

**ESTUDIOS SOBRE UN POSIBLE MECANISMO DE  
REGULACION DE LA SECRECION DE PROLACTINA POR  
LA ADENOHIPOFISIS DE LA RATA**

TESIS

Para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS

Presenta:

M. en C. Icnelia Huerta Ocampo

Tutor:

Dr. Flavio M. Mena Jara

Doctorado en Ciencias Biomédicas  
Instituto de Neurobiología  
Universidad Nacional Autónoma de México

Enero 2007



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

El presente trabajo se llevó a cabo en el departamento de Neurobiología Celular y Molecular del Instituto de Neurobiología de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección del Dr. Flavio Manuel Mena Jara, con el apoyo de una beca para estudios de Doctorado otorgada por el CONACyT y una beca complementaria otorgada por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM.

*A Juan,  
Mi refugio, mi hogar.*

*A Andrés  
La alegría de mi vida.*

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial quisiera agradecer al Dr. Flavio Mena Jara, quien me ha apoyado de manera incondicional en mi formación académica y me ha brindado la confianza y el espacio para desarrollar mis propias ideas. Por las interminables charlas y por su paciencia casi inagotable. Agradezco al Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera y al Dr. Arturo Hernández Cruz, que como parte de mi comité total, contribuyeron al desarrollo y evaluación de este proyecto. Asimismo, quisiera agradecer al Dr. Carlos Arámburo de la Hoz, a la Dra. Rocío Salceda, a la Dra. Gabriela González Mariscal, al Dr. Gabriel Roldán, a la Dra. Áurea Orozco y a la Dra. Gabriela Morali, por haber contribuido con sus comentarios a la mejoría de esta tesis.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme dado la oportunidad de consolidarme académicamente en esta última etapa de mis estudios. De igual manera, agradezco el apoyo económico otorgado por parte de CONACYT y por la Dirección General de Estudios de Posgrado de la UNAM durante mis estudios de doctorado.

La realización del presente trabajo no hubiese sido posible sin la colaboración de la Dra. Tatiana Fiordeliso, del Dr. Arturo Hernández, del Dr. Manuel B. Aguilar y del Dr. Alfonso Cárabez, quienes con su experiencia en técnicas especializadas, contribuyeron en la realización de experimentos incluidos en esta tesis.

Agradezco infinitamente el apoyo técnico de Nilda Navarro y Alejandra Castilla, quienes con su ayuda incondicional y buena disposición, contribuyeron de manera muy importante en la realización de la presente tesis y con quienes he compartido largas jornadas de trabajo.

Asimismo, agradezco el apoyo técnico de las Unidades de Imágenes (Leopoldo González, Lourdes Lara) y de Microscopía Electrónica (Dr. Alfonso Cárabez Trejo, Ma. De Lourdes Palma) del Instituto de Neurobiología, así como el apoyo de la Unidad de enseñanza (Leonor Casanova), la Biblioteca (Pilar Galarza) y del Bioterio (M.V.Z. Martín García) del mismo Instituto.

A Juan, mi amante, mi amigo y cómplice en la vida, quien me ha acompañado en este largo viaje que emprendimos juntos hace más de 10 años, por ayudarme a acrecer tanto personal como académicamente.... por todo el amor que me has dado.

También quiero agradecer a mi familia. A mi madre por su eterno cariño y apoyo a lo largo de mi vida, por compartir momentos tan significativos para mí. A mi padre, le agradezco su cariño y su continuo empuje hacia mi superación académica, y porque sin su ayuda esta última etapa del proceso de graduación hubiera sido mucho más tormentosa. A Elleli, por su amor de hermana, su comprensión y sobre todo por consentirme, y a tí Diego porque siempre serás el mas pequeño de mis hermanos.

Finalmente, pero no por esa razón menos, quiero agradecer a Flavio, Rosita y Marcos por hacerme sentir parte de su familia, por todo el amor y el apoyo incondicional que desde un inicio nos han dado a Juan y a mí como pareja y ahora como familia. Rosita, agradezco tu interés constante y porque se que siempre puedo contar contigo.

## INDICE

<i>Abreviaturas</i>	<i>viii</i>
<i>Resumen</i>	<i>ix</i>
<i>Summary</i>	<i>xi</i>

## CAPITULO I

### PROLACTINA

<i>Acciones en las diferentes especies</i>	<i>3</i>
<i>Estructura</i>	<i>11</i>
<i>Variantes moleculares</i>	<i>14</i>
<i>Mecanismo de acción</i>	<i>21</i>
<i>Síntesis y secreción</i>	<i>24</i>
<i>Gen</i>	<i>25</i>
<i>Eventos intracelulares involucrados</i>	
<i>en la síntesis de PRL</i>	<i>26</i>
<i>Secreción de PRL</i>	<i>31</i>

## CAPITULO II

### REGULACION DE LA SECRECION DE PROLACTINA ADENOHIPOFISIARIA

<i>Factores Sistémicos e Hipotalámicos</i>	<i>37</i>
<i>Factores provenientes del lóbulo posterior y</i>	

<i>Neurointermedio</i>	39
<i>Factores autócrinos y parácrinos</i>	42

### **CAPITULO III**

#### **LACTOTROPOS: HETEROGENEIDAD MORFOLOGICA Y FUNCIONAL**

<i>Anatomía de la glándula hipófisis</i>	47
<i>Relaciones anatómicas y fisiológicas</i>	48
<i>Células secretoras de PRL</i>	50
<i>Heterogeneidad morfológica y funcional</i>	51
<i>Transdiferenciación</i>	54

### **CAPITULO IV**

#### **ANTECEDENTES ESPECIFICOS: PARTICIPACIÓN DE FACTORES REGIONALES EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PRL**

<i>Regionalización de la secreción de PRL</i>	57
<i>Regulación de la secreción de PRL en ratas lactantes</i>	60

### **CAPITULO V**

<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	64
-----------------------------------	----

<b>HIPOTESIS</b>	64
------------------	----



OBJETIVOS	65
-----------	----

## CAPITULO VI

### MATERIALES Y METODOS

<i>Animales</i>	67
<i>Disección de la AH</i>	68
<i>Obtención y procesamiento de medios condicionados</i>	69
<i>Reconstitución de medios condicionados</i>	69
<i>Incubación de adenohipofisis de ratas macho</i>	70
<i>Cuantificación de la cantidad de PRL</i>	71
<i>Marcaje isotópico de la PRL</i>	73
<i>Inmunofluorescencia en cultivos primarios de células adenohipofisarias</i>	74
<i>Marcaje con FM1-43</i>	77
<i>Microscopia electrónica</i>	78
<i>Aislamiento y purificación de gránulos de PRL</i>	79
<i>Cromatografía líquida rápida de alta resolución (FPLC)</i>	82
<i>Análisis estadístico</i>	83

## CAPITULO VII

### RESULTADOS

#### **Experimento 1**

*Efectos de tipo dosis-respuesta de medios condicionados*

*por ratas lactantes sobre la cantidad de PRL secretada  
por AH de ratas macho* 85

## **Experimento 2**

*Efecto del medio condicionado de ratas lactantes  
succionadas, sobre el porcentaje y distribución  
intracelular de PRL y GH inmunorreactiva en lactotropos  
y somatotropos en cultivos primarios de AH de ratas macho* 88

## **Experimento 3**

*Efecto del medio condicionado por ratas lactantes  
sobre la dinámica de secreción en células AHs usando  
el marcador FM1-43* 93

## **Experimento 4**

*Efecto del medio condicionado por ratas lactantes  
succionadas sobre la distribución y variantes moleculares  
de PRL inmunorreactiva en gránulos aislados,  
analizados mediante microscopia electrónica y  
SDS-PAGE/ Western Blot* 95

## **Experimento 5**

*Efecto del medio condicionado por ratas lactantes  
sobre la secreción de PRL madura y recién sintetizada*

*mediante el marcaje in vivo e in vitro de la hormona* 99

### **Experimento 6**

*Efecto de la cicloheximida y la Brefeldina-A sobre  
la estimulación de la secreción de PRL inducida por  
acción del medio condicionado en AHs de ratas macho* 102

### **Experimento 7**

*Caracterización preliminar de los factores activos  
presentes en el medio condicionado de ratas lactantes* 104

### **Experimento 8**

*Estudios acerca de la naturaleza del factor estimulador  
presente en el medio condicionado de ratas lactantes* 107

## **CAPITULO VIII**

### **DISCUSION**

*Efectos de dosis-respuesta de medios condicionados  
por ratas lactantes sobre AHs de ratas macho* 113

*Estudio de los mecanismos celulares de regulación  
regional de la secreción de PRL* 116

<i>Origen de la hormona secretada</i>	118
<i>Análisis de gránulos de PRL</i>	120
<i>Caracterización y naturaleza química de los factores activos presentes en el medio condicionado</i>	122
<b>CONCLUSIONES</b>	124
<b>APENDICE I</b>	
Índice de Figuras y tablas	126
<b>APENDICE II</b>	
Publicaciones	130

1. Nestor Díaz, **Icnelia Huerta**, Nephtali Marina y Flavio Mena (2002). Regional mechanisms within the anterior pituitary of lactating rats may regulate prolactin secretion. *Endocrine*; 18 (1): 41-46.
2. **Huerta-Ocampo I**, Christian HC, Thompson NM, El-Kasti MM y Wells T (2005). The 'intermediate' lactotroph: a morphologically distinct, ghrelin-responsive lactotroph in the dwarf (*dw/dw*) rat pituitary. *Endocrinology*; 146 (11): 5012-23.
3. **Huerta-Ocampo I**, Mena F, Barrios F, Martínez G, González L y Larriva-Sahd J (2005). Perinatal exposure to androgen suppresses sexual dimorphism in nerve trunk diameter, axon number, and fiber

size spectrum: A quantitative ultrastructural study of the adult rat mammary nerve. Brain Research; 1060 (1-2): 179-83.

## REFERENCIAS

131

## ABREVIATURAS

AH	Adenohipófisis
$\alpha$ -MSH	Hormona estimulante de melanocitos tipo alfa
Ang II	Angiotensina II
CH <sub>x</sub>	Cicloheximida
DA	Dopamina
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
E <sub>2</sub>	Estradiol
FGF	Factor de crecimiento de fibroblastos
FPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
GH	Hormona de crecimiento
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
LP	Lóbulo posterior
MC	Medio condicionado
MS	Mamosomatotropo
mRNA	RNA mensajero
NGF	Factor de crecimiento neural
NH	Neurohipófisis
NI	Lóbulo Neurointermedio
NS	No succionadas
Ovx	ovariectomías
PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida
PRL	Prolactina
PRF	Factor liberador de prolactina
RC	Región central
RER	Retículo endoplásmico rugoso
RL	Región lateral
S	Succionadas
SDS-PAGE	Electroforesis desnaturante en geles de poliacrilamida
TGF- $\alpha$	Factor de crecimiento de tipo transformante alfa
TRH	Hormona liberadora de tirotropinas
TSH	Hormona estimulante de la tiroides
VIP	Péptido intestinal vasoactivo

## RESUMEN

Se ha considerado que la heterogeneidad funcional de los lactotropos puede ser un reflejo de la susceptibilidad de subpoblaciones celulares de cambiar su funcionalidad de acuerdo a los requerimientos fisiológicos de secreción de PRL. En medios condicionados por adenohipófisis (AH) de ratas lactantes succionadas y no succionadas existen factores capaces de influir sobre la secreción AH de PRL de animales en diferentes condiciones fisiológicas. El tipo de efecto observado sobre el tejido incubado depende del origen del medio condicionado así como de la situación fisiológica del tejido incubado en dicho medio. El trabajo incluido en esta tesis ha servido para estudiar los mecanismos involucrados en la regulación regional de la secreción de PRL por AHs de ratas macho por acción de factores solubles presentes en medios condicionados por ratas lactantes. En un primer experimento se caracterizaron los efectos de medios condicionados por AHs de ratas lactantes succionadas y no succionadas, empleados a diferentes concentraciones (0.5x, 1x y 2X), sobre la secreción de PRL por AHs de ratas macho. La cantidad de PRL secretada al medio de incubación fue cuantificada mediante PAGE, bioensayo en células Nb2 y ELISA. Los resultados muestran que los medios condicionados ejercen un efecto estimulador muy importante sobre la secreción de PRL, por lo cual consideramos importante investigar acerca de los mecanismos celulares involucrados en dicho fenómeno. Para determinar si los efectos observados se debían a un incremento en la población de células secretoras de PRL, células AHs de ratas macho en cultivo fueron incubadas en dicho medio condicionado. Asimismo, en cultivos primarios, se estudió la dinámica de secreción bajo el efecto estimulador del medio condicionado, mediante el

uso del marcador fluorescente FM1-43. Por otro lado, otra serie de experimentos fueron diseñados para conocer el origen de la hormona secretada y el efecto del medio condicionado sobre la síntesis y secreción de PRL madura o recién sintetizada mediante el marcaje *in vivo* e *in vitro* de la hormona. Los resultados de tales experimentos muestran que el efecto estimulador del medio condicionado está presente aún y cuando las incubaciones se realizan en presencia de cicloheximida o brefeldina-A. Los resultados anteriores junto con los obtenidos mediante el marcaje isotópico de la hormona sugieren que el incremento en la secreción de PRL inducido por el factor(es) contenido en los medios condicionados se debe a un incremento en la liberación de PRL a partir de gránulos sintetizados mas de 24 horas previas a la incubación en medio condicionado. El análisis de las variantes moleculares de PRL mediante western blots, en gránulos aislados e inmunocitoquímica para PRL usando partículas de oro, son consistentes con los resultados obtenidos en los experimentos anteriores y sugieren que la hormona secretada proviene de gránulos maduros de secreción. Finalmente, se determinó la actividad biológica de cada una de las 4 fracciones del medio condicionado, obtenidas mediante cromatografía líquida rápida de alta resolución (FPLC), sobre la cantidad de PRL secretada por AHs de ratas macho. Los resultados muestran que el efecto estimulador del medio condicionado se encuentra contenido en la fracción IV del medio condicionado de la región central de AHs provenientes de ratas lactantes succionadas. En conjunto los resultados de este estudio sugieren que en el medio condicionado de ratas lactantes succionadas, existen factores solubles capaces de estimular de manera importante la secreción de PRL por AHs de ratas macho a través de la secreción de hormona a partir de gránulos maduros de secreción almacenados en el interior de la célula.



## SUMMARY

The functional heterogeneity of lactotrophs has been considered to be a correlate of different lactotroph populations susceptibility's to change their secretory capability to satisfy prolactin (PRL) secretion in regard to a particular physiological condition. In media conditioned by the incubation of lactating suckled and non suckled rats anterior pituitary (AP) glands, exist soluble factors capable of influencing PRL secretion from APs of animals in various physiological conditions. The type of effect exerted varies depending upon the physiological condition of both, the tissue from which the conditioned media is obtained and the tissue incubated in the conditioned media. The experiments included in this thesis have been useful for studying the mechanisms underlying the existence of a regional regulation of PRL secretion by male rat AP regions upon the influence of soluble factors contained in conditioned media from lactating rat APs. An initial experiment was made in order to characterize the effects of conditioned media from lactating suckled and non suckled rat APs, used at different concentrations (0.5x, 1x and 2x) upon the secretion of male rat PRL. The amount of PRL was determined by three different methods: PAGE, Bioassay in Nb2 cells and ELISA. The results show that both conditioned media from lactating rats exert an important stimulatory effect upon PRL secretion by both male AP regions, consequently we consider important to investigate about the mechanisms underlying these effects. To rule out the possibility that the increase in PRL secretion is due to an increase in the proportion of PRL secreting cell population, cultured AP cells of male rats were incubated in such conditioned media. Also, by using cultured AP cells and the fluorescent dye FM1-43, we could study the dynamic of peptide

granule secretion within the male rat AP upon the influence of the conditioned medium. Another series of experiments were designed to clarify the cellular source of PRL secretion and to determine the effects of the conditioned medium upon the synthesis and secretion of newly synthesized and mature hormone by labeling PRL with [<sup>3</sup>H]-leucine either *in vivo* or *in vitro*. The results of such experiments show that neither cycloheximide nor brefeldine-A were capable of preventing the stimulatory effect of the conditioned medium. These results, along with those obtained by the isotopic labeling of the hormone, suggest that induced increase of PRL secretion by male APs is due to an increase in the release of PRL from mature secretory granules, synthesized more than 24 h before the incubation. The results obtained from the western blots analysis of the molecular variants of PRL contained in isolated granules, as well as the immunocytochemistry for PRL using gold particles are in accordance with the previous results and support the hypothesis that the source of the secreted PRL is from mature PRL secretory granules. Finally, the biological activity of each of the 4 fractions obtained by FPLC was assessed upon PRL secretion by male APs. These results show that the stimulatory effect of the conditioned medium obtained from the central region of lactating suckled rat APs is contained within the fraction IV. Altogether these results suggest that in the conditioned media from lactating suckled rats exist soluble factors capable of inducing an important stimulatory effect upon PRL secretion from male AP regions via the secretion of the hormone contained in intracellular stored mature secretory granules.

## **CAPITULO I**

### **PROLACTINA**

En 1928, Stricker y Grueter demostraron que la inyección intraductal de un homogeneizado de hipófisis bovino era capaz de estimular la secreción de leche en conejas pseudoembarazadas (Stricker & Grueter, 1928). Posteriormente Riddle y cols en 1933 identificaron a este factor como una hormona de naturaleza peptídica que también estimulaba el desarrollo del epitelio secretor y la síntesis de la leche del buche en pichones. Así, el compuesto aislado recibió el nombre de pro-lactina (PRL), dada su capacidad para promover la lactancia.

La PRL junto con la hormona de crecimiento (GH), los lactógenos placentarios (PL) en roedores o la somatotropina corionica (CS) humana en primates, la somatolactina (SL), la proliferina (PLF), las proteínas relacionadas (bovino) o parecidas (rata) a la PRL (PRP), las proteínas vinculadas con la proliferina y las relacionadas con la GH, pertenecen a una misma familia de hormonas peptídicas producidas principalmente por la glándula hipófisis, en el caso de todos los vertebrados; y por la placenta en los mamíferos, y que si bien guardan similitudes estructurales existe sin embargo una gran diversidad funcional entre ellas (Wallis, 1984; Harvey et al., 1995).

Con base en la homología de las secuencias de aminoácidos que conforman a la PRL y a la GH, Bewley y Li en 1970, propusieron que ambas hormonas derivan de un único gen ancestral común proto-GH/Prolactina, el cual como resultado de un proceso de duplicación genética dio origen a la separación de estas dos hormonas. Posteriormente, los genes de PRL y GH llevaron a cabo múltiples duplicaciones dando lugar a los demás miembros de esta familia de proteínas (Fig. 1).

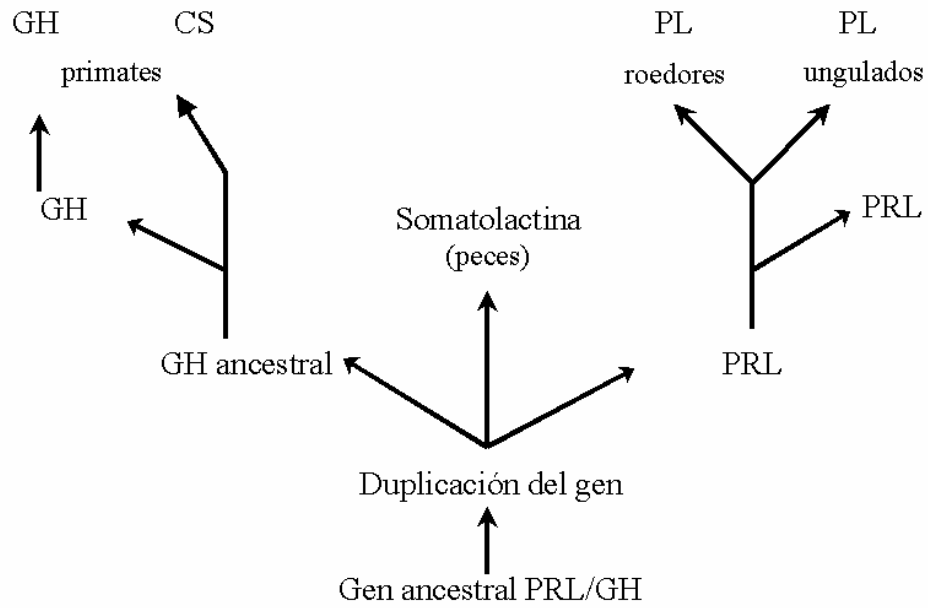


Fig.1. Esquema hipotético del árbol filogenético de la familia GH/PRL . GH: Hormona de Crecimiento; PRL: Prolactina; PL: lactógenos placentarios; CS: somatotropina corionica (Tomada de Harvey et al., 1995).

## **Acciones de la PRL en las diferentes especies**

Se cree que el gen de PRL/GH se duplicó antes de la divergencia entre los peces óseos y cartilagosos hace 430 millones de años (Wallis, 1984; Harvey et al., 1995). La PRL es sintetizada y secretada por la glándula hipófisis en todas las especies de vertebrados (Batten & Ingleton, 1987), sin embargo ésta hormona ha llevado a cabo un proceso de evolución a lo largo de la filogenia de los vertebrados, que ha permitido la aparición de múltiples variantes de una misma molécula que participan en una gran diversidad de procesos fisiológicos (Sinha, 1992, 1995).

