; 356.
- Gellersen, B., Kempf, R., Telgmann, R. y DiMattia, G.E. (1995) Pituitary-type transcription of the human prolactin gene in the absence of Pit-1. *Mol. Endocrinol.* **9**; 887.
- Ghosh, R. y Sladek, C.D. (1995) Prolactin modulates oxytocin mRNA during lactation by its action on the hypothalamo-neurohypophyseal axis. *Brain Res.* **672**; 24.
- Golander, A., Hurley, T., Barret, J., Hize, A. y Handwerger, 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.
- Gundlach, C., Kohama, S.G., Mirkes, S.J., Garyfallou, V.T., Urbanski, H.F. y Bethea, C.L. (2000) Distribution of estrogen receptor beta (ERbeta) mRNA in hypothalamus, midbrain and temporal lobe of spayed macaque: continued expression with hormone replacement. *Brain Res., Mol. Brain Res.* **76**; 191.
- Gutiérrez- Ospina, G. (1995) Localización inmunocitoquímica de un antígeno inmunorreactivo a la prolactina 16K en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario de la rata. Tesis de Maestría. UNAM, México.
- Haisnleder, D.J., Ortolano, G.A., Ladefeld, T.D., Zmeili, S.M. y Marshall, J.C. (1989) Prolactin messenger ribonucleic acid concentrations in 4-day cycling rats and during the prolactin surge. *Endocrinology* **124**; 2023.
- Harlan, R.E., Shivers, B.D., Fox, S., Kaplovic, K.A., Schachter, B.S y Pfaff, D.W. (1989) Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology* **49**; 7.
- Hatton, G.I. (1990) Emerging concepts of structure-function dynamics in adult brain: the hypothalamo-neurohypophysial system. *Progress in Neurobiology* **34**; 437.
- Hrabovszky, E., Kalló, I., Hajszán, T., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I. y Liposits, Z. (1998) Expression of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid in oxytocin and vasopressin neurons of the rat supraoptic and paraventricular nuclei. *Endocrinology* **139**; 2600

- Hrabovszky, E., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I., Hajszán, T., Carpenter, C.D., Liposits, Z. y Petersen, S.L. (2000) Detection of estrogen receptor-beta messenger ribonucleic acid and 125I-estrogen binding sites in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. *Endocrinology* **141**; 3506.
- Jacobowitz, D.M. (1988) Multifactorial control of pituitary hormone secretion: the "wheels" of the brain. *Synapse* **2**; 186.
- Jard, S. (1990) Vasopressin and Oxytocin. En *Hormones: from molecules to disease*. Baulieu, E.-E. y Kelly, Eds. P.A., Págs 283-302. Hermann Publishers in Arts and Science, Paris, France.
- Jones, P.S., Parrott, E. y White, I.N. (1999) Activation of transcription by estrogen receptor alpha and beta is cell type- and promoter-dependent. *J. Biol. Chem.* **274**; 32008.
- Jourdain, P., Dupouy, B., Bonhomme, R., Poulain, D.A., Israel, J.M., Theodosis, D.T. (1999) Visualization of local afferent inputs to magnocellular oxytocin neurons in vitro. *Eur. J. Neurosci.* **11**; 1960.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S. y Gustafsson, J.A. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**; 863.
- Kuiper, G.G. y Gustafsson, J.A. (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* **410**; 87.
- Kuiper, G.G., Shughrue, P.J., Merchenthaler, I. y Gustafsson, J.A. (1998) The estrogen receptor beta subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine systems. *Front. Neuroendocrinol.* **19**; 253.
- 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.
- Lesueur, L., Edery, M., Ali, S., Paly, J., Kelly, P.A. y Djiane, J. (1991) Comparison of long and short forms of the prolactin receptor on prolactin-induced milk protein gene transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**; 824.
- Levin, M.C. y Sawchenko, P.E. (1993) Neuropeptide co-expression in the magnocellular neurosecretory system of the female rat: evidence for differential modulation by estrogen. *Neuroscience* **54**; 1001.
- 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 Esclera, G. y Clapp, C. (1995) Immunoreactive prolactins of the neurohypophysial system display actions characteristic of prolactin and 16K prolactin. *Endocrine* **3**; 573.
- Lucas, B.K., Ormandy, C.J., Binart, N., Bridges, R.S. y Kelly, P.A. (1998) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology* **139**; 4102.
- Mangurian, L.P., Walsh, R.J. y Posner, B.I. (1992) Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* **131**; 698.
- Martin, R. y Voigt, K.H. (1981) Enkephalins co-exist with oxytocin and vasopressin in nerve terminals of rat neurohypophysis. *Nature* **289**, 502.
- Matera, L., Galletto, A., Geuna, M., Vekemans, K., Ricotti, E., Contarini, M., Moro, F. y Basso, G. (2000) Individual and combined effect of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and prolactin on maturation of dendritic cells from blood monocytes under serum-free conditions. *Immunology* **100**; 29.