Las acciones de la PRL en los vertebrados han sido relacionadas con el control del balance hidroelectrolítico (Bern & Nicoll, 1968; Horrobin, 1980; Manzon, 2002), con el crecimiento y desarrollo (Bern & Nicoll, 1968; Nicoll, 1974; Bole-Feysot et al., 1998), con ciertos procesos metabólicos y endocrinológicos (Bern & Nicoll, 1968; Nicoll, 1974; Bole-Feysot et al., 1998), con aspectos relacionados con la reproducción, con la conducta, con la angiogénesis (Clapp et al., 1993; Corbacho et al., 2002; Galfione et al., 2003) y con ciertos aspectos de la respuesta inmune (Bole-Feysot et al., 1998; Davis, 1998; Yu-Lee, 2002).

### *Peces*

La principal y más primitiva función de la PRL en vertebrados inferiores e incluso aún presente en los mamíferos, se encuentra relacionada con la osmorregulación.

La PRL actúa en las branquias disminuyendo la permeabilidad al agua y a la pérdida a ciertos iones como el Na<sup>+</sup> y el Cl<sup>-</sup>, e incrementando la secreción de moco. En los riñones la PRL incrementa la filtración glomerular y la reabsorción de Na<sup>+</sup> mediante activación de la bomba Na<sup>+</sup>K<sup>+</sup>-ATPásica. En el intestino y en la piel, la PRL disminuyendo la absorción de

agua, Na<sup>+</sup> y Cl<sup>-</sup>, e incrementando la producción de moco, respectivamente (Bern & Nicoll, 1968; Sharp, 1997; Manzon, 2002). Asimismo, se le ha relacionado con ciertos aspectos reproductivos como el crecimiento de las vesículas seminales y de los ovarios (Bern & Nicoll, 1968; Batten & Ingleton, 1987). En algunos peces migratorios euryalinos, esta hormona tiene un papel fundamental en la adaptación de estas especies a su medio ambiente tras la migración del agua salada al agua dulce para completar su ciclo reproductor y en ciertas conductas como la construcción del nido. La importancia de la PRL sobre la osmorregulación queda manifiesta cuando posterior a la hipofisectomía la presión osmótica de la sangre disminuye de manera importante y solo la administración exógena de PRL es capaz de revertirla y mantenerla en niveles normales (Ball & M., 1965 en Bern & Nicoll, 1968).

### *Anfibios*

En anfibios la PRL ejerce además de acciones osmorregulatorias, acciones antimetamórficas e influye de manera importante sobre el crecimiento somático y el desarrollo. Durante el período premetamórfico, existe una hipersecreción de PRL que se correlaciona con un incremento en el crecimiento de ciertas estructuras de las larvas en anuros (Nicoll, 1974).

Algunas especies de anfibios son durante una etapa de su vida terrestres y posteriormente ocurre en ellos una segunda metamorfosis que los obliga a regresar al agua. En contraste con la primera metamorfosis del agua a la tierra, durante la cual la larva desarrolla sus características terrestres durante la juventud, la segunda metamorfosis involucra la activación de procesos fisiológicos relacionados con la readaptación a la vida acuática y en ellos la PRL tiene un papel fundamental debido a sus acciones osmorreguladoras sobre la piel y a sus efectos asociados con el

incremento en la conducta locomotora y reproductiva (Bern & Nicoll, 1968).

### *Reptiles*

Dentro de los principales efectos de la PRL sobre el crecimiento y desarrollo en estas especies se encuentran: promover el incremento de peso corporal, estimular el crecimiento y la regeneración de las extremidades superiores y de la cola en lagartijas y lagartos y promover la muda de piel en algunas culebras. Adicionalmente la PRL reduce el depósito de lípidos, incrementa la filtración glomerular y la reabsorción de iones en la orina (Bern & Nicoll, 1968; Nicoll, 1974; Batten & Ingleton, 1987).

### *Aves*

La PRL ejerce una gran variedad de acciones sobre las aves. La mayoría de ellas se encuentran relacionadas con las funciones reproductivas. Las dos principales acciones de esta hormona son: la estimulación de la formación de la leche del buche en las palomas y la inducción en la formación del parche de empollamiento (Bern & Nicoll, 1968; Nicoll, 1974; Batten & Ingleton, 1987). La primera de estas acciones se ejerce a través de la estimulación de las células epiteliales del buche, las cuales se hipertrofian y acumulan gránulos de grasa en su interior. Eventualmente las células de la mucosa se descaman dando lugar a la leche del buche, la cual constituye el principal alimento de las crías. La placa de empollamiento se localiza en la región posterior del abdomen y se forma en ciertas especies de aves bajo la acción conjunta de la PRL con los esteroides gonadales (Selander & Yang, 1966). Durante el período de incubación, ocurre la pérdida de las plumas en esta región del abdomen ocasionada por un incremento en la vascularización asociado con edema. Esto permite que al hacer contacto esta región del abdomen con el huevo

durante la incubación ocurra la transferencia de calor. Otras de las acciones de la PRL en estas especies son: incrementar la excreción de sal por las glándulas nasales, la ingesta de comida y agua, la lipogénesis y el depósito de lípidos, así como los niveles séricos de glucosa.

Adicionalmente, favorece la aparición de conductas como la incubación de los huevos y la alimentación a las crías (Nicoll, 1974; Batten & Ingleton, 1987).

### *Mamíferos*

Las principales acciones de la PRL en esta especie son la de promover el desarrollo lóbulo-alveolar de la glándula mamaria durante el embarazo, al final del cual alcanza su máximo grado de desarrollo y ello permite el establecimiento de la lactancia después del parto, así como participar en la síntesis y secreción láctea. Desde el punto de vista evolutivo, la aparición de la glándula mamaria es fundamental, ya que a través de la lactancia se mantiene la supervivencia de las especies de esta clase. En el desarrollo de la glándula mamaria intervienen de manera secuencial y en paralelo diferentes hormonas cuya importancia varia dependiendo de la etapa del ciclo reproductor en que se encuentre el individuo (Lyons et al., 1958)(Fig. 2) .

Durante el embarazo se distinguen dos fases del desarrollo mamario, en las cuales diversas hormonas actúan de manera orquestada regulando el desarrollo de la glándula. La mamogénesis tiene lugar durante los dos primeros tercios de la gestación. Durante esta etapa ocurre la estructuración y desarrollo del sistema de conductos, de los elementos vasculares y del tejido conjuntivo, así como un incremento en la proliferación y diferenciación de las células lóbulo-alveolares (Lyons et al., 1958; Anderson, 1974; Tucker, 1994). Dentro de los factores involucrados en estos cambios se encuentran los estrógenos, la progesterona, los lactógenos placentarios, la PRL y hormonas tiroideas (Lyons et al., 1958).



Durante la lactogénesis, la cual tiene lugar hacia el último tercio de la gestación, ocurre un crecimiento e hipertrofia del aparato secretor. La acción sinérgica de la PRL y las hormonas de crecimiento y tiroideas da inicio a la secreción láctea (Fig. 2) (Lyons et al., 1958; Imagawa et al., 1994).

La lactancia se establece una vez que la glándula mamaria ha alcanzado su máxima fase de desarrollo. Durante esta etapa ocurre un incremento en la actividad secretora del epitelio mamario. Momentos antes del parto ocurre un incremento y disminución en los niveles circulantes de estrógenos y progesterona, respectivamente, lo cual trae como resultado un incremento en las concentraciones de PRL, oxitocina y corticosteroides. La presencia de todos estos factores en conjunto dan lugar al inicio y mantenimiento de la lactancia (Cowie & Tindal, 1971).

Las acciones de la PRL sobre la secreción láctea se ejercen a través de la estimulación de la proliferación celular y diferenciación del epitelio alveolar en secretor. Asimismo, promueve la síntesis de proteínas, tanto las secretadas a la leche (caseína,  $\alpha$  lactoalbúmina,  $\beta$  lactoalbúmina) como las que participan en la elaboración de sus componentes (Cowie et al., 1980).

Durante la lactancia la secreción de PRL se encuentra determinada casi exclusivamente por el estímulo de la succión (Grosvenor et al., 1986) y por los estímulos exteroceptivos provenientes de las crías (Grosvenor et al., 1977). La secreción de PRL resulta de la activación de un reflejo neuroendócrino muy complejo originado por el estímulo de la succión, el cual provoca la liberación a la circulación sistémica de algunas hormonas del complejo galactopoyético entre las que se encuentran la PRL, hormona adenocorticotrófica, GH, hormona estimulante del tiroides, oxitocina, hormona antidiurética, además de adrenalina y noradrenalina secretadas por las glándulas suprarrenales, las cuales en conjunto y de manera orquestada participan en la síntesis y evacuación de la leche (Grosvenor & Mena, 1974).

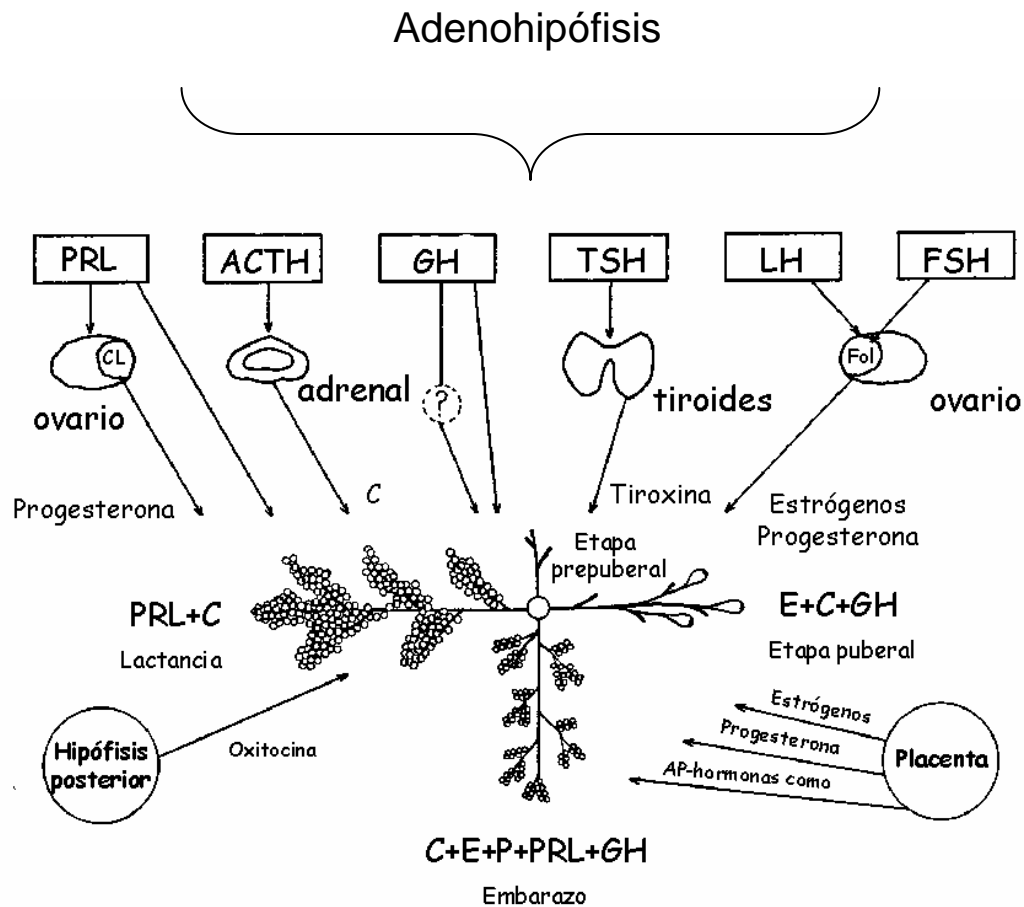


Fig. 2. Esquema que ilustra la participación de algunas hormonas y su influencia en el desarrollo mamario a lo largo del ciclo reproductor. PRL: Prolactina; ACTH: Hormona adenocorticotrópica; GH: Hormona de crecimiento; TSH: Hormona estimulante del tiroides; LH: Hormona luteinizante; FSH: Hormona foliculoestimulante; C: Corticosteroides; P: Progesterona; E: Estrógenos; CL: Cuerpo lúteo; Fol: Foliculo ovárico (Modificada de Lyons et al., 1958).

Al finalizar la lactancia, la glándula mamaria sufre un proceso de involución, sin embargo nunca lleva a cabo una regresión similar a la que se observa antes del embarazo.

Además de los efectos bien conocidos de la PRL sobre la lactancia, esta hormona se encuentra involucrada en otros aspectos relacionados con la reproducción. En el ovario esta hormona tiene acciones luteotrópicas y luteolíticas (formación y destrucción del cuerpo lúteo, respectivamente) (Wuttke & Meites, 1971; Matsuyama et al., 1990; Bole-Feysot et al., 1998) durante el ciclo estral, menstrual, el embarazo y la lactancia. La producción de progesterona por los ovarios es indispensable para que ocurra la implantación del óvulo fecundado, así como para mantener el embarazo e inhibir la ovulación, por lo que la regulación de la secreción de dicha hormona ovárica tiene un papel crítico dentro de la fisiología reproductiva. La PRL actúa en las células luteales del ovario estimulando la producción de progesterona (Murphy & Rajkumar, 1985; Matsuyama et al., 1990) y regulando la síntesis de los sustratos metabólicos y enzimas necesarias para su síntesis (Krasnow et al., 1990; Matsuyama et al., 1990). Otros de los efectos de la PRL sobre la reproducción son: incrementar el nivel de receptores de estrógenos (Saiduddin & Zassenhaus, 1977) y progesterona (Daniel et al., 1984) en el útero, regular la producción de testosterona por las células de Leydig a través de un incremento en la secreción y número de receptores de la hormona luteinizante (Purvis et al., 1979; Dombrowicz et al., 1992), entre otros.

El papel de la PRL en la regulación del balance hidro-electrolítico es muy controversial (Horrobin, 1980). Sin embargo existen evidencias de que esta hormona es capaz de regular la excreción renal de agua (Adler et al., 1986), sodio y potasio (Lockett, 1972), además de ejercer una acción antidiurética al actuar de manera sinérgica con la hormona vasopresina (Carey et al., 1977). Asimismo, durante el embarazo, esta hormona regula la circulación e intercambio de fluidos a través de la piel, la membrana amniótica y el ojo del feto en desarrollo (Manku et al., 1975).

La PRL junto con algunos otros miembros de la familia de proteínas a la cual pertenece, participan en procesos fisiológicos y patológicos relacionados con la angiogénesis (Corbacho et al., 2002). Estas proteínas pueden ejercer sus efectos a través de la circulación sistémica, o actuar de manera autócrina y/o parácrina en diferentes estadios de la formación y reestructuración de nuevos capilares. Las acciones inhibitorias de la PRL se mantienen silentes hasta que la molécula es cortada por acción de enzimas del tipo de la catepsina D. El fragmento de PRL 16K generado a partir del corte enzimático, posee potentes acciones anti-angiogénicas entre las que se encuentran la inhibición en la proliferación de células endoteliales (Clapp et al., 1993), así como una estimulación en la apoptosis en estas mismas tipo celular (Martini et al., 2000). Asimismo, la PRL produce una inhibición en la degradación de matriz extracelular (Menashi et al., 1993), en la neovascularización de la córnea (Dueñas et al., 1999) y en el crecimiento y angiogénesis tumoral (Bentzien et al., 2001).

La PRL ejerce numerosos efectos sobre el sistema nervioso central de los mamíferos, incluyendo la instauración de la conducta materna durante la última etapa del embarazo y su mantenimiento a lo largo de la lactancia (Gonzalez-Mariscal et al., 1996; Bridges et al., 1997; Gonzalez-Mariscal et al., 2000; Gonzalez-Mariscal, 2001; Grattan et al., 2001), la regulación en la actividad secretora de neuronas que sintetizan oxitocina y vasopresina (Spinolo & Crowley, 1993; Mejia et al., 2003), el incremento en el apetito y la ingesta de alimentos, la supresión en la secreción de hormonas adenocorticotropas en respuesta a situaciones de estrés (Davis, 1998; Torner et al., 2002), efectos mitogénicos sobre astrocitos (De Vito et al., 1992; De Vito et al., 1995; Mangoura et al., 2000), la regulación del ciclo sueño-vigilia (Obál et al., 1992; Roky et al., 1993; Roky et al., 1995), entre otras.

Numerosos estudios han demostrado que una gran variedad de hormonas, entre ellas la PRL, ejercen acciones biológicas en células del

sistema inmunológico. Además del control endocrino que tiene la PRL sobre la respuesta inmune, esta hormona puede ser sintetizada y secretada por células del sistema inmune y actuar de manera autócrina y/o parácrina regulando las respuestas inmunológicas. Se ha reportado que la PRL estimula a las células T y B, a las células “asesinas naturales”, a macrófagos, neutrófilos, células hemotopoyéticas y a células presentadoras de antígenos (Mantera, 1996; Davis, 1998; Freeman et al., 2000; Yu-Lee, 2002). Asimismo, se ha observado que existe una correlación directa entre niveles elevados de PRL en sangre y la presencia de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso, la esclerosis múltiple, la artritis reumatoide, etc (Yu-Lee, 2002).

Mediante estudios *in vivo e in vitro* se ha demostrado que las células epiteliales de la glándula mamaria sintetizan y secretan PRL, la cual actúa de manera autócrina y/o parácrina favoreciendo la proliferación de cierto tipo de neoplasias (Clevenger & Plank, 1997; Vonderhaar, 1999; Clevenger et al., 2003; Rose-Hellekant et al., 2003).

### **Estructura de la PRL**

La PRL es una hormona de naturaleza peptídica formada por una sola cadena, cuyo peso molecular es de 23 kDa y que se encuentra constituida por 197 aminoácidos en la rata (Cooke et al., 1980) y el ratón (Kohmoto et al., 1984), y por 199 aminoácidos en la oveja (Li et al., 1970), cerdos (Li, 1976) y en el humano (Shome & Parlow, 1977; Truong et al., 1984)(Fig. 3). Existen en la molécula seis residuos de cisteína los cuales se unen entre sí mediante puentes disulfuro (posiciones Cys<sup>4</sup>-Cys<sup>11</sup>, Cys<sup>58</sup>-Cys<sup>174</sup> y Cys<sup>191</sup>-Cys<sup>199</sup>) generando tres asas, una grande localizada en la porción central y dos pequeñas localizadas en los extremos amino y carboxilo terminal (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000; Goffin et al., 2002). En cuanto a la estructura secundaria de esta proteína, se

conoce que alrededor de un 50% de la cadena se encuentra dispuesta en forma de  $\alpha$ -hélices, mientras que el resto de la molécula se encuentra formando asas. Hasta el momento no se conoce a detalle la estructura terciaria de la PRL, sin embargo se han generado algunos modelos hipotéticos basados en la similitud estructural que existe entre esta hormona y la GH principalmente. A partir de éstos, se presupone que la PRL está compuesta por cuatro  $\alpha$ -hélices dispuestas de manera antiparalela (de Vos et al., 1992; Goffin et al., 1995).

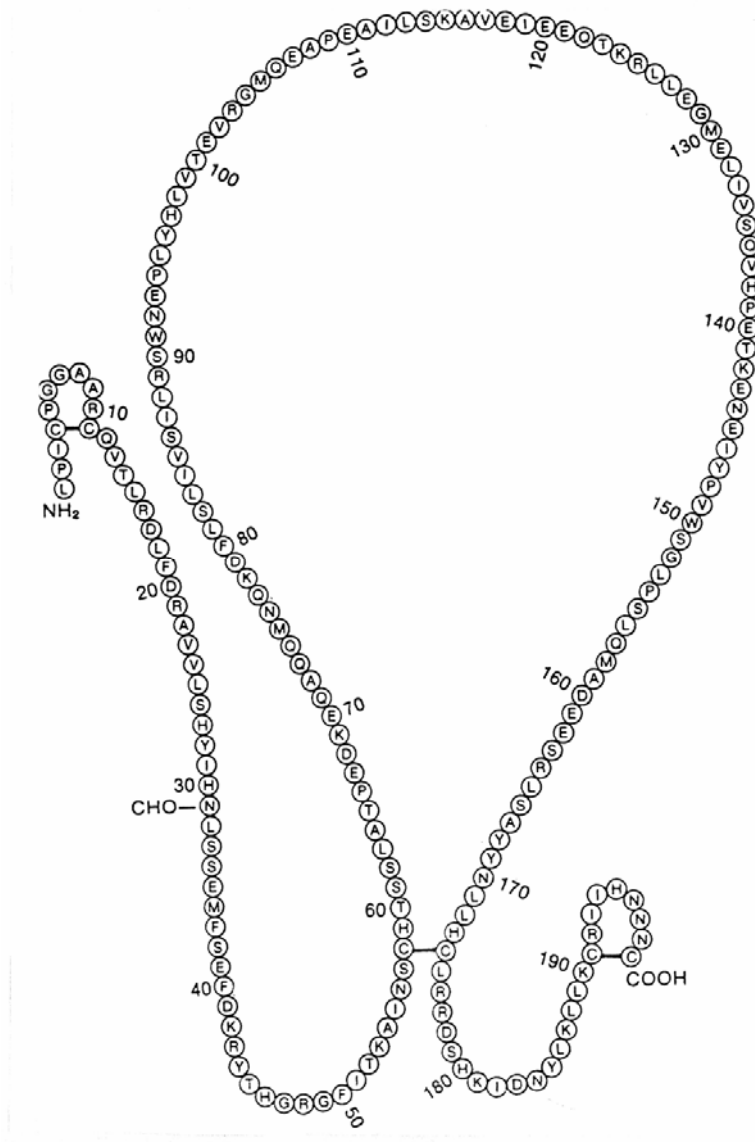


Fig. 3. Secuencia de aminoácidos que conforman a la prolactina monomérica (Tomado de Neill & Nagy, 1994).