- Maurer, R.A., Kim, K.E., Day, R.N. y Notides, A.C. (1990) Regulation of prolactin gene expression by estradiol. En *Molecular Endocrinology and Steroid Hormone Action*, pp 159-169. Eds G. Sato y J.L. Stevens. New York: Alan R. Liss.
- 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.
- Mejía, S (1996) Localización estructural de un antígeno tipo PRL 16K en el sistema hipotálamo-neurohipofisiario de la rata. Tesis de Maestría. Centro de Neurobiología, UNAM.
- Mejía, S., Morales, M.A., Zetina, M.A., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1997) Immunoreactive prolactin forms colocalize with vasopressin in neurons of the hypothalamic paraventricular and supraoptic nuclei. *Neuroendocrinology* 66; 151.
- 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. Comm.* 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.
- Muccioli, G. y Di Carlo, R. (1994) Modulation of prolactin receptors in the rat hypothalamus in response to changes in serum concentration of endogenous prolactin or to ovine prolactin administration. *Brain Res.* 663: 244.
- Nagano, M. y Kelly, P.A. (1994) Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J. Biol. Chem.* 269; 13337.
- Neill, J.D. (1974) Prolactin: Its secretion and control. En "Handbook of Physiology", sección 7, vol. 4, págs. 469-488. E Knobil y W.H. Sawyer, Eds. Am. Physiol. Society, Bethesda, MA.
- Nicoll, C.S. (1974) Physiological actions of prolactin. En Handbook of Physiology, sección 7, vol. 4, parte 2. Knobil, E. y Sawyer, W.H., Eds. American Physiological Society, Bethesda, MA.
- Nicoll, C.S. (1980) Ontogeny and evolution of prolactin functions. *Fed. Proc.* 39; 2563.
- Nishizuka, M., Shivers, B.D., Leranth, C. y Pfaff, D. (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.

- Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S. y Pfaff, D.W. (1999) Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**; 12887.
- O'Neal, K.D. y Yu-Lee, L.-Y. (1994) Differential signal transduction of the short, Nb2 and long PRL receptor: Activation of IRF-1 and cell proliferation. *J. Biol. Chem.* **269**; 26076.
- Österlund, M., Kuiper, G.G.J.M., Gustafsson, J.-A. y Hurd, Y.L. (1998) Differential distribution and regulation of estrogen receptor $-\alpha$ and $-\beta$ mRNA within the female rat brain. *Mol. Brain Res.* **54**; 175.
- Ouhtit, A., Morel, G. y Kelly, P.A. (1993) Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in the rat. *Endocrinology* **133**; 135.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J. y Scanlan, T.S. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**; 1508.
- Palkovits, M. (1983) Punch samplig biopsy technique. *Methods in Enzymology* **103**, 359.
- 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. y Shome, B. (1976) Rat prolactin: the entire linear aminoacid sequence. *Fed. Proc.* **35**; 219.
- Patisaul, H.B., Whitten, P.L. y Young, L.J. (1999) Regulation of estrogen receptor beta mRNA in the brain: opposite effects of 17beta-estradiol and the phytoestrogen, coumestrol. *Brain. Res., Mol. Brain. Res.* **67**; 165.
- Paut-Pagano, L., Roky, R., Valatx, J.-L., Kitahama, K. y Jouvét, M. (1993) Anatomical distribution of prolactin-like immunoreactivity in the rat brain. *Neuroendocrinology* **58**; 682.
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G. y Gustafsson, J.A. (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol. Endocrinol.* **11**; 1486.
- Pi, W.-J. y Grattan, D.R. (1998a) Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J. Comp. Neurol.* **394**; 462.
- Pi, W.-J. y Grattan, D.R. (1998b) Differential expression of the two forms of prolactin receptor mRNA within microdissected hypothalamic nuclei of the rat. *Mol. Brain. Res.* **59**; 1.
- Reichlin, S. (1992) En "Williams Textbook of Endocrinology", 8th Edition. Capítulo 5: Neuroendocrinology, págs. 135-205. Wilson, J.D. y Foster D.W. Eds. W.b. Saunders Co, Phyladelphia USA.
- 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.
- Roky, R., Paut-Pagano, L., Goffin, V., Kitahama, K., Valatx, J.-L., Kelly, P.A. y Jouvét, M. (1996) Distribution of prolactin receptors in the rat forebrain. *Neuroendocrinology* **63**; 422.
- Sakaguchi, K., Tanaka, M., Ohkubo, T., Doh-ura, K., Fujikawa, T., Sudo, S. y Nakashima, K. (1996) Induction of brain prolactin receptor long-form mRNA expression and maternal behavior in pup-contacted male rats: promotion by prolactin administration and suppression by female contact. *Neuroendocrinology* **63**; 559.

- Sawchenko, P.E., Imaki, T. y Vale W. (1992) Co-localization of neuroactive substances in the endocrine hypothalamus. *Ciba Foundation Symposium* **168**; 16-42.
- 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 strogen regulation of gene expression in rat hypothalamus. *Neuroendocrinology* **49**; 23.