## *Variantes moleculares de la PRL*

La PRL es una hormona muy versátil tanto en su estructura molecular (Shah & Hymer, 1989; Sinha, 1992, 1995) como en la gran diversidad de procesos fisiológicos en los cuales participa. Esta heterogeneidad funcional sugiere que la hormona sufre diversas transformaciones y modificaciones tanto pre- como postraduccionales, que como consecuencia generan una gran diversidad de variantes moleculares con actividades biológicas distintas (Fig. 4) (Sinha, 1992, 1995). La principal forma molecular en la que se encuentra a la PRL es una forma monomérica que posee un peso molecular de 23 kDa.

El ARN mensajero de la PRL puede presentar un procesamiento alternativo, lo que da lugar a diferentes isoformas proteínicas codificadas por un solo gen. Mediante este mecanismo se generan las variantes de 21kDa con 137 residuos de aminoácidos y de 25Kda con 241 residuos de aminoácidos, las cuales resultan de la eliminación de la secuencia correspondiente al exón 4 y de la no eliminación completa o incompleta de una secuencia intrón (Sinha & Gilligan, 1985; Emanuele et al., 1992), respectivamente (Fig. 4).

La PRL al igual que otras proteínas es sintetizada como una pro-hormona de 227 aminoácidos que contiene en su extremo amino-terminal un péptido señal de 28 aminoácidos, el cual es removido proteolíticamente a su paso por el retículo endoplásmico rugoso (RE) (Maurer et al., 1977)(Fig. 5).

Después de la síntesis, la PRL puede sufrir diversas modificaciones postraduccionales. Diversos fragmentos de la hormona, con actividades biológicas diferentes a las de la molécula original, son generadas mediante el corte por enzimas proteolíticas. En la rata, los fragmentos 16kDa y 6K de la PRL son originados mediante el corte enzimático entre los residuos de aminoácidos Tyr<sup>148</sup> y Ser<sup>149</sup> (Mitra, 1980a; Andries et al., 1992; Baldocchi et al., 1993) por acción de una proteasa lisosomal llamada Catepsina D



(Fig. 4, 5). El fragmento 16k de la PRL conserva acciones similares a las que se observan en la molécula original; tiene efectos mitogénicos *in vivo* en la glándula mamaria de la rata (Mitra, 1980b), en las células epiteliales del buche de paloma, así como en células Nb2 (Clapp et al., 1988) y es mitogénica y lactogénica en células del epitelio mamario en cultivo (Clapp et al., 1988). Además de estas acciones, y como ya se ha comentado anteriormente, el fragmento 16K de la PRL posee actividades que no comparte con ninguna otra variante molecular de la hormona. Dentro de estas actividades específicas se encuentran aquellas relacionadas con la inhibición *in vivo* e *in vitro* de la angiogénesis (Ferrara et al., 1991); (Martini et al., 2000); (Clapp et al., 1993); (Dueñas et al., 1999); (Struman et al., 1999) y con la estimulación de la síntesis de óxido nítrico y en la expresión de la isoforma inducible de la enzima óxido nítrico sintetasa en células pulmonares de la rata (Corbacho et al., 2000).

Otros fragmentos de PRL cuyo intervalo de tamaño varía entre los 21 y los 23.5 kDa (Fig. 4) (Sinha, 1992) son generados mediante el corte enzimático del monómero de PRL por una proteasa de serina parecida a la tripsina llamada calicreína, que se localiza principalmente en los gránulos de secreción y en el complejo de Golgi (Fig. 5). Esta enzima corta a la molécula en tres sitios cercanos al extremo carboxilo terminal: Arg<sup>174</sup>-Arg<sup>175</sup>, Lys<sup>185</sup>-Phe<sup>186</sup> y Arg<sup>188</sup>-Cys<sup>189</sup> (Powers & Hatala, 1990). La actividad biológica de cada uno de los fragmentos resultantes no se conoce a detalle, sin embargo se ha reportado que el fragmento de 22 kDa se produce de manera exclusiva en las hembras y se encuentra regulado por dopamina.

Otras variantes de PRL pueden resultar de la modificación postraduccional de la forma madura de la hormona. Entre estas se incluyen la glicosilación, la fosforilación, la formación de ésteres de azufre, la desaminación, la dimerización y la polimerización (Fig. 4, 5) (Shah & Hymer, 1989; Sinha, 1992, 1995; Freeman et al., 2000).

La glicosilación constituye una de las principales modificaciones postraduccionales que le ocurren al monómero de PRL (Lewis et al., 1984;

Pankov Yu & Butnev, 1986). El porcentaje de PRL glicosilada varía dependiendo de la especie así como del estado fisiológico en que se encuentre el individuo (Sinha et al., 1991; Sinha, 1995). En la rata se ha reportado que el 50% de la PRL presente en la circulación sistémica se encuentra glicosilada, mientras que el porcentaje de hormona glicosilada contenida en la adenohipófisis (AH) de estos animales es muy bajo (Champier et al., 1987). Las variantes N y O-glicosiladas se forman mediante la unión de una entidad de carbohidratos (ácido siálico, fucosa, manosa o galactosa) al residuo de Asp<sup>31</sup> a su paso por el RER o a residuos de serina y treonina en las cisternas del complejo de Golgi, respectivamente (Fig. 5). La glicosilación de la PRL generalmente trae como consecuencia una disminución en la actividad biológica de la hormona (Markoff et al., 1988), sin embargo existen evidencias que muestran que en algunas especies la glicosilación incrementa la actividad de la hormona (Pankov Yu & Butnev, 1986). La PRL glicosilada tiene un papel muy importante en la fisiología reproductiva, diversos trabajos han mostrado que ejerce efectos directos sobre la esteroidogénesis al actuar sobre las células granulosas del ovario (Cabrera et al., 1998). Asimismo se ha reportado que a través de la glicosilación se regula la biosíntesis, la secreción, la actividad biológica así como las propiedades farmacocinéticas y farmacodinámicas de la PRL (Sinha et al., 1991). Se ha propuesto que la ruta celular para la secreción de la PRL glicosilada es a través de una vía de secreción “constitutiva”, en contraste a lo que se observa en el caso de las variantes no glicosiladas, las cuales son secretadas a través de una vía de secreción “regulada” (Pellegrini et al., 1990).

La fosforilación de la PRL ocurre mediante la unión covalente de grupos fosfato a residuos de serina y de treonina, una vez que la hormona se encuentra contenida en los gránulos de secreción y justo antes de ser exocitados (Greenan et al., 1989) (Fig. 4, 5). Diversos trabajos han demostrado que la secreción de esta variante de PRL varía dependiendo del estado fisiológico en que se encuentre el animal. En la rata se han descrito

4 isoformas de PRL las cuales son atribuidas a la fosforilación de la hormona. La proporción de PRL fosforilada cambia durante las distintas fases del ciclo estral, así como durante la lactancia (Ho et al., 1993; Mena et al., 1993).

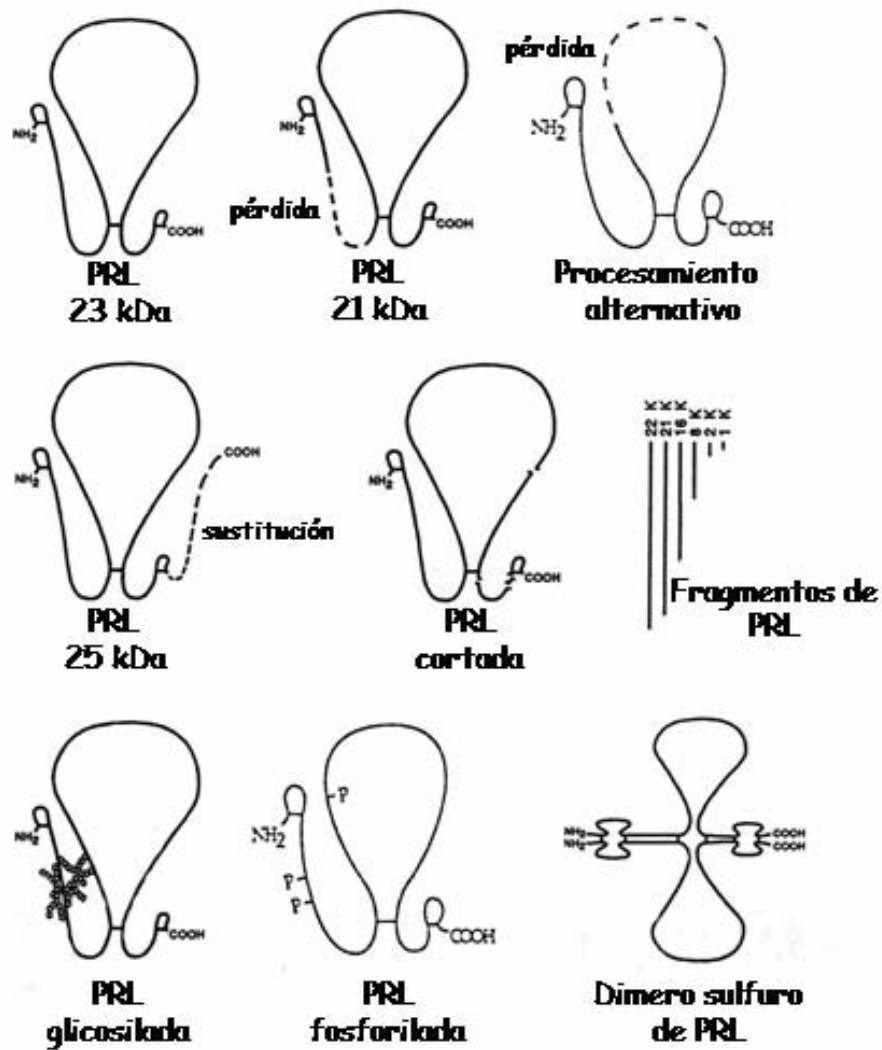


Fig. 4. Modificaciones pre y postraduccionales que le ocurren a la molécula de PRL (Tomada de Sinha, 1992, 1995).

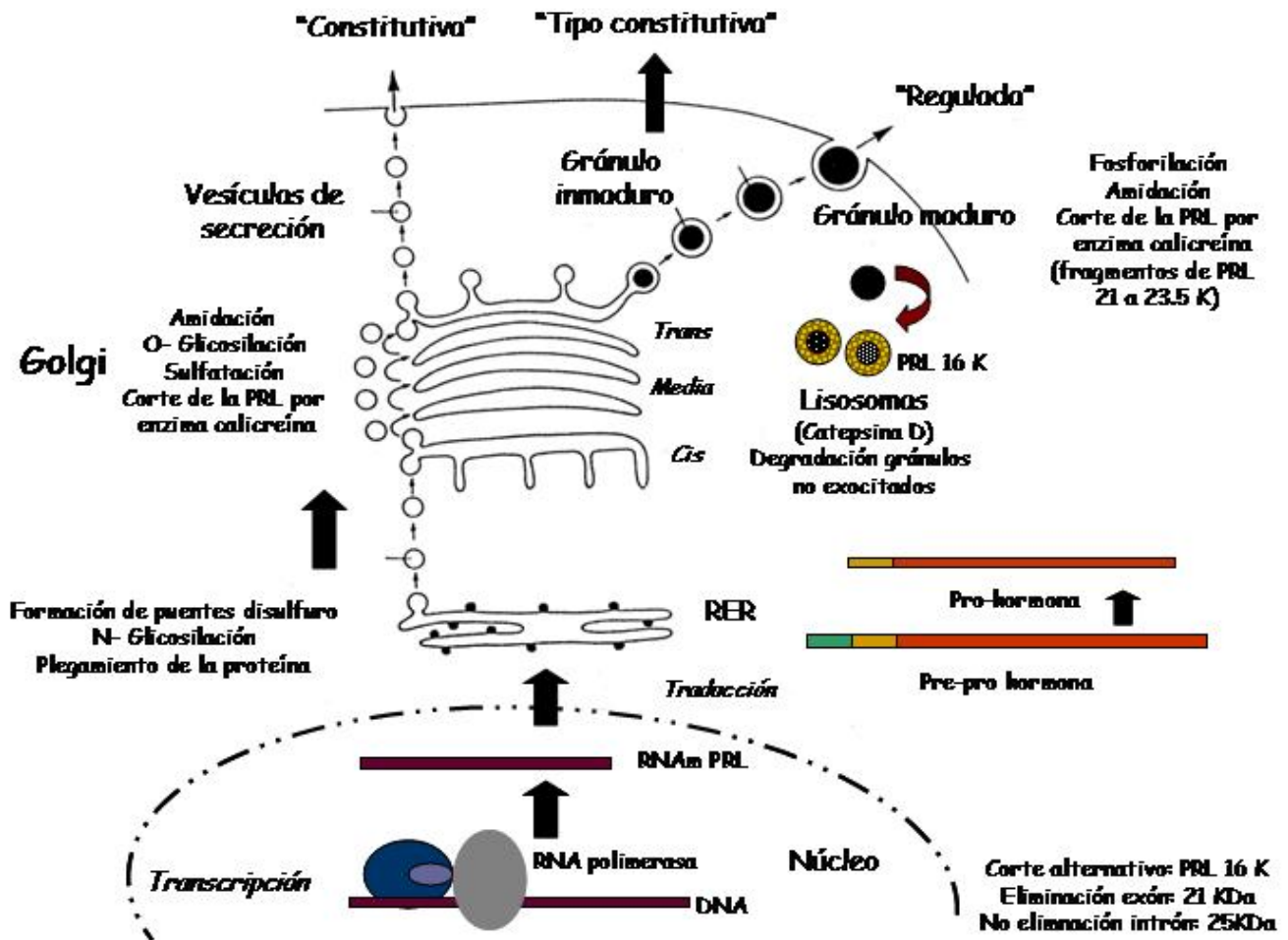


Fig. 5. Representación esquemática en donde se muestran los principales eventos intracelulares involucrados en la síntesis y procesamiento de la PRL, así como las modificaciones pre y postraduccionales que le pueden ocurrir a la hormona y los sitios en donde estos cambios ocurren.

Durante la lactancia la PRL es almacenada en una forma pre-liberable, la cual requiere de un proceso de transformación antes de ser secretada. Experimentos realizados en el laboratorio han mostrado que las moléculas de PRL almacenadas en los gránulos, mediante un mecanismo de intercambio tiol-disulfuro, sufren procesos de oxido-reducción pH-dependientes, que dan lugar a formas oligoméricas de alto peso molecular, indetectables al análisis por PAGE, RIA y bioensayo (Mena et al., 1986); (Grosvenor & Mena, 1974, 1982). Posteriormente, mediante un proceso de reducción, la hormona recupera la forma monomérica detectable que finalmente es la forma secretada. La formación de oligómeros de PRL de hasta 100 kDa de peso molecular, se deben a la asociación de moléculas de PRL monomérica unidas mediante puentes disulfuro (Mena et al., 1986; Mena et al., 1992). Al respecto, se ha mostrado que la dopamina (DA) inhibe la transformación de la PRL previniendo el intercambio tiol-disulfuro (Mena et al., 1992; Mena et al., 1993). Asimismo, todo este proceso le sucede de manera preferencial a la hormona madura y no a la recién sintetizada (Mena et al., 1984; Mena et al., 1989b). Por otro lado, se ha propuesto que la fosforilación de la PRL, inducida por el estímulo de la succión durante la fase de transformación de la PRL en ratas lactantes, contribuye en parte a explicar los cambios en la detectabilidad de la hormona durante esta etapa (Mena et al., 1993).

La PRL también puede sufrir un proceso de desaminación, a través del cual se pierde un grupo amonio en residuos de asparagina o glutamina, confiriéndole a la molécula una característica más ácida y reduciendo su actividad biológica e inmunológica, sin embargo el significado funcional de esta variante no ha sido esclarecido (Sinha, 1992, 1995).

Otro cambio postraduccional que le puede ocurrir a esta hormona es la unión de un grupo sulfato a residuos de tirosinas así como a la cadena de carbohidratos de la PRL glicosilada (Kohli et al., 1987, 1988).

En la AH y en la sangre se pueden encontrar formas de PRL de alto (45 kDa) y de muy alto peso molecular (>60 kDa) representadas por dímeros, polímeros, agregados de PRL y PRL unida a otras proteínas. Existen evidencias que demuestran que estas formas de alto y muy alto peso molecular se encuentran involucradas en los procesos de almacenamiento, transformación y liberación de la hormona (Mena et al., 1992). Algunas de estas formas moleculares pueden ser disociadas a monómeros mediante su tratamiento previo con urea y dodecil sulfato de sodio, sugiriendo que las uniones son a través de enlaces de tipo no covalente, mientras que otros agregados requieren de un agente reductor como el 2-mercaptoetanol para disociar las uniones a través de puentes disulfuro.

### **Mecanismo de acción de la PRL**

Los receptores de PRL y GH comparten diversas características estructurales y funcionales a pesar de la baja homología que existe en la secuencia de aminoácidos que los conforman (Goffin & Kelley, 1996) (30%). Los receptores a estas dos hormonas pertenecen a la superfamilia de receptores de citocinas tipo I. El receptor de PRL se caracteriza por poseer un dominio extracelular, un dominio transmembranal y uno intracelular. Se han descrito una gran variedad de isoformas del receptor de PRL en diferentes tejidos que difieren en cuanto a la longitud y composición de su cola citoplásmica, mientras que el dominio al cual se une el ligando es el mismo para todos los receptores. Las tres principales isoformas del receptor de PRL en la rata son la corta, la intermedia y la larga formadas por 291, 393 y 591 residuos de aminoácidos, respectivamente (Bole-Feysot et al., 1998).

La PRL se une secuencialmente a dos moléculas de su receptor, causando su dimerización y cambios estructurales importantes. Cada molécula de PRL posee dos sitios de unión al receptor que se localizan en

las hélices 1 y 4 (sitio de unión 1) y en las hélices 1 y 3 (sitio de unión 2). Todos los receptores de citocinas trabajan en combinación con 1 o varias proteínas de la familia tirosin-cinasa para transmitir la señal hormonal dentro de la célula. En el caso particular de la PRL la proteína JAK 2 se encuentra asociada al dominio intracelular del receptor de PRL y cuando se activa por unión de la PRL a su receptor produce la fosforilación de residuos de tirosina en un gran número de proteínas celulares (STAT) incluyendo al receptor mismo (Fig. 6). Una vez fosforiladas las proteínas celulares STAT 1, 3 y 5 se disocian del receptor y se unen a otras proteínas formando homodímeros o heterodímeros que son translocados al núcleo, en donde se unen con el DNA, activando la transcripción de genes blanco (fig. 6) (Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000).

Diversos estudios, han mostrado que el receptor de PRL es susceptible de ser activado por otras formas moleculares, además del monómero de PRL. Trabajos realizados *in vitro*, reportan que dímeros de PRL, unidos mediante puentes disulfuro, poseen la capacidad de unirse a receptores de PRL localizados en la glándula mamaria y ejercer acciones biológicamente activas (Schneider et al., 1977). Asimismo, se ha mostrado que dímeros obtenidos mediante recombinación genética poseen la capacidad de inducir la dimerización del receptor de PRL. Los resultados de dicho estudio sugieren que la efectividad en la unión de dichos ligandos al receptor, se condiciona a la presencia de al menos dos sitios funcionales de unión del ligando con el receptor de PRL, mientras que la influencia del tamaño del ligando en la activación del receptor parecería ser menos importante, sugiriendo con ello que la porción extracelular del receptor de PRL muestra cierto grado de flexibilidad y es capaz de acomodar moléculas de mayor tamaño (Langenheim et al., 2006).



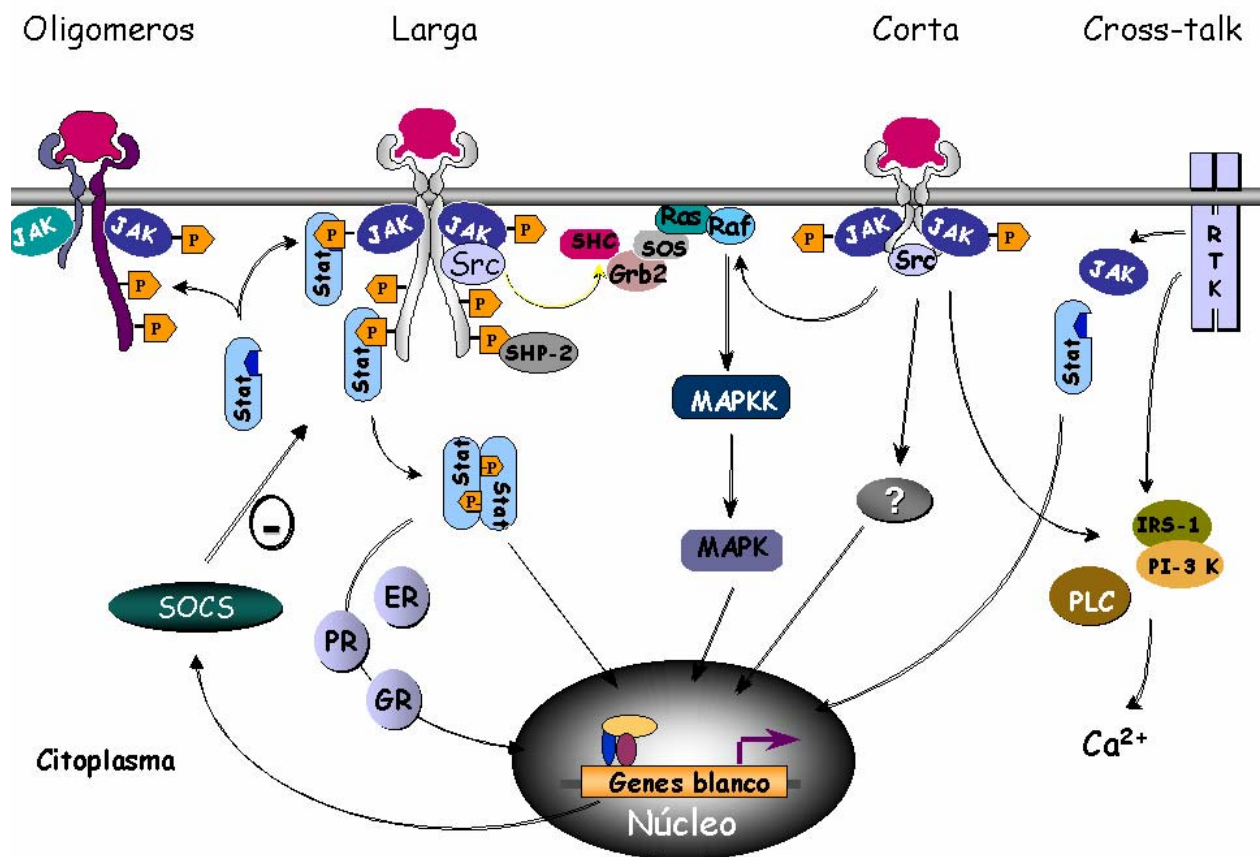


Fig. 6. Representación esquemática en donde se muestran las isoformas corta y larga del receptor de PRL (PRL-R), así como las principales vías de señalización activadas por el PRL-R. El PRL-R una vez activado fosforila a proteínas STAT, las cuales se unen a proteínas citoplásmicas (ER, PR, GR) para ser translocadas al núcleo, en donde actúan activando la transcripción de genes blanco. En la vía intracelular de la MAP cinasa (MAPK) participan proteínas como la Shc, Grb<sub>2</sub>, Sos, Ra, Raf. Asimismo se ha descrito la activación de miembros de la familia Fyn y Src cinasa (Modificada de Bole-Feysot et al., 1998).

Aunque la cascada JAK/STAT es probablemente la vía intracelular más importante de señalización usada por receptores de citocinas, diversos trabajos han reportado la activación de la vía MAP cinasa (Vía Ras/Raf/MAP cinasa), así como la activación de miembros de la familia Fyn y Src cinasa (Berlanga et al., 1995; Freeman et al., 2000). Asimismo, se ha descrito que dos regiones del receptor de PRL se encuentran involucradas en la regulación de canales iónicos de K<sup>+</sup> y Ca<sup>2+</sup> (Colbran & Soderling, 1990; Prevarskaya et al., 1995; Ratovondrahona et al., 1998; Sorin et al., 1998; Freeman et al., 2000).

Los receptores a PRL se encuentran ampliamente distribuidos en todo el organismo. Dentro del sistema nervioso central, se ha identificado la expresión del ARN mensajero que codifica principalmente para la isoforma larga en los plexos coroides, el núcleo lecho de la estría terminal, el tálamo, el hipotálamo, la corteza cerebral, el cuerpo caloso, el estriado y el bulbo olfatorio, así como en células gliales y astrocitos (Freemark et al., 1995; Freemark et al., 1996). Asimismo, se encuentra presente en un gran número de estructuras periféricas tales como la hipófisis, el ovario, la glándula mamaria, el corazón, los pulmones, el timo, el bazo, células del sistema inmunológico, páncreas, riñón, glándula suprarrenal, útero, músculo esquelético y piel entre otros (Ben-Jonathan et al., 1996; Bole-Feysot et al., 1998; Freeman et al., 2000).

### **Síntesis y Secreción de PRL**

La PRL es sintetizada y secretada principalmente por células especializadas localizadas en el lóbulo anterior de la glándula hipófisis denominadas lactotropos. Adicionalmente a los lactotropos, se ha descrito la presencia, en una gran variedad de especies, de un tipo celular bihormonal denominado mamosomatotropo, el cual es capaz de sintetizar y secretar de manera paralela tanto PRL como GH. Adicionalmente, la PRL puede ser sintetizada por otros tipos celulares en otros tejidos además de

la hipófisis, entre los que se incluyen a las células deciduales del endometrio, células del miométrio, células del epitelio mamario, células del sistema inmune, células linfoides de la médula ósea, neuronas del núcleo arcuato, supraóptico, paraventricular dorsomedial y ventromedial (Fuxe et al., 1977; Toubeau et al., 1979; Harlan et al., 1989), células epiteliales de la glándula lagrimal y sudorípara, así como por fibroblastos en la piel (Ben-Jonathan et al., 1996).

### *Gen*

El gen que codifica para la PRL se encuentra localizado en el cromosoma 6 en humanos, 17 en la rata y 13 en el ratón. Inicialmente se pensaba que el gen hPRL tenía 10kb y que se encontraba compuesto por 5 exones y 4 intrones (Truong et al., 1984), sin embargo, actualmente, se ha reportado que posee en tamaño 15kb y una secuencia exón adicional (exón Ia), no antes descrita (Hiraoka et al., 1991), la cual codifica para secuencias de ribonucleótidos presentes solo en el ARN mensajero de la placenta. El exón I codifica para una parte del péptido señal, mientras que el exón II codifica para el resto del péptido señal y para los primeros 40 aminoácidos de la proteína madura. Por su parte los exones III y IV codifican para los aminoácidos 41-76 y 77-136, respectivamente. Finalmente el exón V codifica para el resto de los aminoácidos de la proteína y contiene el codón de paro (Neill & Nagy, 1994).

El gen de la PRL es regulado a nivel transcripcional en dos distintas regiones promotoras. La región promotora proximal está localizada aproximadamente a 5 kb por arriba del sitio de transcripción, mientras que la segunda región se localiza 5.8kb por arriba del sitio de inicio de la transcripción. De esta manera, dependiendo de la región promotora en la cual se inicie la transcripción, se obtienen distintos ARNs mensajeros de la PRL, los cuales difieren en tamaño por 134bp, pero que codifican para la misma proteína madura (Goffin et al., 2002).

### *Eventos intracelulares involucrados en la síntesis de PRL*

Una vez que el ARN mensajero ha madurado en el núcleo, éste es liberado al citoplasma y es traducido por los ribosomas. La PRL, al igual que muchas otras proteínas, es sintetizada como una pre-hormona de aproximadamente 227 aminoácidos que contiene una secuencia denominada “péptido señal”. Dicha secuencia señal dirige al complejo ribosoma-ARNm para adherirse al RER y facilita la translocación de la proteína al espacio intracisternal del RER para su procesamiento y almacenamiento. Los 28 aminoácidos del péptido señal son escindidos mediante un proceso proteolítico en el RER, lugar en donde también la PRL puede sufrir diversas modificaciones postraduccionales, tales como la formación de puentes disulfuro, entre otras. Posteriormente los productos sintetizados son transportados a través de los diferentes compartimentos y subcompartimentos del complejo de Golgi en donde la hormona además de sufrir modificaciones postraduccionales, *vgr.* glicosilación, amidación, etc., es procesada, empaquetada, concentrada y seleccionada en gránulos de secreción. El grado de maduración que alcanzan los gránulos antes de ser secretados así como su tamaño, forma, dinámica de secreción y destrucción crinofágica, se encuentra regulado por un gran número de factores que varían dependiendo del contexto fisiológico en que se encuentre el animal.

El estudio de los mecanismos celulares implicados en la biosíntesis de la PRL en los lactotropos ha servido como modelo para el entendimiento y conocimiento en general de los procesos fisiológicos y celulares involucrados en la secreción de las hormonas AHs. En el laboratorio se ha usado a la rata lactante como modelo de para conocer más acerca de los mecanismos fisiológicos involucrados en la regulación de la síntesis y secreción de PRL. Por otro lado, otros grupos de investigación han escogido como modelo a la rata estrogenizada para estudiar los procesos de síntesis y secreción de PRL así como los cambios citológicos ultraestructurales *vgr.*

agrandamiento y desarrollo del aparato de Golgi y del RER que ocurren en esta situación experimental.

Farquhar en 1978, realizó un estudio morfológico usando técnicas de microscopía electrónica y autorradiografía para estudiar el transporte intracelular de la PRL en células dispersas de AH de ratas hembras tratadas con inyecciones subcutáneas de 17- $\beta$  estradiol (10-20  $\mu$ g-100 g de peso) por 6 días. A partir de sus resultados y observaciones propone en un esquema presentado en la Fig. 7, los pasos que estarían involucrados en el procesamiento intracelular de la PRL desde el momento en que es sintetizada en el RER hasta el momento en que la hormona marcada es secretada hacia el espacio extracelular (Farquhar et al., 1978). En este estudio Farquhar y cols describen que aproximadamente 15 a 20 minutos después del pulso radioactivo la marca se localiza en la cara *trans* del complejo de Golgi (paso 4a en Fig. 7), mientras que entre 55 a 115 minutos después del pulso, la marca se encuentra asociada de manera sucesiva a cuatro tipos diferentes de gránulos (tipo I a IV) que varían entre si dependiendo de su tamaño, forma y grado de maduración (Fig. 8). Así, la marca se encuentra 1, 2 y 3 horas después de haber sido administrado el pulso, en los primeros gránulos inmaduros formados (paso 4b en Fig. 7), en agregados de gránulos (paso 4b y 4c en Fig. 7) y en gránulos ya maduros, respectivamente (paso 5 en Fig. 7). En cuanto al tiempo que debe transcurrir antes de la secreción de la hormona, se ha reportado por este mismo grupo de trabajo, así como por otros, que la liberación de PRL recién sintetizada sucede entre 45 min y 2 horas posteriores a la marca radioactiva y que alcanza su pico máximo 2 a 3 horas después del pulso (Labrie et al., 1973; Farquhar et al., 1978).

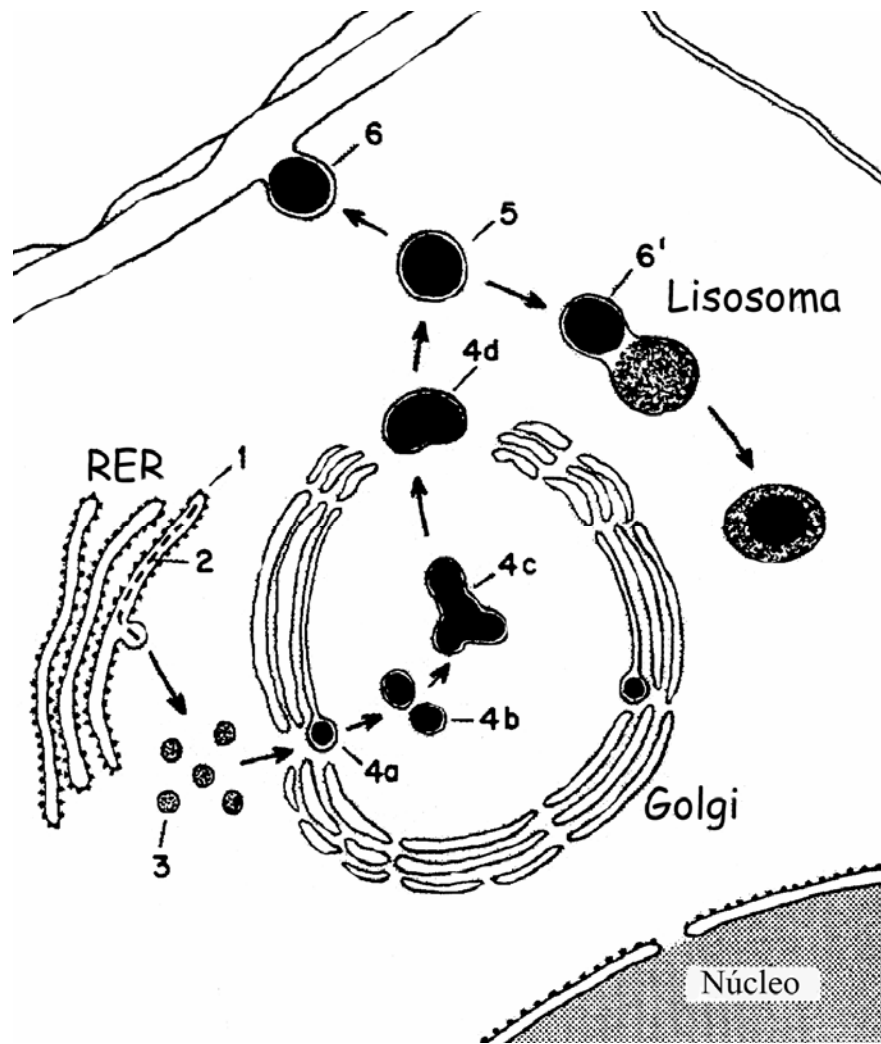


Fig. 7. Esquema que ilustra los pasos involucrados en el procesamiento intracelular de la PRL en ratas hembras tratadas con 17- $\beta$  estradiol mediante la técnica de autorradiografía. 5 min posteriores al pulso radioactivo, la hormona se localiza en el retículo endoplásmico rugoso (RER) (paso 1), inmediatamente después, ésta es translocada al espacio intracisternal del RER para su procesamiento y almacenamiento (paso 2). Pequeñas vesículas de secreción son transportadas desde el RER hacia el Golgi (paso 3). La marca se localiza en los primeros gránulos de secreción en la cara *trans* del Golgi después de 20 min (paso 4a). Al partir del Golgi (paso 4b), varios de ellos se fusionan entre sí (paso 4c) formando un gránulo de forma redondeada (paso 4d) el cual contiene a la hormona marcada después 2 hs. Finalmente después de 3 hs se forma un gránulo maduro, el cual contiene a la hormona en una forma estable, concentrada y madura (paso 5). Durante una fase de secreción activa el gránulo es exocitado (paso 6), pero si ocurre una inhibición en la secreción, éstos se fusionan con lisosomas para que el exceso de gránulos secretores sea digerido, proceso conocido como crinofagia (paso 6'). (Tomada de Farquhar et al., 1978).

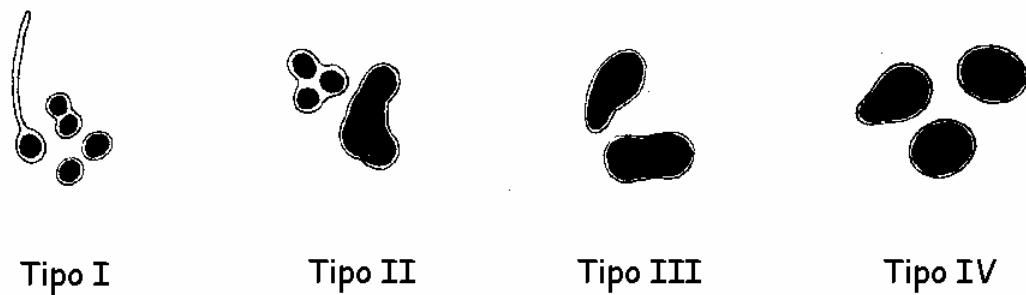


Fig. 8. Esquema que ilustra la transición de los diferentes tipos de gránulos de secreción encontrados en células secretoras de PRL. El tipo I se refiere a gránulos pequeños (100-200 nm) e inmaduros de forma redondeada que se localizan ya sea dentro de la cisterna del aparato de Golgi o asociados a ésta. El tipo II se refiere a gránulos polimórficos de mayor tamaño que se forman por la fusión de varios gránulos inmaduros. Los gránulos de tipo III son formas intermedias que no presentan gran variabilidad como el tipo II, pero son menos regulares que el tipo IV. Este último tipo de gránulos se caracterizan por contener a la hormona en una forma madura, su forma es redondeada u ovoide y miden alrededor de 600 a 900 nm de diámetro (Tomada de Farquhar et al., 1978).

Durante la lactancia ocurre un incremento constante en la síntesis y secreción de PRL, la cual es necesaria para dar inicio y mantener la secreción de leche. Este incremento se refleja en cambios a nivel estructural en las células secretoras de esta hormona, los cuales se comentan a continuación en detalle. En general, los lactotropos de ratas lactantes son muy diferentes a los de animales no lactantes. Dentro de sus principales características se encuentran las de poseer un RER altamente desarrollado y localizado principalmente en la periferia, un complejo de Golgi yuxtannuclear muy grande y dilatado así como una gran cantidad de gránulos maduros y en formación, los cuales ocupan una gran área en el citoplasma de la célula (Smith & Farquhar, 1966).

La producción de gránulos de secreción en una rata lactante es un proceso secuencial en el cual se encuentran involucrados distintos pasos:

- 1) Pequeños gránulos de secreción son formados por condensación de material de secreción dentro de la cisterna interna del Complejo de Golgi,
- 2) los cuales migran hacia el centro, del complejo de Golgi en donde
- 3) varios de ellos (de 3 a 5) se unen formando un agregado grande y polimórfico
- 4) que posteriormente adquiere una forma redondeada u ovoide
- 5) Asimismo, la hormona se condensa convirtiéndose en gránulos maduros (Smith & Farquhar, 1966).

Cuando las ratas lactantes son separadas de sus crías se observa que durante las primeras 10 a 12 horas posteriores a la separación ocurre una acumulación de gránulos de secreción maduros en la periferia de la células seguido por una involución progresiva del RER y del complejo de Golgi (24-48 hrs), así como un decremento e incremento gradual en el número de gránulos maduros e inmaduros y en el número de cuerpos líticos, respectivamente (24-72 hrs).

La exocitosis de gránulos de PRL ha sido analizada mediante técnicas de microscopía electrónica por diversos grupos de investigación (Grosvenor & Turner, 1958; Sano, 1962; Pasteels, 1963). Dichos estudios han mostrado que ocurre una migración de los gránulos hacia la membrana citoplásmica, seguida por una fusión de la membrana



lipoproteica del gránulo con la membrana celular manteniéndose de esta manera su integridad. Posteriormente el contenido hormonal es descargado y disuelto lentamente hacia el espacio perisinusoidal para penetrar mediante pinocitosis a los capilares sanguíneos (Grosvenor & Turner, 1958; Sano, 1962; Pasteels, 1963). Después de 24 hs de que se presenta una inhibición de la secreción de PRL, los gránulos se fusionan con lisosomas para que el exceso de gránulos de secreción sea digerido, proceso conocido como crinofagia.

### *Secreción de PRL*

La secreción de PRL es un fenómeno muy complejo que resulta de la interacción de influencias tanto estimuladoras como inhibitoras. La secreción de esta hormona puede ocurrir a través de una vía de secreción de tipo “regulada” característica del animal lactante en donde la hormona es almacenada y concentrada en gránulos antes de ser secretada sólo por acción de secretagogos específicos (Mena et al., 1989a). Los tipos celulares que poseen un tipo de secreción regulada, pueden también poseer una vía alterna para la secreción de proteínas, vía “constitutiva”. Mediante esta vía, los productos de secreción no son concentrados en gránulos ni almacenados en el citoplasma de la célula, sino que éstos son secretados de manera constitutiva o continua hacia el exterior de la célula (Fig. 9). La secreción de proteínas a través de una vía de secreción regulada se distingue de la secreción constitutiva en 3 aspectos principalmente. En la vía de secreción regulada, la secreción se encuentra acoplada a un estímulo extracelular. Dependiendo del tipo celular específico, la exocitosis puede ser desencadenada por una variedad de estímulos fisiológicos, los cuales eventualmente conducen a un incremento transitorio en el  $Ca^{2+}$  intracelular o de algún otro segundo mensajero. La segunda característica que distingue la secreción regulada de la constitutiva, se relaciona con la concentración y condensación de los productos de secreción en organelos

especializados, recubiertos por una doble membrana, los gránulos de secreción. Finalmente, los tipos celulares que secretan sus productos a través de una vía regulada, almacenan productos de secreción por períodos prolongados de tiempo, lo cual significa que existe un gran pool intracelular de gránulos maduros de secreción (Burgess & Kelly, 1987). En el caso particular de la PRL, Larson y Wise demostraron que el incremento tanto en la transcripción del gen de PRL como en la secreción de esta hormona inducido por estradiol no se suprime al administrar nifedipina (bloqueador de canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ), sugiriendo con ello que la secreción de esta hormona bajo efecto estimulador de los estrógenos es a través de una vía constitutiva (Larson & Wise, 1994). Por otra parte, Pellegrini y cols reportaron que células de prolactinomas humanos en cultivo secretan las variantes no glicosiladas y glicosiladas de PRL a través de una vía de secreción de tipo regulada y constitutiva, respectivamente (Pellegrini et al., 1990).