- Siaud, P., Manzoni, O., Balmeffrezol, M., Barbanel, G., Assenmachjer, T. y Alonso G. (1989) The organization of polactin-like-immunoreactive neurons in the rat central neuvous system. *Cell Tissue Res.* **255**; 107.
- Silverman, A.-J. y Zimmerman, E.A. (1983) Magnocellular neurosecretory system. *Ann. Rev. Neurosci.* **6**; 357.
- Simerly, R.B., Chang, C., Miramatsu, M. y Swanson L.W. (1990) Distribution of androgen and estrogen receptor mRNA-containing cells in the rat brain; an *in situ* hybridization study. *Journal of Comparative Neurology* **294**; 76.
- 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.
- Sladek, C.D. y Knigge, K.M. (1977) Cholinergic stimulation of vasopressin release from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system in organ culture. *Endocrinology* **101**; 411.
- Sladek, C.D. y Joynt, R.J. (1979a) Angiotensin stimulation of vasopressin release from the rat hypothalamo-neurohypophyseal system in organ culture. *Endocrinology* **104**; 148.
- Sladek, C.D. y Joynt, R.J. (1979b) Cholinergic involvement in osmotic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology* **105**; 367.
- Sladek, C.D. y Joynt, R.J. (1980) Role of angiotensin in the osmotic control of vasopressin release by the organ-cultured rat hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrinology* **106**; 173.
- Slowsky, W.R., Swan, L. Y Smith, P. (1979) Effects of sex steroid hormones on arginine vasopressin in intact and castrated male and female rats. *Endocrinology* **104**; 105.
- Takahashi, H., Nabesima, Y., Nabesima, Y.I., Ogata, K. y Takeuchi, S. (1984) Molecular cloning and nuclotide sequence of DNA complementary to human decidual prolactin mRAN. *J. Biochem.* **95**; 1491.
- Thecodosis, D.T. (1985) Oxytocin-immunoreactive terminals synapse on oxytocin neurones in the supraoptic nucleus. *Nature* **313**; 682.
- Thompson, S.A (1982) Localization of immunoreactive prolactin in ependymic and circumventricular organs of the 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.
- Torner, L., Nava, G., Dueñas, Z., Corbacho, A. Mejía, S., López, F., Cajero, M., Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. (1999) Changes in the expression of neurohypophyseal prolactins during the estrous cycle and after estrogen treatment. *J. Endocr.* **161**; 423.
- Toubeau, G., Desclins, J., Parmentier, M. y Pasteels, J.L. (1979) Cellular localization of a prolactin-like antigen in the rat brain. *J. Endocr.* **83**; 261.
- Tougaard, C. y Tixier-Vidal, A. (1988) Lactotropes and gonadotropes. En "The Physiology of Reproduction" Vol. 2, págs. 1305-1335, E. Knobil y J.D. Neill, Eds. Raven Press, NY.
- Van den Bernd, G.J., Kuiper, G.G., Pols, H.A. y Van Leeuwen, J.P. (1999) Distinct effects on the conformation of estrogen receptor alpha and beta by both the antiestrogens ICI 164,384 and ICI 182,780 leading to opposite effects on receptor stability. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**:1.
- Walsh, R.J., Slaby, F.J. y Posner, B.I. (1987) A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* **120**; 1846.
- 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.
- Wang, H., Ward, A.R. y Morris, J.F. (1995) Oestradiol acutely stimulates exocytosis of oxytocin and vasopressin from dendrites and somata of hypothalamic magnocellular neurons. *Neuroscience* **68**; 1179.
- 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.
- Westley, B.R. y May, F.E.B. (1987) Oestrogen regulates cathepsin D mRNA levels in oestrogen responsive human breast tumor cancer cells. *Nucleic Acids Research* **15**; 3773.
- Wilson III, D.M., Emanuele, N.V., Jurgens, J.K. y Kelley, M.R. (1992) Prolactin message in brain and pituitary of adult male rats is identical; PCR cloning and sequencing of hypothalamic prolactin cDNA from intact and hypophysectomized adult male rats. *Endocrinology* **131**; 2488.
- Wong, V.L.Y., Compton, M.M. y Witorsch, R.J. (1986) Proteolytic modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat lactating mammary gland. *Biochim. Biophys. Acta* **881**; 167.
- Yamaguchi, K., Akaishi, T. y Megoro, H. (1979) Effects of estrogen treatment on plasma oxytocin and vasopressin in ovariectomized rats. *Endocrinologica Japonica* **26**; 197.
- Ying, C. y Lin, D.H. (2000) Estrogen-modulated estrogen receptor x Pit-1 protein complex formation and prolactin gene activation require novel protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **275**; 15407.
- Yoshikawa, M., Uozumi, T., Kawamoto, K., Arita, K., Ito, A. y Takahashi, S. (1995) Characteristics of prolactin secretion in normal and estrogen-treated pituitaries of rats at the single cell level: analysis by reverse hemolytic plaque assay. *Endocr J.* **42**; 235.