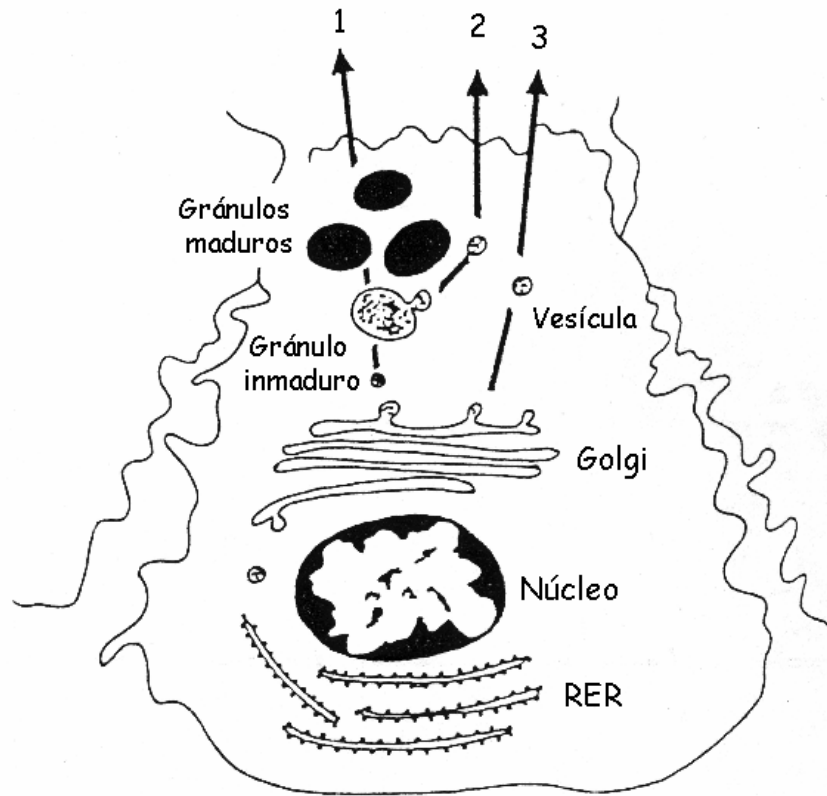


Fig. 9. Esquema que muestra las diferentes vías intracelulares que existen para la exportación de los productos de secreción en una célula acinar de la glándula parótida. Una vez que los productos han sido sintetizados en forma de gránulos inmaduros, éstos pueden fusionarse entre sí y formar eventualmente un gránulo maduro el cual es exocitado bajo la acción de secretagogos específicos a través de una vía de secreción “regulada” (1). Alternativamente, del gránulo inmaduro pueden desprenderse pequeños gránulos de secreción y ser exocitados a través de una secreción de “tipo constitutivo” (2). Mientras que a través de la vía de secreción “constitutiva” se liberan los productos de una forma continua sin ser almacenados en el interior de la célula (3) (Tomado de Proctor, 1998).

La secreción de PRL varía dependiendo del sexo y la edad, del ciclo luz-oscuridad, así como durante las distintas etapas del ciclo reproductor de los mamíferos. En el ciclo estral de la rata, la concentración plasmática de PRL se mantiene baja y constante desde la tarde del estro hasta la mañana del siguiente proestro. Durante la tarde del proestro ocurre un pico preovulatorio en la secreción de PRL que coincide con un incremento en la concentración plasmática de hormona luteinizante (Smith et al., 1975), progesterona y hormona folículo estimulante (Neill & Nagy, 1994). El incremento en la secreción de PRL se encuentra precedido y es estimulado directa o indirectamente por la concentración plasmática de estrógenos (Neill & Nagy, 1994). Asimismo, diversos trabajos en los cuales se han producido lesiones en el área preóptica del hipotálamo han demostrado la participación de esta estructura en el incremento de PRL inducido por estrógenos (Pan & Gala, 1985).

La estimulación cervical producida durante el coito, induce que las concentraciones plasmáticas de PRL aumenten dos veces por día, durante los primeros 10 a 11 días del embarazo. A partir de estudios en los cuales se ha lesionado o estimulado el área preóptica se ha propuesto que el incremento de PRL inducido por la cópula se encuentra regulado por dos grupos neuronales localizados en dicha área hipotalámica (Freeman & Banks, 1980; Gunnet & Freeman, 1984, 1985). A partir del día 11 de embarazo, la concentración plasmática de PRL se mantiene baja hasta uno o dos días antes del parto, cuando ocurre un incremento significativo en la concentración de esta hormona. Este incremento parece ser ocasionado por el aumento y la disminución en la secreción de estrógenos y progesterona, respectivamente que tienen lugar en dicha fase (Little & Billiar, 1983).

Durante la lactancia, última fase del ciclo reproductor de los mamíferos, la secreción de PRL como ya se ha comentado anteriormente se encuentra regulada por el estímulo de la succión y por señales de tipo exteroceptivo provenientes de las crías (Grosvenor & Mena, 1974). El efecto

de la succión sobre la secreción de PRL consiste en una depleción inicial rápida (1 a 2 minutos) y extensa (15-60  $\mu\text{g}$ ) de la hormona contenida en la AH que no se refleja en la cantidad de PRL liberada durante dicho período (2-3  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ). Después de ser depletada, la PRL AH se reacumula lentamente (repleción), hasta alcanzar los niveles previos a la succión. El grado de depleción se encuentra directamente relacionado con el número de crías y con la duración del intervalo anterior de no succión. Por otro lado, la repleción es un proceso lento, inversamente relacionado con la duración del intervalo de no succión, pero en relación directa con la intensidad de la misma (Grosvenor & Mena, 1971). Durante la fase de depleción-transformación la PRL hipofisiaria es indetectable al análisis por PAGE, RIA y bioensayo (Grosvenor & Mena, 1974, 1982).

Dado que existe una discrepancia entre la gran cantidad de hormona que se depleta en la AH al inicio de la succión y la pequeña cantidad de hormona que es secretada durante el mismo período, se ha sugerido que la depleción de la hormona en la AH representa la transformación de la misma de una forma pre-liberable a una forma liberable (Grosvenor et al., 1979). Diversos autores han estudiado el papel que ejercen factores hipotalámicos estimuladores e inhibidores sobre cada una de las fases del proceso de secreción de la PRL. Al respecto se sabe que tanto la fase de depleción-transformación como la de repleción de la hormona son inhibidas por la dopamina (DA) y por el agonista dopaminérgico bromocriptina, mientras que la fase de liberación es poco inhibida por estos agentes. Por el contrario el factor estimulante de tirotrófina o TRH ejerce sus efectos sobre la secreción de PRL estimulando la fase de liberación de la hormona y no tiene ningún efecto sobre la fase de depleción-transformación de la hormona (Grosvenor & Mena, 1980; Grosvenor et al., 1980). A partir de estudios realizados *in vitro* sobre la dinámica de secreción de la PRL se ha mostrado que solo la hormona que ha sido sintetizada 4 a 8 horas antes es susceptible de ser transformada y liberada, mientras que las hormonas con menos de 4 hrs o aquellas de 16

a 24 hrs de edad son retenidas o degradadas, respectivamente (Mena et al., 1984). Asimismo, se ha observado que la intensidad de las acciones estimuladoras e inhibitoras de la hormona liberadora de tiotropina (TRH) y la DA, respectivamente sobre la secreción de PRL varía dependiendo de la edad de la hormona almacenada (Mena et al., 1989b).

Stachura y cols han reportado que tanto la GH como la PRL de rata pueden ser procesadas intracelularmente para ser almacenadas dentro de la célula o para ser liberadas una vez que han sido sintetizadas (Stachura & Tyler, 1986; Stachura et al., 1989). Diversos autores han sugerido que la PRL recién sintetizada es secretada de manera preferencial sobre la hormona madura contenida en gránulos de secreción. Walker y cols demostraron mediante doble marcaje radioactivo de la PRL y microscopía electrónica en cultivos primarios de AH de ratas estrogenizadas la existencia de dos subpoblaciones de lactotopos con diferencias funcionales entre ellos. Una de las subpoblaciones libera de manera preferencial gránulos de PRL recién sintetizados, los cuales son secretados dentro de los primeros 30 minutos posteriores al pulso radioactivo, mientras que la otra subpoblación de lactotopos no responsivos a TRH sintetizan, procesan y secretan a la hormona con una tasa de secreción mucho más alta (Walker & Farquhar, 1980). Sin embargo otros grupos de investigación han reportado la liberación preferencial de la hormona madura contenida en gránulos de secreción (Sharoni et al., 1976).

## **CAPITULO II**

### **REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PRL ADENOHIPOFISIARIA**

La regulación de la secreción de PRL es un fenómeno muy complejo que implica la interacción de influencias hipotalámicas estimuladoras e inhibitoras con influencias provenientes de la circulación sistémica general, y con otras generadas tanto en el lóbulo posterior como neurointermedio de la hipófisis, como de factores producidos localmente por las células AHs, y capaces de ejercer tanto acciones autócrinas como parácrinas.

#### *Factores Sistémicos e Hipotalámicos*

La hipótesis de que la secreción de hormonas AHs se encontraba regulada por influencias estimuladoras e inhibitoras provenientes del hipotálamo y transportadas a la AH a través del sistema porta hipotálamo-hipofisiario, así como por mecanismos de retroalimentación positiva y negativa activados por la concentración periférica de hormonas secretadas por glándulas blanco, fue propuesta y desarrollada por Geoffrey Harris hacia 1945 (Harris, 1960).

Por otra parte, Everett observó que cuando se interrumpía quirúrgicamente la conexión entre el hipotálamo y la hipófisis ocurría un incremento prolongado en la secreción de PRL, por lo que postuló la existencia de un factor hipotalámico que era capaz de inhibir la secreción de PRL (Everett, 1954, 1956). Posteriormente otros grupos de trabajo demostraron que la administración de fármacos que alteraban el metabolismo de las catecolaminas influía sobre la secreción de PRL (MacLeod, 1969,) que la DA se encontraba presente en muy altas

concentraciones en la eminencia media (Fuxe, 1965) y que en la AH existían receptores a DA (Goldsmith et al., 1979).

Con base en las observaciones anteriores, se ha considerado a la DA como la neurohormona más importante en el control homeostático de PRL. Este papel se lleva a cabo por una interacción de retroalimentación recíproca entre la hipófisis y el sistema tuberoinfundibular dopaminérgico, debido a que un decremento en los niveles de DA provoca un aumento en la secreción de PRL, la cual a su vez, estimula la liberación de DA y así antagoniza el cambio inicial en la tasa de la liberación de PRL (Kordon et al., 1985). Aunque existen evidencias que señalan a la DA como un inhibidor específico de la secreción de PRL, se ha demostrado que este factor también puede inhibir la secreción tanto de GH (Cronin & Evans, 1983) como de la Hormona Estimulante de la Tiroides (TSH) (Foord et al., 1980).

Las neuronas dopaminérgicas se localizan dentro de la llamada área hipofisiotrófica del hipotálamo, en tres diferentes sitios. Las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares localizadas en la porción dorsomedial del núcleo arcuato proyectan hacia la eminencia media, mientras aquellas que se localizan en la parte más rostral del mismo núcleo pertenecen al sistema dopaminérgico tuberohipofisario y proyectan de manera preferencial al lóbulo neural y neurointermedio de la hipófisis (Holzbauer et al., 1978; Holzbauer & Racke, 1985). Asimismo, existen neuronas dopaminérgicas localizadas en el núcleo periventricular cuyos axones terminan en el lóbulo neurointermedio (Fig.10).

El efecto de la DA sobre los lactotrofos depende de la inhibición en la enzima adenilato ciclasa, la cual se encuentra acoplada a los receptores  $D_2$  localizados en la membrana del lactotrofo, de la inhibición del metabolismo del fosfato de inositol y de la excitación e inhibición de canales iónicos de  $K^+$  y  $Ca^{++}$ , respectivamente (Ben-Jonathan, 1985; Freeman et al., 2000).



El estradiol ( $E_2$ ) es otro regulador fisiológico muy importante en la secreción de PRL. Maurer y colaboradores en 1982, demostraron que el efecto del  $E_2$  sobre la transcripción del gen de PRL en ratas hembras ovariectomizadas se ejerce a través de un incremento en la concentración de los precursores nucleares del ARN mensajero de la PRL, los cuales incrementan hasta 4 ó 5 veces 24 horas después de la inyección de  $17-\beta$  estradiol (Lieberman et al., 1978; Maurer, 1982).

En diversas áreas del sistema nervioso central, entre las que se incluyen diversos núcleos hipotalámicos, se sintetizan y secretan una gran diversidad de factores que han sido implicados en la regulación de la secreción de PRL (Fig. 10). Entre algunos de los factores conocidos que estimulan la secreción de esta hormona se encuentran el TRH (Grosvenor & Mena, 1980; Freeman et al., 2000), el péptido intestinal vasoactivo (Kato et al., 1978), la angiotensina II (AII) (Denef & Andries, 1983), las  $\beta$  endorfinas, la oxitocina (Pan & Mai, 1990; Samson & Schell, 1995), la galanina (Drouhault et al., 1994), la neurotensina (Enjalbert et al., 1982), y la serotonina entre otras, mientras que la somatostatina (Drouin et al., 1976; Dorflinger & Schonbrunn, 1983), la calcitonina (Epand et al., 1989; Morel et al., 1989; Judd et al., 1990), la epinefrina, la acetilcolina y el GABA inhiben la secreción de PRL (Lamberts & Macleod, 1990).

#### *Factores provenientes del lóbulo posterior y neurointermedio*

Asimismo, diversos factores provenientes del lóbulo posterior (LP) y neurointermedio (NI) de la hipófisis pueden estimular o inhibir la liberación de PRL a través de su paso por los vasos portales cortos (Nagy et al., 1991) (Fig. 10). Se han identificado hormonas liberadoras e inhibidoras como el TRH, la somatostatina, la DA, hormonas con actividad corticotrópica y encefalinas en altas concentraciones en el LP de la hipófisis (Saffran et al., 1955 en Ben-Jonathan & Peters, 1982). Ben-Jonathan y cols han estudiado los mecanismos implicados en el

incremento de PRL inducido por la succión y proponen, con base en sus resultados, que tanto la DA presente en el LP como la secreción de un factor liberador de PRL (PRF), el cual es sintetizado probablemente por los melanotropos en el lóbulo NI, tienen un papel fundamental en la regulación de la secreción de PRL. Aunque la estructura química de PRF no ha sido totalmente caracterizada por este grupo de investigación, al parecer este péptido posee un peso molecular menor a los 5000 Da que es distinto a los secretagogos conocidos como la oxitocina, hormona antidiurética, TRH y AII (Hyde & Ben-Jonathan, 1989). Sin embargo, estas observaciones no han sido confirmadas ya que Mena y cols en 1996 demostraron que la lobectomía posterior no bloquea el incremento de PRL inducida por la succión, pero si puede tener un efecto parcial en la liberación de PRL y puede determinar la regionalización en la secreción de esta hormona (Mena et al., 1996).

Los trabajos realizados por Stephen Frawley y cols en 1992, han demostrado la importancia del lóbulo NI en la regulación de la secreción de PRL y han propuesto que la Hormona Estimulante de los Melanocitos alfa ( $\alpha$ -MSH) es liberada durante el estímulo de la succión, provocando cambios funcionales en las distintas subpoblaciones de lactotropos contenidos en la glándula (Porter & Frawley, 1992).

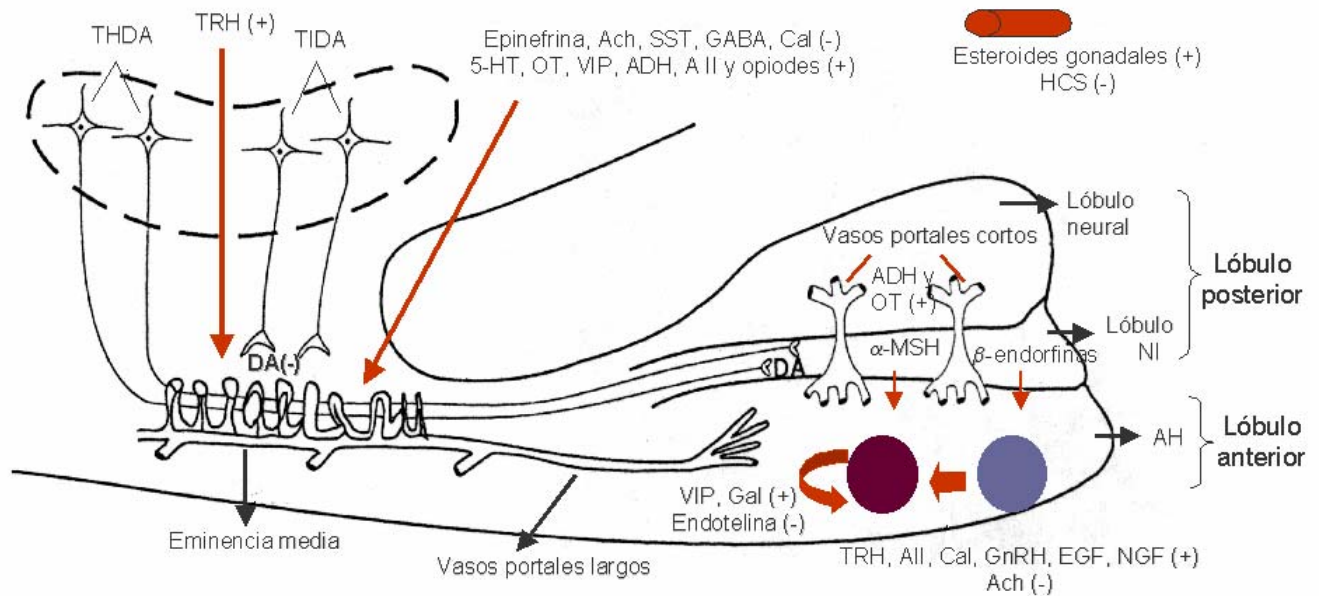


Fig. 10. Esquema que muestra los principales factores provenientes de la circulación sistémica, del hipotálamo, del lóbulo posterior y neurointermedio (NI), y producidos localmente en la adenohipofisis (AH) que estimulan (+) e inhiben (-) la secreción de PRL. HCS: Hormonas cortico-suprarrenales; Ach: Acetilcolina; SST: Somatostatina; Cal: Calcitonina; 5-HT: Serotonina; OT: Oxitocina; VIP: Péptido intestinal vasoactivo; ADH: Hormona antidiurética; AII: Angiotensina II, TRH: Hormona liberadora de tirotrifinas; DA: Dopamina; Gal: Galanina; GnRH: Hormona liberadora de gonadotropinas, EGF: Factor de crecimiento epidérmico; NGF: Factor de crecimiento neural (Modificado de Neill & Nagy, 1994).

## *Factores autócrinos y parácrinos*

El estudio de interacciones autócrinas y parácrinas en la AH que influyen en la secreción de otras hormonas con acciones fisiológicas extrahipofisarias ha sido el objeto de estudio de un gran número de grupos de investigación en los últimos 15 años. Con ayuda de los nuevos avances tecnológicos se han desarrollado novedosas técnicas que han permitido realizar la separación de los distintos tipos celulares contenidos en la glándula, e identificar sus productos de secreción, así como la interacción de los distintos tipos celulares contenidos en la glándula.

Hasta el momento se han generado una gran cantidad de trabajos que muestran el descubrimiento de diversas sustancias secretadas por los distintos tipos celulares en la AH que parecen jugar un papel muy importante en la intercomunicación celular. Evidencias experimentales muestran que el resultado de estas interacciones intercelulares se lleva a cabo a través de la secreción de factores autócrinos y parácrinos, secretados por los distintos tipos celulares, que actúan regulando la secreción de una determinada hormona AH, así como la diferenciación y el desarrollo de los distintos tipos celulares contenidos en la AH (Fig. 10 y 11) (Denef, 1990).

La primera evidencia experimental *in vitro* que demostró la existencia de una comunicación funcional en la AH fue obtenida a partir del estudio en cultivos celulares de la interacción entre lactotropos y gonadotropos (Denef & Andries, 1983). Existen evidencias morfológicas que muestran que una subpoblación particular de lactotropos mantiene interacciones funcionales con gonadotropos a través de prolongaciones celulares y que dichas interacciones se encuentran influenciadas negativamente por acción del E<sub>2</sub> (Allaerts & Denef, 1991). Denef y colaboradores en 1995, usando cultivos de células de la AH, demostraron que la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH), es capaz de provocar un incremento rápido y sostenido en la secreción de PRL al actuar de manera

indirecta sobre los lactotropos. La demostración de que el GnRH no actúa directamente sobre los lactotropos incrementando la cantidad de PRL que estos secretan, proviene a partir de cultivos celulares enriquecidos con lactotropos y carentes de gonadotropos, en los cuales no se observa un incremento en la secreción de PRL posterior al tratamiento con GnRH. Sin embargo, cuando los lactotropos son cocultivados con gonadotropos y tratados con GnRH si se observa el efecto estimulador sobre la secreción de PRL (Andries & Denef, 1995). Lo anterior sugiere que los gonadotropos actúan como intermediarios en el incremento de la secreción de PRL inducido por el GnRH, a través de un factor parácrino secretado por los gonadotropos que actúa sobre los lactotropos estimulando la secreción de PRL. Adicionalmente se ha observado que este efecto del GnRH sobre la secreción de PRL mediado por los gonadotropos puede estar correlacionado con los cambios morfológicos y funcionales que ocurren en la hipófisis durante su desarrollo, debido a que esta comunicación funcional entre lactotropos y gonadotropos desaparece en ratas mayores de dos semanas de edad, por lo que se piensa que el GnRH puede estar involucrado en el desarrollo y diferenciación de los lactotropos durante la etapa neonatal (Andries & Denef, 1995).

Adicionalmente se han descrito interacciones funcionales entre los lactotropos y las células foliculoestrelladas (Baes et al., 1987), las cuales pueden establecer contacto, a través de sus prolongaciones citoplásmicas, con los distintos tipos celulares de la AH. Cuando estas células son cocultivadas con distintos tipos celulares de la AH se observa un incremento en: la secreción de GH en presencia de GRH y epinefrina, en la secreción de LH en presencia de GnRH, así como un incremento en la secreción de PRL mediado por AII y TRH (Denef, 1990).

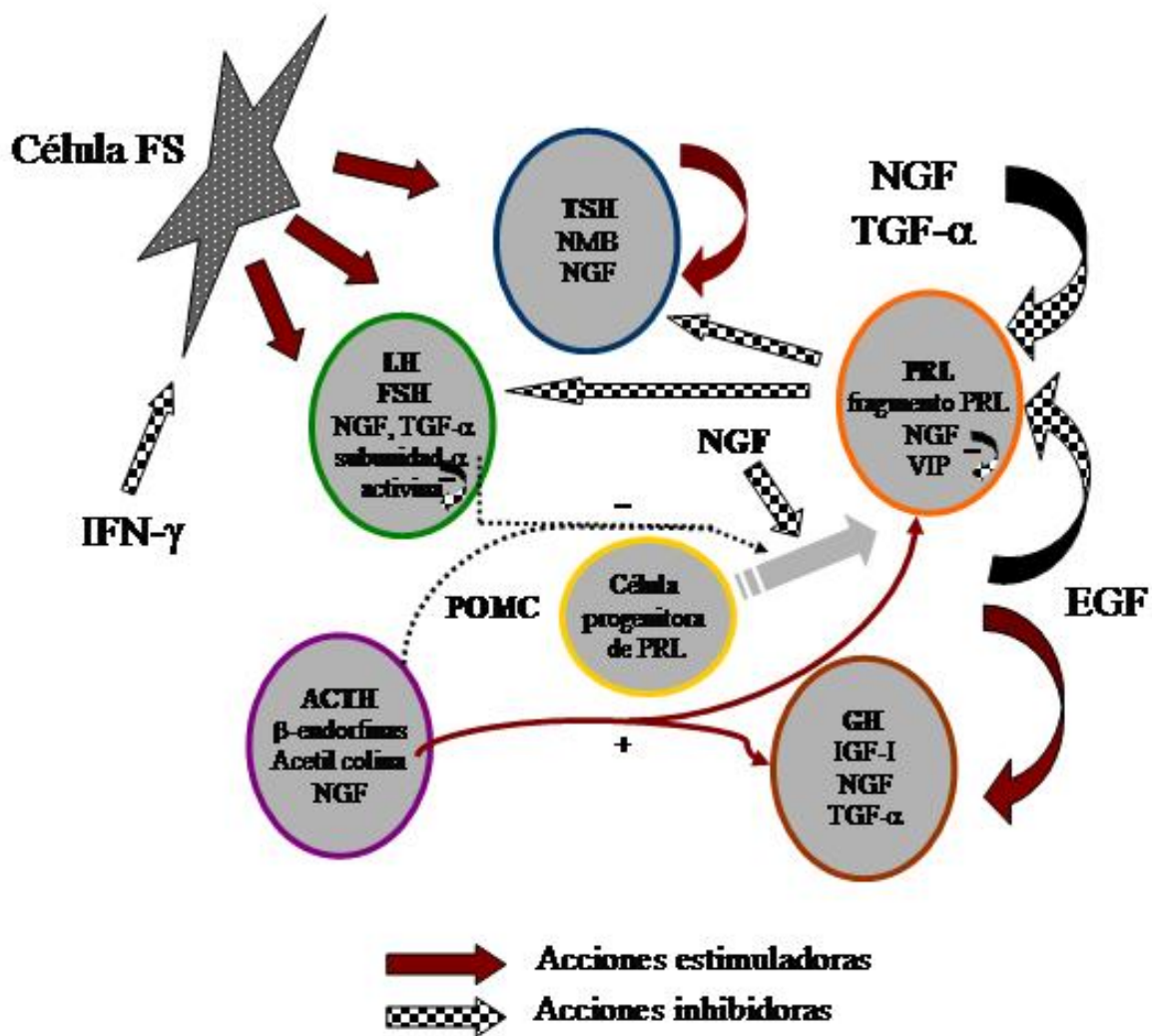


Fig. 11. Esquema que representa las interacciones que existen entre las células adenohipofisiarias a través de factores de comunicación de tipo autócrino y parácrino. FS: Foliculo estrellada; IFN- $\gamma$ : Interferón gamma; NGF: Factor de crecimiento neural; TGF- $\alpha$ : Factor de crecimiento transformante alfa; VIP: Péptido intestinal vasoactivo; IGF-I: Factor de crecimiento insulínico tipo I; POMC: Pro-opio-melanocortina (Tomada de Denef, 1990).

Existen además otros factores producidos localmente en la AH que son capaces de regular la secreción de PRL, como es el caso de la acetilcolina la cual se piensa es secretada por los corticotropos y que ejerce un efecto inhibitorio sobre la secreción de PRL. El péptido intestinal vasoactivo (VIP) es un factor que además de ser secretado por distintos tipos celulares en la AH también es secretado por los lactotropos y por el lóbulo posterior de la hipófisis. El VIP actúa de manera tanto autócrina como parácrina sobre los lactotropos, estimulando la secreción de PRL (Kato et al., 1978; Nagy et al., 1988; Murai et al., 1989). Mediante técnicas inmunocitoquímicas se ha identificado al péptido liberador de gastrina en lactotropos y en corticotropos (Houben & Deneff 1990). Dicho péptido ejerce un efecto estimulador sobre la secreción de PRL, el cual es potenciado por E<sub>2</sub> (Houben & Deneff 1990).

Adicionalmente, se ha demostrado que algunos factores de crecimiento como el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF), el factor de crecimiento neural (NGF), el factor de crecimiento de tipo transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) entre otros, son secretados por los distintos tipos celulares en la AH y tienen un papel muy importante tanto en la en la regulación de la secreción de PRL, como en el desarrollo y diferenciación de los distintos tipos celulares, incluyendo a los lactotropos (Fig. 11).

Durante la etapa neonatal, el FGF actúa incrementando el porcentaje de células que secretan PRL (Porter et al., 1984). El EGF es un potente regulador de la secreción de PRL y GH en células GH<sub>3</sub>. Los receptores para este factor de crecimiento se encuentran localizados principalmente en somatotropos y lactotropos (Chabot et al., 1986). Experimentos *in vitro* usando cultivos primarios de AH de ratas neonatas muestran que el EGF incrementa la proporción de lactotropos así como su tasa de secreción, mientras que no tiene ningún efecto sobre somatotropos ni MS (Felix et al., 1995). El NGF es sintetizado y secretado por los tiotropos, corticotropos, gonadotropos, somatotropos y lactotropos

(Patterson & Childs, 1994). Su secreción se encuentra regulada por distintos factores como la interleucina 1, el factor de necrosis tumoral alfa y el FGF entre otros. Al NGF se le ha atribuido un papel fundamental en la proliferación y diferenciación de los lactotrofos durante la vida neonatal (Proesmans et al., 1997). El TGF- $\alpha$  ha sido identificado mediante técnicas inmunocitoquímicas en somatotrofos, lactotrofos y gonadotrofos (Fan & Childs, 1995). Se piensa que tanto el EGF como el TGF- $\alpha$  ejercen sus efectos mitogénicos a través del receptor para EGF localizado en los lactotrofos (Fan & Childs, 1995).



## CAPITULO III

# LACTOTROPOS: HETEROGENEIDAD MORFOLÓGICA Y FUNCIONAL

### Anatomía de la glándula hipófisis

La hipófisis es una glándula endocrina que se aloja en la silla turca del hueso esfenoides y que se encuentra compuesta por estructuras nerviosas y epiteliales. Esta glándula está constituida por dos estructuras distintas desde el punto de vista de su origen embrionario, funcional e histológico. La AH se desarrolla a partir de una evaginación dorsal del techo del ectodermo oral, llamada bolsa de Rathke y contiene células glandulares que sintetizan, almacenan y secretan hormonas, mientras que la neurohipófisis (NH) se desarrolla a partir de un crecimiento inferior del piso del diencéfalo y se encuentra compuesta por axones que provienen del los núcleo supraóptico y paraventricular del hipotálamo. En el hombre el peso de la hipófisis es de 500 a 600mg, y mide alrededor de 13mm en sentido transversal, 9mm en el sentido anteroposterior y 6mm de altura.

La eminencia media, una dilatación en la superficie del *tuber cinerum*, se continúa con el tallo infundibular y este a su vez con el lóbulo posterior de la hipófisis. La eminencia media, el tallo infundibular y la *pars nervosa* forman la NH, mientras que la *pars intermedia*, la *pars tuberalis* y la *pars distalis* constituyen a la AH. En conjunto la *pars tuberalis* y la *distalis* constituyen el lóbulo anterior de la hipófisis, mientras que la *pars nervosa* y la *pars intermedia* forman el lóbulo posterior y neurointermedio respectivamente (Fig. 12).

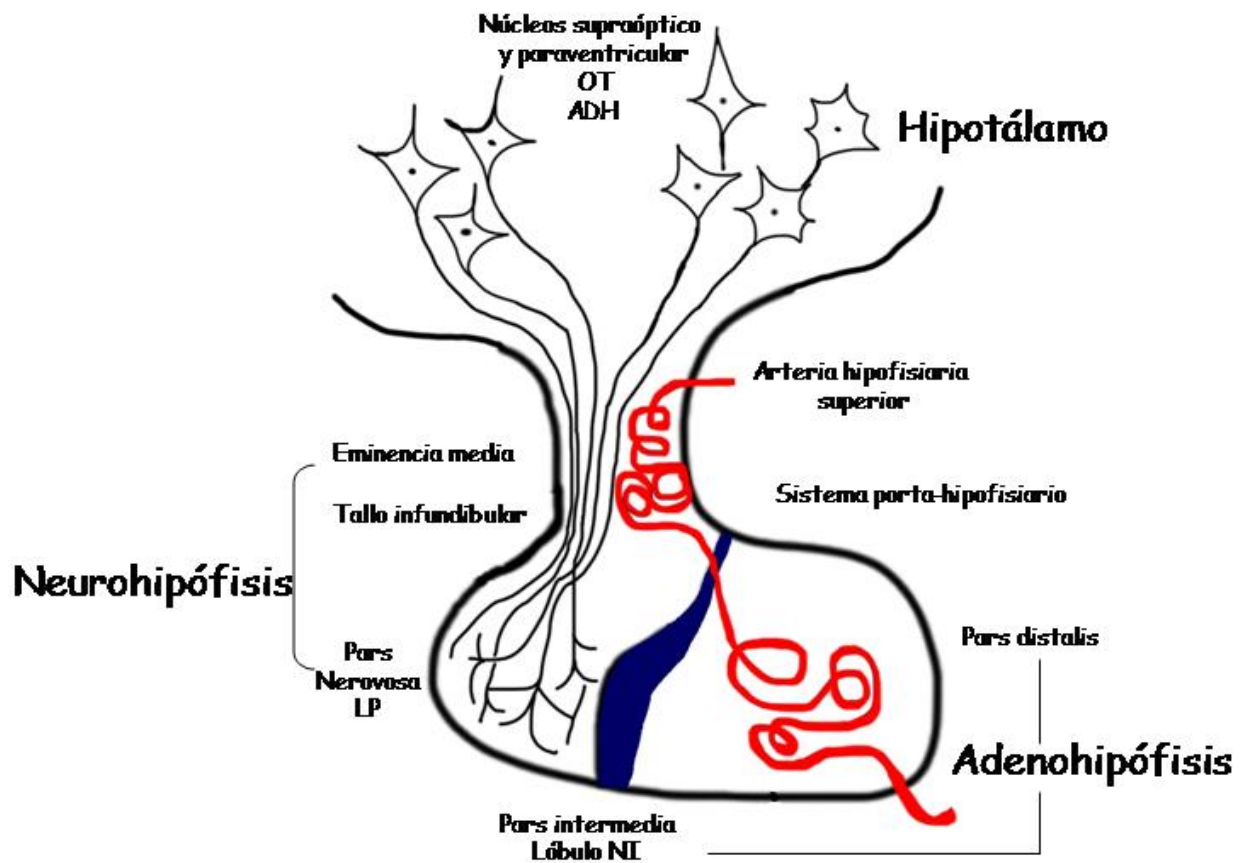


Fig. 12. Esquema que ilustra las diferentes porciones que conforman a la glándula hipófisis. OT: oxitocina; ADH: Hormona antidiurética; LP: lóbulo posterior, NI: Neurointermedio.

### *Relaciones Anatómicas y Fisiológicas de la hipófisis*

El sistema endocrino es un componente fundamental de la adaptación del organismo a los cambios del medio ambiente interno y externo. La hipófisis es la principal glándula encargada de la regulación de dichos cambios y se encuentra en estrecha relación y comunicación con el sistema nervioso central a través del hipotálamo para poder llevar a cabo las funciones de recepción, integración y transmisión de señales.

Las vías eferentes finales que salen del hipotálamo tienen gran importancia porque controlan el funcionamiento de la hipófisis. Este control se lleva a cabo por una proyección neural a la NH y a través de una conexión vascular con la AH.

Los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular contienen grandes células neurosecretoras que secretan dos hormonas peptídicas: la oxitocina y la vasopresina. La oxitocina provoca la contracción del músculo liso uterino y de las células mioepiteliales en la glándula mamaria, por lo que sus acciones son esenciales durante el parto y para la eyección de la leche durante la lactancia. La vasopresina u hormona antidiurética, actúa incrementando la reabsorción de agua en los túbulos colectores de la nefrona y reduciendo la pérdida de líquidos por la orina. Ambas hormonas, descienden mediante el flujo axoplásmico, por los axones de las células que las han sintetizado unidas a una proteína transportadora llamada neurofisina. Estas células neurosecretoras son eléctricamente excitables y el paso de potenciales de acción por sus axones provoca la liberación de hormonas en los botones terminales que se encuentran situados junto a los capilares de la eminencia media, el tallo infundibular y el lóbulo posterior de la hipófisis.

El sistema porta-hipofisiario representa la conexión vascular entre el hipotálamo y la AH. La arteria hipofisiaria superior es una rama de la carótida interna, que se divide en un lecho capilar en la eminencia media y en la parte proximal del tallo infundibular. La sangre de estos capilares es recogida de nuevo por los vasos portales hipofisarios que viajan por el tallo infundibular y se dividen en un segundo lecho capilar en la AH. Se sabe que pequeños péptidos llamados hormonas liberadoras e inhibidoras hipotalámicas, son segregadas por las células arciformes y por células situadas en zonas cercanas al tercer ventrículo; dichos péptidos descienden por los axones de estas células y son liberados a la circulación sanguínea en el primer lecho capilar. A partir de ahí dichas sustancias descienden por los vasos portales hipofisarios hasta la AH en donde

actúan, como lo indica su nombre, facilitando o inhibiendo la liberación de las hormonas hipofisarias. El conjunto de axones que transportan las hormonas hipotalámicas está concentrado en el tracto tuberoinfundibular o tuberohipofisario. Los factores hormonales hipotalámicos, a través de fenestraciones capilares, son vertidos hacia el primer plexo capilar del sistema porta-hipofisario el cual tiene la función de comunicación entre el hipotálamo y la AH (Fig. 12) Posteriormente, estas hormonas a través de la circulación sistémica cerrada alcanzan a la AH en donde se unen de manera específica por medio de un receptor a un determinado tipo celular. Dada la pequeña cantidad en que son secretadas las hormonas hipotalámicas (en el orden de ng), la circulación portal cerrada se vuelve trascendental para lograr mantener la concentración en estos factores. Las hormonas secretadas por la AH son liberadas en una mayor cantidad ( $\mu\text{g}$ ) y son transportadas por la circulación sistémica general para actuar a distancia sobre células glandulares blanco, las cuales finalmente liberan a la circulación sistémica cantidades aún mayores (en el orden de  $\mu\text{g}$ -mg) de una determinada hormona. Dichas hormonas ejercen sus efectos sobre células blanco al unirse de manera específica a receptores membranales en el caso de las hormonas polipeptídicas y a receptores citoplásmicos o nucleares para el caso de las hormonas esteroides y tiroideas.

### **Células secretoras de PRL**

En la AH el porcentaje de células secretoras de PRL varía de manera muy importante dependiendo del estado fisiológico en el que se encuentre el individuo. Durante el embarazo y lactancia ocurre un incremento en el porcentaje de células que secretan PRL (Porter et al., 1990), lo cual se correlaciona con un incremento de un 20 a un 36% en su tamaño (Gonzalez et al., 1988). La PRL en su forma madura se encuentra almacenada en gránulos de secreción que miden alrededor de 600 a 1000 nm. Los gránulos inmaduros varían en su forma y tamaño, debido a que

estos se forman por la fusión de pequeños gránulos que provienen del aparato de Golgi (Farquhar et al., 1978; Tougard et al., 1980).

El lactotrofo o mamotrofo representa el único tipo celular encargado de sintetizar y secretar de manera exclusiva a la PRL, sin embargo a partir de diversos trabajos realizados recientemente, se ha caracterizado a un tipo celular bihormonal denominado mamosomatotrofo (MS), el cual sintetiza y secreta tanto PRL como GH (Frawley et al., 1985; Nikitovitch-Winer et al., 1987).

Trabajos reportados por diferentes grupos de investigación muestran que puede existir una variabilidad en cuanto al porcentaje de lactotrofos contenidos en la AH de la rata. Por un lado, Labrie y cols reportan que este tipo celular puede representar hasta un 70-80% del número total de células secretoras en la AH. Sin embargo, Ellerkmann y Porter reportan que cerca del 60% del total de células secretoras en la AH son lactotrofos (Ellerkmann et al., 1992b). Los trabajos de Frawley y cols muestran que el porcentaje de células secretoras de PRL contenidos en la región lateral y región central de la AH de la rata es de 54 y 50%, respectivamente. (Porter & Frawley, 1992).

#### *Heterogeneidad morfológica y funcional en los lactotrofos*

Adicionalmente, se han caracterizado distintas subpoblaciones de lactotrofos con diferentes características morfológicas y funcionales, lo cual añade más complejidad a la regulación de la secreción de PRL. Papka y cols, usando técnicas inmunocitoquímicas, demostraron que en la AH de ratas lactantes existen dos áreas específicas en las cuales los lactotrofos se encuentran concentrados (Papka et al., 1986). Aquellos lactotrofos que se encuentran localizados en la región lateral de la glándula poseen una menor tasa de secreción de PRL que aquellos localizados en la región central de la glándula, cercana al LP y NI (Luque et al., 1986).

Posteriormente Boockor y Frawley en 1987 demostraron, mediante el uso del inmunoensayo de placas hemolíticas en AH de ratas lactantes, que los lactotropos localizados en las diferentes regiones de la glándula responden de manera diferencial al menos a dos factores reguladores hipotalámicos. Los lactotropos localizados en la región lateral liberan rápidamente PRL en respuesta al tratamiento con TRH pero son moderadamente afectados por DA, mientras que los lactotropos localizados en la región central responden en menor grado al TRH pero disminuyen significativamente su tasa de secreción en presencia de DA (Boockfor & Frawley, 1987), por lo que la heterogeneidad funcional de los lactotropos contenidos en la región lateral y central de la glándula a los distintos factores liberadores e inhibidores representa un componente importante en los procesos de regulación de la secreción de PRL.

Durante la lactancia, los lactotropos de las diferentes regiones de la glándula son susceptibles de modificar su funcionamiento en respuesta a factores liberados por el estímulo de la succión. Mediante el inmunoensayo de placas hemolíticas demuestran que en ratas lactantes no succionadas, las cuales permanecen aisladas de sus crías durante 6 horas para evitar el estímulo de la succión, existen lactotropos que producen pequeñas placas de hemólisis y lactotropos que secretan una mayor cantidad de hormona. Cuando las ratas lactantes que han permanecido aisladas de sus crías durante seis horas vuelven a recibir durante 10 minutos el estímulo de la succión ocurre la desaparición de la población de lactotropos con baja actividad secretora. A partir de estos trabajos también se demostró que en ratas no succionadas la DA inhibe preferencialmente a aquella subpoblación de lactotropos que secretan grandes cantidades de PRL en condiciones basales, mientras que el TRH y la AII producen un incremento en ambas subpoblaciones. En contraste, en AH de ratas succionadas, la gran mayoría de las placas disminuyen uniformemente en tamaño, sin embargo existe una minoría consistente de células que continúan formando placas relativamente grandes en presencia de DA. Asimismo,

concluyen que la succión no solo potencia la respuesta de las células de PRL al TRH y AII sino que también atenúa de manera significativa la inhibición de la secreción de PRL inducida por DA sugiriendo que la succión prepara a las células de la AH a responder a agentes que estimulan la liberación de la PRL (Nagy & Frawley, 1990; Nagy et al., 1991).

Además de los efectos a largo plazo que posee el 17- $\beta$  estradiol en la regulación de la síntesis y secreción de PRL, existen respuestas rápidas que se manifiestan como un rápido incremento en la secreción de PRL circulante 3 horas después de la inyección con esta hormona a ratas ovariectomizadas (ovx). Murai y Ben-Jonathan en 1990 demuestran que el incremento de PRL inducido posterior al tratamiento con E<sub>2</sub> a ratas ovx se atenúa satisfactoriamente cuando se extirpa el lóbulo NI (Murai & Ben-Jonathan, 1990), sugiriendo con ello que el E<sub>2</sub> promueve la liberación de un factor por parte del lóbulo NI que a través de los vasos portales cortos actúa de dos distintas maneras sobre los lactotropos contenidos exclusivamente en la RC de la AH (Porter & Frawley, 1992). La primera de ellas es incrementando el número de células secretoras de PRL, posiblemente mediante un mecanismo de reclutamiento celular, mientras que la segunda es a través de un incremento en la tasa de secreción de las células secretoras de PRL preexistentes (Murai & Ben-Jonathan, 1990; Ellerkmann et al., 1991). Frawley y colaboradores, reprodujeron estos resultados usando células en cultivo y observaron que sólo cuando las células AHs eran co-cultivadas con células provenientes del lóbulo NI y tratadas con E<sub>2</sub> por un período de 3 horas se lograban reproducir tales efectos, confirmando que las células del lóbulo NI secretan un factor estimulador de la secreción de PRL. Posteriormente, este mismo grupo de investigación propuso al  $\alpha$ -MSH como el factor secretado por el lóbulo NI responsable del incremento en la secreción de PRL observado en respuesta al tratamiento con E<sub>2</sub> (Ellerkmann et al., 1992a; Ellerkmann et al., 1992b).

## *Transdiferenciación*

El concepto de que una célula se encuentra confinada a secretar una sola hormona resulta cuestionable. Existen una gran número de evidencias experimentales que muestran que los distintos tipos celulares contenidos en la AH, pueden sintetizar y secretar más de una hormona. Asimismo, se ha observado que tanto el porcentaje de cada tipo celular contenido en la glándula como la hormona que es liberada de manera preferencial por las células bihormonales, varía dependiendo del ambiente hormonal y de la condición fisiológica en la que se encuentre el individuo. De esta manera, los distintos tipos celulares de la glándula muestran cierto grado de plasticidad que les permite acoplarse a las demandas fisiológicas (Levy, 2002).

En el caso particular de la PRL, los tipos celulares en la AH que sintetizan y secretan esta hormona son el lactotrofo o mamotrofo y el MS, el cual como se ha comentado anteriormente, sintetiza y secreta además de PRL a la GH (Nikitovitch-Winer et al., 1987; Kashio et al., 1990). El MS puede diferenciarse en lactotrofo o en somatotrofo dependiendo de las condiciones fisiológicas particulares de cada individuo. Kineman y colaboradores en 1991, reportaron cambios en la proporción de lactotrofos, somatotrofos y MS en AH de bovinos que habían sido privados de testosterona y sus productos de metabolización mediante la castración (Kineman et al., 1991a).

Durante el embarazo y la lactancia ocurre un incremento muy importante en el número de células que secretan PRL. Durante el embarazo ocurre un incremento en el número de lactotrofos y una disminución en el número de MS, mientras que durante la transición del embarazo a la lactancia ocurre un decremento en el número somatotrofos y un aumento en el número de MS y L, lo cual resulta en un incremento en la cantidad de PRL secretada. Dado que el incremento de lactotrofos y MS ocurre de manera concomitante con un decremento en el número de



somatotropos, se ha sugerido que células secretoras de GH puedan transdiferenciarse hacia células secretoras de PRL (Porter et al., 1990).

Asimismo, se ha observado que el MS posee características funcionales tanto de lactotropos como de somatotropos debido a su capacidad para responder a diferentes factores hipotalámicos que regulan la secreción de ambas hormonas (Kashio et al., 1990).

El mecanismo mediante el cual ocurre el reclutamiento de nuevas células que secretan PRL en respuesta al factor secretado por el lóbulo NI en respuesta al tratamiento con E<sub>2</sub> no se conoce, sin embargo se piensa que dado que este incremento en el porcentaje de células secretoras de PRL ocurre en tres horas, éste no puede ser atribuido a mitosis de células de PRL ya preexistentes ni a la activación *de novo* de la secreción de PRL, si no a la transdiferenciación de somatotropos a lactotropos y MS (Porter et al., 1992).

Kovacs y colaboradores demostraron que pacientes con hipotiroidismo primario desarrollan hiperplasia de células inmunorreactivas a TSH debido a que la concentración de hormonas tiroideas en sangre no es suficiente como para activar el mecanismo de retroalimentación negativa y frenar de esta manera la síntesis y secreción de TSH. Asimismo, se piensa que este fenómeno ocurre como un mecanismo para compensar la baja secreción de TSH que existe en estos pacientes. En estos mismos pacientes, reportaron mediante técnicas inmunocitoquímicas, de microscopía electrónica y de hibridación *in situ*, la aparición de un nuevo tipo celular, denominado célula “deficiente de tiroides”, el cual contiene en su citoplasma gránulos inmunorreactivos a TSH y a GH. Al combinar las técnicas inmunocitoquímica y de hibridación *in situ*, muestran que los somatotropos expresan el mensajero para la síntesis de TSH, mientras que los tirotropos poseen el mensajero para la GH. Los resultados obtenidos a partir de este estudio sugieren que los somatotropos pueden transformarse a tirotropos como mecanismo adaptativo para regular la secreción de TSH en pacientes con esta

enfermedad. Por lo que adicionalmente a la multiplicación de tirotropos, el incremento en las células de TSH se debe a la transdiferenciación de somatotropos hacia células productoras de TSH (Vidal et al., 2000). Posteriormente este grupo de investigación demostró que en el humano ocurre un incremento en la población de mamomasomatotropos en pacientes con hiperplasia de somatotropos asociada clínicamente con acromegalia (Vidal et al., 2001).

Estudios realizados *in vitro* por el grupo de Childs y cols han demostrado que tanto el incremento en el número de gonadotropos que ocurre antes de la ovulación como el incremento en la expresión cíclica de gonadotropinas en la AH, se debe al menos en parte a un proceso de transdiferenciación de somatotropos a gonadotropos (Childs & Unabia, 1997). La transformación de somatotropos a gonadotropos es un proceso complejo que involucra como primer paso la expresión de receptores para GnRH y hormona luteinizante en las células secretoras de GH (Vidal et al., 1998; Childs, 2002). Estos resultados y los presentados anteriormente sugieren que en la AH existe una subpoblación de somatotropos que posee una gran capacidad y plasticidad para responder a diversos factores y adaptarse a las demandas fisiológicas de un individuo.

## **CAPITULO IV**

### **ANTECEDENTES ESPECIFICOS: PARTICIPACIÓN DE FACTORES REGIONALES EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE PRL**

La existencia de una heterogeneidad tanto morfológica como funcional de los lactotropos localizados en las diferentes regiones de la AH le confiere al sistema una gran plasticidad para regular la síntesis y secreción de PRL de acuerdo a las requerimientos fisiológicos del animal. Adicionalmente a la heterogeneidad funcional de los lactotropos contenidos en las distintas regiones de la glándula, los demás tipos celulares contenidos en ella sintetizan y secretan factores que actúan de manera autócrina y/o parácrina regulando directa o indirectamente la síntesis y secreción de PRL. Lo anterior sugiere que en la AH operan mecanismos capaces de regular el funcionamiento de la propia glándula y que los diferentes tipos celulares que la constituyen se comunican para controlar la secreción de los productos hormonales.

#### **Regionalización de la secreción de PRL en distintos estados fisiológicos**

La hipótesis de trabajo del laboratorio ha propuesto que existe una comunicación celular, a través de factores secretados por los distintos tipos celulares en la AH, entre la región lateral y central de la AH los cuales juegan un papel fundamental en la regulación de la secreción de PRL.

En una serie de experimentos realizados en el laboratorio se quiso averiguar si existían diferencias en cuanto a la cantidad de PRL secretada

al medio de incubación por parte de la región lateral y central de AHs de animales que se encontraban en distintos estados fisiológicos, vgr. ratas lactantes no succionadas y succionadas, ratas gestantes en el segundo tercio del embarazo y ratas macho, al ser incubadas en medio de Earle por 30 minutos. Los resultados obtenidos mostraron que existe una diferencia regional en cuanto a la cantidad de PRL que secretan los lactotropos de las diferentes regiones de la glándula. Sin embargo se observó que la manifestación o no de este fenómeno de regionalización de la secreción de PRL y los mecanismos asociados a éste dependen del estado fisiológico en que se encuentre el animal. Así, como se puede observar en la figura 13, la región central de AH de ratas macho (Fig. 13 A) y de ratas lactantes no succionadas (Fig. 13 B) secretan una cantidad de PRL significativamente mayor que la región lateral, mientras que en ratas gestantes (Fig. 13 C) esta diferencia regional en la secreción de PRL no se observa. Por otro lado se observó que cuando a ratas lactantes que habían sido separadas de sus crías por un período de 6 horas (no succionadas) se les aplicaba un período de succión de 15 minutos (succionadas), la diferencia regional que se observa en el grupo de no succionadas desaparece (Fig. 13 D), sugiriendo con ello que el estímulo de la succión provoca que la región central de la glándula disminuya su tasa de secreción y que como resultado secrete una cantidad de PRL similar a la región lateral, lo cual sugiere que el estímulo de la succión provoca la liberación de factores regionales y la activación de mecanismos dentro de la propia glándula, hasta ahora no descritos, que en conjunto regulan la secreción de PRL.

Posteriormente estos resultados llevaron a probar la influencia que tendría la incubación de la región lateral y central de animales que se encontraban en diferentes condiciones fisiológicas (no succionadas y succionadas) al ser incubadas en medios condicionados obtenidos a partir de la incubación de AH de animales que también se encontraban en diferentes estados fisiológicos (no succionadas y succionadas).

### Regionalización y regulación de la secreción de PRL

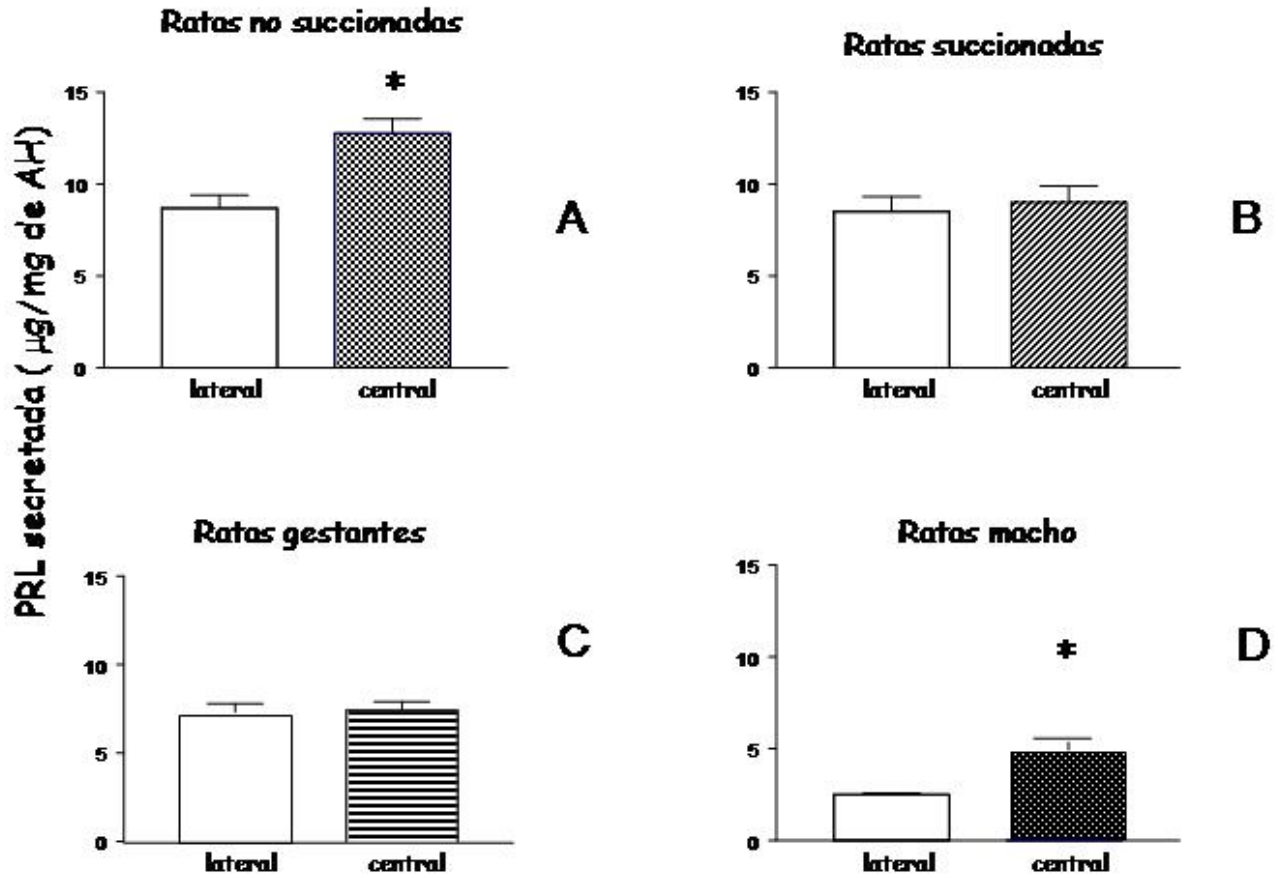


Fig. 13. Serie de gráficas en donde se representa la cantidad de PRL secretada durante 30min de incubación en medio de Earle por la región lateral y central de adenohipófisis de ratas macho (A), ratas lactantes no succionadas (B) y succionadas (D) y ratas gestantes en el segundo tercio del embarazo (C). \* Diferente significativamente con relación a la región lateral,  $p < 0.05$ .

## **Regulación regional de la secreción de PRL en ratas lactantes**

En estos experimentos se probó el efecto de medios condicionados por la región lateral y central de AHs de ratas lactantes succionadas y no succionadas obtenidos durante un período de incubación de 4hs, sobre la secreción *in vitro* de PRL por ambas regiones de la AH de ratas lactantes que se encontraban en las mismas condiciones fisiológicas durante un período de incubación de 30 minutos.

Los resultados muestran, a manera general, que en los medios condicionados obtenidos por la incubación de AH de ratas lactantes existen factores capaces tanto de estimular como de inhibir la secreción de PRL cuando en dichos medios son incubados AH de ratas en diferentes condiciones fisiológicas de la lactancia, *vgr.* lactantes no succionadas y succionadas y que el tipo de acción que se ejerce sobre el tejido incubado *vgr.* estimulación, inhibición o la ausencia de efecto, varía dependiendo tanto de la condición fisiológica del animal receptor como de la del donador (Díaz et al., 2002). Al analizar el número de efectos estimuladores sobre la secreción de PRL presentados en la tabla 1, podemos observar que el medio condicionado obtenido principalmente de la región lateral pero también el obtenido a partir de la región central de AH de ratas lactantes succionadas provocó un mayor número de efectos que el medio condicionado de ratas lactantes no succionadas. Cuando los medios fueron condicionados por AH de lactantes succionadas, se obtuvieron cuatro efectos de tipo estimulador, dos de tipo inhibitorio y dos situaciones en las cuales no hubo efecto. En contraste, cuando los medios fueron condicionados por AH de lactantes no succionadas se obtuvo un efecto estimulador, dos inhibidores y 5 situaciones en las cuales no hubo ningún efecto (Fig. 14; tabla 1). Lo anterior sugiere que la succión activa de manera preferencial la liberación de factores regionales que estimulan en vez de inhibir la secreción de PRL, mientras que en ausencia del estímulo

de la succión solo se manifiesta un efecto de tipo estimulador (Diaz et al., 2002).

Los resultados obtenidos en este serie de experimentos se presentan de manera resumida y esquemática en la figura 14 y en la tabla 1.

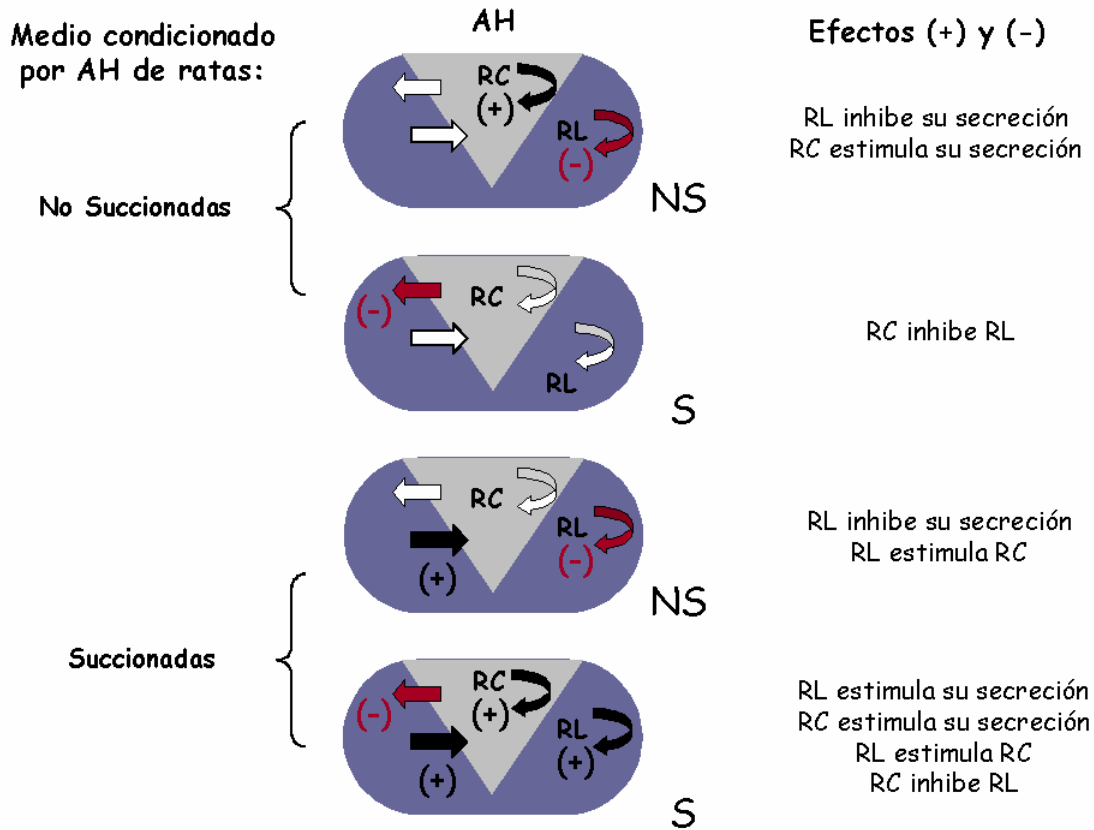


Fig. 14. Resumen en donde se representa de manera esquemática los efectos obtenidos de incubar de manera independiente la región lateral (RL) y central (RC) de adenohipófisis (AH) de ratas lactantes succionadas (S) y no succionadas (NS) en condiciones *in vitro* por 30 min en medios condicionados por las mismas regiones adenohipofisiarias de animales en las mismas condiciones fisiológicas, sobre la secreción de PRL a los medios de incubación. La dirección de las flechas indican el origen y sitio en donde actúan los medios condicionados. Los efectos estimuladores, inhibidores o la ausencia de efecto se encuentran indicados como (+), (-) y (0), respectivamente. Nótese que el mayor número de efectos estimuladores se ejerce por medios condicionados por AHs de lactantes succionadas, particularmente por la RL.



## Adenohipófisis de ratas lactantes

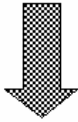

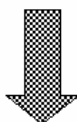
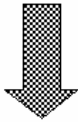



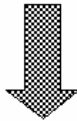

	No Succionadas		Succionadas	
Medio condicionado por la región:	Región lateral	Región central	Región lateral	Región central
Lateral de NS		-	-	-
Central de NS	-			-
Lateral de S				
Central de S	-	-		

Tabla 1. Resumen que indica el tipo de efecto obtenido al incubar en condiciones *in vitro* por 30 min la región lateral y central de adenohipófisis de ratas lactantes no succionadas por 6 hs y succionadas por 15 min en medios condicionados por las mismas regiones adenohipofisiarias de animales en las mismas condiciones fisiológicas.

## **CAPITULO V**

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

A partir de los antecedentes que han sido expuestos en esta última sección, se conoce que en la regulación de la secreción de PRL intervienen un gran número de factores secretados localmente en la glándula, los cuales ejercen efectos diferenciales en las distintas subpoblaciones de lactotropos. Sin embargo, poco se ha estudiado acerca de la liberación de estos factores en diferentes estados fisiológicos y sus potenciales acciones sobre la secreción de PRL, así como de los mecanismos celulares asociados a dichos procesos. De esta manera, el trabajo realizado en esta tesis pretende comprender y profundizar acerca del fenómeno de regionalización y los mecanismos involucrados en la regulación regional de la secreción de PRL en AHs de ratas macho por acción de factores solubles presentes en medios condicionados por la región lateral de ratas lactantes succionadas. Asimismo, una vez caracterizados los efectos, consideramos importante indagar acerca de la naturaleza del (los) factor (es) regional (es) contenido (s) en el medio condicionado responsable (s) de los efectos observados sobre la secreción de PRL en AHs de ratas macho.

### **HIPÓTESIS**

Factores regionales secretados al medio de incubación por la región lateral de la AH de ratas lactantes succionadas y no succionadas ejercen efectos sobre la secreción regional de PRL por AH de ratas macho.

## **OBJETIVOS**

### *Generales*

Caracterizar los efectos de medios condicionados por la región lateral de AHs de ratas lactantes succionadas y no succionadas, sobre la secreción de PRL en ambas regiones de la AH de la rata macho, así como analizar los posibles mecanismos involucrados en los efectos estimulatorios de la secreción de PRL en AH de ratas macho por acción de factores presentes en el medio condicionado por la región lateral de AHs de ratas lactantes succionadas.

### *Específicos*

1. Determinar el efecto de dosis-respuesta de medios condicionados por la región lateral y central de AH de ratas lactantes succionadas y no succionadas, obtenidos durante los días 10 a 14 de lactancia, sobre la secreción de PRL por AH de ratas macho.
2. Determinar el efecto de la cicloheximida (inhibidor de la transcripción de la síntesis proteínica) y de la brefeldina-A (inhibidor del tránsito vesicular del RER al Complejo de Golgi), sobre la estimulación de la secreción de PRL por AH de ratas macho, inducida por acción del medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes succionadas.
3. Determinar el efecto del medio condicionado por la AH de ratas lactantes succionadas sobre el porcentaje y morfología de células que

presentan inmunorreactividad a PRL y a GH en cultivos primarios de la región lateral y central de AH de ratas macho.

4. Definir el perfil de secreción de PRL mediante el empleo de isótopos radioactivos, en las condiciones experimentales anteriores a fin de determinar si la acción estimuladora del medio condicionado de ratas lactantes promueve la secreción de la hormona recién sintetizada o de la hormona madura.
5. Determinar mediante el uso del marcador fluorescente FM1-43 la dinámica de secreción en AH de ratas macho incubadas en condiciones control y en medio condicionado por AHs de ratas lactantes.
6. Determinar el efecto del medio condicionado sobre la cantidad y contenido de variantes moleculares de PRL sobre gránulos aislados de AH de ratas macho.
7. Determinar mediante el uso de microscopía electrónica la distribución de gránulos de PRL en AH de ratas macho incubadas en condiciones control y en medios condicionados por AHs de ratas lactantes.
8. Obtener mediante Cromatografía líquida rápida de alta resolución diferentes fracciones de medio condicionado con el propósito de probar sus efectos sobre AH de ratas macho. Lo anterior permitirá ir disecando los componentes activos presentes en el medio condicionado.

## **CAPITULO VI**

### **MATERIALES Y METODOS**

#### **Animales**

Para todos los experimentos realizados en esta tesis se utilizaron ratas de la cepa Wistar las cuales se mantuvieron en cajas individuales dentro del bioterio del Instituto de Neurobiología en ciclos alternantes de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y bajo condiciones de temperatura y humedad controladas. Las ratas fueron alimentadas con alimento para roedor purina (Ralston Purina Co., Chicago IL) y agua a libre demanda y fueron tratadas de acuerdo a las normas nacionales e internacionales de seguridad establecidas para el cuidado y manejo de animales de laboratorio.

Para la obtención de los medios condicionados se usaron ratas lactantes primíparas, con 8 a 10 crías por camada, que se encontraban entre los días 10 a 14 del postparto. Las madres fueron separadas de sus crías por un período de 6 horas antes de la incubación. Al finalizar dicho período de separación, solo algunas de ellas fueron reunidas nuevamente con sus crías para un período de succión de 15 minutos. Posteriormente, las ratas lactantes fueron decapitadas y las hipófisis (región lateral y central por separado) incubadas en medio de Earle por un periodo de 1 hora (descrito en detalle mas adelante, en obtención de medios condicionados). Para todos los experimentos realizados en esta tesis sólo se uso el medio condicionado por la región lateral.

Para probar el efecto de los medios condicionados obtenidos a partir de la incubación de AH de ratas lactantes sobre la secreción de PRL, se usaron ratas macho adultas con un peso corporal de 330 a 350 gr.

## Dissección de Adenohipófisis

Todos los animales fueron decapitados bajo anestesia con éter. Posterior a la extracción de la AH y a su separación del lóbulo posterior y neurointermedio, la glándulas fueron divididas, usando una navaja de bisturí, en una porción central y dos laterales. Como se ilustra en la Fig. 15, la porción central corresponde a la región interna de la glándula cercana al lóbulo posterior y neurointermedio de la hipófisis mientras que el resto de la glándula corresponde a la región lateral (Boockfor & Frawley, 1987; Diaz et al., 2002).

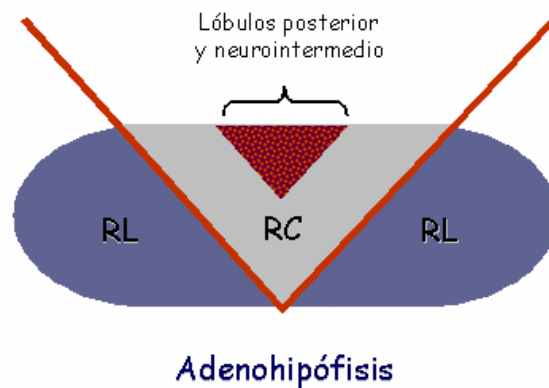


Fig. 15. Esquema en donde se muestra la separación quirúrgica de la AH. Una vez removido el lóbulo posterior y neurointermedio, se divide a la glándula en una región central y dos laterales (el corte se representa con líneas). RC: región central; RL: región lateral.

## **Proceso para la obtención de medios condicionados**

Las regiones central y lateral de ratas lactantes fueron incubadas por separado durante 1 hora en 300  $\mu$ l de medio fresco de Earle a pH 7.3, en un agitador metabólico a 37° C (125 rpm, American Optical Corp. Modelo 0256) bajo una atmósfera de 95% de oxígeno y 5% de CO<sub>2</sub>. Al final de la incubación, los fragmentos de AH fueron pesados y almacenados a -20 °C para su posterior análisis mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). Los medios de incubación fueron ultrafiltrados y desalados a 4°C usando filtros Centriprep YM-10 durante 5 ciclos de 30 minutos cada uno a 4000 rpm en un rotor de ángulo fijo. Usando agua desionizada para rediluir en cada ciclo. Al final de dicho procedimiento, el medio de incubación se encuentra compuesto principalmente por moléculas de peso molecular superior al corte de la membrana del filtro (>10 kDa), las cuales fueron evaporadas por medio de un concentrador centrífugo Savant SC 110 115 y almacenadas a -20°C hasta el día de su utilización. La fracción mayor a los 10 kDa no fue colectada ni procesada, debido a que el medio condicionado que contiene esta fracción no ejerce ningún efecto sobre la secreción de PRL al ser probada sobre AHs de ratas macho.

## **Reconstitución de Medios condicionados**

Los medios condicionados fueron reconstituidos usando medio fresco de Earle a pH 7.3 al doble de su concentración original (2X) el mismo día en que fueron usados para probar sus efectos sobre AH de ratas macho. Sólo en el caso del experimento dosis-respuesta se probaron además las diluciones 1x y 0.5X. La cantidad de PRL contenida en los medios condicionados fue determinada mediante PAGE y densitometría,

bioensayo y ELISA, y dicha cantidad fue restada a la cantidad total de hormona secretada por las AH del macho, al término de la incubación.

### **Incubación de las regiones lateral y central de AHs de ratas macho en medio Earle y en los medios condicionados de ratas lactantes**

Posterior a la extracción y disección de la glándula, las regiones lateral y central de AHs de ratas macho fueron incubadas individualmente ya sea en 300µl de medio Earle o de medio condicionado, por uno o dos periodos consecutivos de 30 min. Al finalizar el primer periodo de 30 min de incubación, el medio de incubación fue colectado y reemplazado con medio condicionado o de Earle fresco. La cantidad de PRL secretada al medio de incubación en cada periodo de incubación fue determinada mediante PAGE y densitometría, ELISA y bioensayo.

Exclusivamente para el caso del primer experimento, ambas regiones de la AH de la rata macho fueron incubadas en medio condicionado de la región lateral de ratas lactantes succionadas y no succionadas. Posteriormente, para estudiar los mecanismos celulares asociados a la estimulación de la secreción de PRL, se utilizó únicamente y para todos los experimentos, medio condicionado por la región lateral de ratas lactantes succionadas. En todos los grupos control, las AHs del macho fueron incubadas en medio de Earle.

Para poder determinar exclusivamente la cantidad de PRL que secretan las AH de ratas macho al cabo de 30 min de incubación bajo influencia del medio condicionado, fue necesario sustraer de la cantidad total de hormona presente en los medios de incubación, la cantidad de PRL contenida en los medios condicionados 2x, cuantificada previamente mediante PAGE



## **Cuantificación de la cantidad de PRL**

### *Electroforesis en condiciones nativas*

La concentración de PRL en los medios condicionados y de incubación se determinó mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 7.5% en condiciones nativas de acuerdo con el método de Nicoll et al. (1969) y se cuantificó mediante densitometría usando curvas estándar de PRL 23K (Nicoll et al., 1969). La PRL 23K que fue usada para determinar la concentración de esta hormona, fue proporcionada por el Dr. A.F. Parlow del Programa Nacional de Hormonas Pituitarias del NIH-NHIDDK.

La electroforesis se llevó a cabo a 200 V durante aproximadamente 1 hora. Los geles fueron teñidos con Amido-Black al 0.5% en una solución de ácido acético al 7.5% durante toda una noche y desteñidos electroforéticamente con ácido acético al 7.5% en dos sesiones de 15 minutos cada una. La concentración de PRL se obtuvo a partir de la lectura densitométrica de la banda de PRL, la cual fue previamente identificada de acuerdo a las características de migración de los estándares para dicha hormona. El valor obtenido a partir de la lectura de la banda fue sometido a una regresión lineal a partir de una curva estándar de PRL 23K de rata.

### *ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)*

La concentración de PRL en los medios condicionados y de incubación fue determinada mediante el método de Signorella y Hymer (Signorella & Hymer, 1984). Placas de 96 pozos (Immulon 2HB, Chantully VA, USA) fueron cubiertas con 10ng de PRL de rata en 100 µl de buffer amortiguador de carbonato 1 M, pH 10.3 a 4°C por una noche. Tanto para la obtención de curvas patrón, usando 9 diluciones seriales de PRL de rata (de 16 ng a 0.0625ng), así como para los medios de incubación, las

muestras fueron incubadas por 16 hrs a 4°C con el anticuerpo primario policlonal contra PRL de rata (1:40000; Programa Nacional de Hormonas Hipofisiarias del NIH-NHIDDK) diluido en TPBS con 1% de leche en polvo libre de grasas (Bio-Rad, Hercules CA, USA), antes de ser agregadas a las placas cubiertas de hormona. Al siguiente día, las placas fueron lavadas de manera extensiva con TPBS (Fosfato de sodio 0.01 M, NaCl 0.15 mM, 0.05% v/v Tween 20, pH 7). Este procedimiento de lavado, se llevó a cabo después de cada paso de incubación.

Posteriormente, las muestras y los estándares fueron agregados a las placas previamente cubiertas de PRL e incubados a temperatura ambiente por 2 hrs. A continuación, se llevó a cabo la incubación con el anticuerpo secundario IgG cabra anti-conejo acoplado a peroxidasa (1:3000 en TPBS con 1% de leche en polvo libre de grasas) (Bio-Rad, Hercules CA, USA) a temperatura ambiente por 2 hrs. La reacción fue revelada mediante la adición de 100 µl por pozo de ABTS, 2,2'-amino-di- [3-ethylbenzothiazoline] sulfonato como sustrato (Kit de ABTS, Roche). Para la preparación del revelador, se diluyeron 0.167 g de buffer/10 mL de agua desionizada. A esta mezcla, se agregó 0.0214g de la tableta de ABTS. Las placas fueron leídas después de 15 minutos en un lector automático de placas para ELISA (Bio-Rad, Hercules CA, USA) usando una longitud de onda de 405nm. El ensayo posee una sensibilidad de 1ng/mL y el coeficiente de variación inter e intraensayos es <6%. De manera paralela, para descartar la posibilidad de que el anticuerpo de PRL estuviera reconociendo a la GH, se corrió una curva estandar de GH de 0.001 a 10 ng. Las muestras fueron tratadas de la misma manera en que fue procesada la curva y las muestras para cuantificar a la PRL (tal y como se especifica en el parrafo anterior).

## *Bioensayo en células Nb2*

La actividad biológica de la PRL contenida en los medios fue determinada usando una línea celular linfómica, células Nb2 (amablemente donadas por la Dra. Carmen Clapp del Instituto de Neurobiología), las cuales son sensibles a PRL. Las células fueron sembradas en suspensión o en placas de 96 pozos ( $2.5 \times 10^4$  cells/ 15 mm pozo) en DMEM alto en glucosa (Dulbecco's Modified Eagle Medium GIBCO, N.Y. USA) suplementado con 10% de suero de caballo, 10% de suero fetal bovino y al cual se le agregó 2- $\beta$ -mercaptoethanol ( $10^{-4}$  M). Las muestras y los estándares fueron agregados a los pozos e incubados por 48hrs a 37°C. Para determinar el número de células Nb2, las células se hicieron reaccionar con sal de tetrazolium (MTT) 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide (5 mg/ml en PBS) por 4 h a 37°C. Finalmente, para la detener la reacción, se agregó una solución de SDS al 10% adicionada con HCl (4N) y se dejaron las muestras en la oscuridad por 1hr. Dicho procedimiento resulta en la generación de un color violeta, el cual es cuantificado en un lector automático de placas para ELISA (Bio-Rad) usando una longitud de onda de 590 nm (Ferrari et al., 1990). La curva estándar de PRL fue hecha usando las siguientes concentraciones de PRL de rata: 0.0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0 y 20.0 ng/ $\mu$ l. La sensibilidad de este ensayo va de 10 pg/mL a 1 ng/mL, mientras que el coeficiente intra e interensayo es del 6 y 10%, respectivamente.

### **Marcaje de la PRL usando [3H]-leucina**

A fin de discernir si la acción estimuladora del medio condicionado de ratas lactantes promueve la secreción de PRL recién sintetizada o bien de la hormona madura, se llevo a cabo el marcaje de PRL tanto *in vivo* como *in vitro*. El metodo empleado en estos experimentos fue el mismo que el reportado por Mena y cols (Mena et al., 1989b).

En un primer experimento, grupos de ratas macho fueron inyectados con una dosis única (5mCi/g, i.v ) de [3H]-leucina (45-60 Ci/mmol. New England Nuclear, Boston MA, USA). Al cabo de 1hr, 6hrs ó 24 hrs posteriores a la inyección, grupos de animales fueron decapitados bajo anestesia con éter. La AH fue rápidamente extraída y separada en una porción central y dos laterales.

Como parte de otro grupo de experimentos, se llevó a cabo el marcaje *in vitro* de PRL. Posterior a la extracción de ambas regiones de AH de ratas macho, éstas fueron incubadas por 30 min en 300µL de buffer amortiguador de Krebs-Ringer-bicarbonato adicionado con 10 µCi de 3<sup>H</sup>-leucina.

Las incubaciones en ambos experimentos se llevaron a cabo usando medio de Earle en el caso de los grupos control y medio condicionado de ratas lactantes succionadas en el caso de los grupos experimentales. Dichas incubaciones se llevaron acabo siguiendo el protocolo antes descrito.

La cantidad de [3H]-leucina presente, incorporada a la PRL en los medios de incubación, se cuantificó mediante la separación individual de la banda 23 K de PRL en geles de poliacrilamida. Los fragmentos de gel fueron disueltos a 50°C con peróxido de hidrógeno al 30%. Posteriormente se homogeneizaron en líquido de centelleo (Complete Counting Cocktail 3a70, Research Products International Corp) y se cuantificaron en un espectrómetro (BECKMAN LS 6000 LL).

### **Inmunofluorescencia en cultivos primarios de células AH**

Los experimentos de cultivos primarios de AH de rata se realizaron en colaboración con el laboratorio del Dr. Arturo Hernández en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, siguiendo la técnica reportada por Fiordelisio y cols (Fiordelisio & Hernández-Cruz, 2002). Para dichos experimentos se usaron ratas macho de la Cepa Wistar (n=5) de 300 gr

que se encontraban dentro del bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM con ciclos alternantes de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad, bajo condiciones de temperatura y humedad controladas y con acceso libre a agua y comida.

Los animales fueron anestesiados con éter y decapitados. Se realizó la disección rápida de la AH en una región central y dos laterales, las cuales fueron procesadas de manera independiente. Los fragmentos de tejido fueron transferidos a DMEM frío (Dulbecco's Modified Eagle Media, GIBCO BRL; Rockville MD) complementado con 0.75 mg/ml de Albúmina Sérica Bovina (DMEM-BSA; BSA fracción V, GIBCO BRL). Las porciones de tejido fueron cortadas hasta obtener fragmentos muy pequeños que fueron incubados con tripsina (Worthington Biochem Co.; Lakewood NJ; 2.5mg/ml) a 37 °C por 20 min en agitación continua. Al cabo de dicho periodo los fragmentos de AH fueron dispersados mecánicamente usando una pipeta Pasteur siliconizada de diámetro reducido y centrifugados en una solución de colagenasa tipo I filtrada (Worthington Biochem Co.; Lakewood NJ; 0.5 mg/ml) a 1400 r.p.m. por 10 min. Después de dos lavados con DMEM alternados con dispersión mecánica de las células, éstas fueron resuspendidas en DMEM cultivo (DMEM complementado con 10% de suero de caballo GIBCO BRL, 2% Suero Fetal Bovino GIBCO BRL, inactivados a 60°C durante 1 hora y 5 mg/ml de insulina SIGMA). La suspensión fue transferida a una caja de Petri estéril por un período de 45 minutos para disminuir la cantidad de fibroblastos presentes en ella. Posteriormente, las células que no se adhirieron al plato fueron sembradas en un volumen de 100µl/pozo (~500 000 células/pozo) en cubreobjetos de vidrio redondo número 1 (Thomas Scientific; Swedesboro NJ) previamente tratados con 100 µg/ml de poly- L-lisina (SIGMA). Después de 30 minutos se agregó a cada pozo 1 ml de medio de cultivo y las células se mantuvieron a 37°C durante 18 a 20 horas en una incubadora con una atmósfera de 95% O<sub>2</sub>, 5% CO<sub>2</sub>.

Al día siguiente se agregaron 500  $\mu$ l/pozo de medio Earle pH 7.3 o de medio condicionado 2x pH 7.3, por la región lateral de AHs de ratas lactantes succionadas y se mantuvieron en incubación por un período de 30 minutos. Posteriormente las células fueron lavadas con amortiguador de fosfatos salino (PBS) 0.1M y se fijaron por 30 minutos con paraformaldehído al 4% en PBS 0.1M. Al cabo de dicho periodo y posterior a ser lavados con PBS, se incubaron por 30 minutos a temperatura ambiente en una solución de bloqueo y permeabilización (0.2% BSA, 0.1% de tritón X-100 en PBS 0.1M). Posteriormente las células fueron incubadas a 4°C durante toda una noche con uno de los anticuerpos primarios policlonales hechos en conejo para PRL (anti-rPRL-IC-5; dilución 1:15 000) o para GH (AFP5672099; dilución 1: 20 000) de rata, amablemente proporcionados por el Dr. A.F. Parlow del Programa Nacional de Hormonas Hipofisarias del NIH-NHIDDK. Al finalizar dicho periodo de incubación, las células fueron lavadas con PBS e incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario anti IgG de cabra anti-conejo acoplado a fluoresceína (SIGMA; dilución 1:100). Finalmente las células fueron lavadas y montadas en portaobjetos de vidrio con medio de montar (DAKO) para realizar el conteo y análisis morfológico de las células.

#### *Conteo de células y observaciones morfológicas*

El conteo de las células de PRL y GH inmunorreactivas se realizó usando un microscopio de epifluorescencia con un filtro de excitación de 510 a 560nm y un objetivo de 40x de inmersión en aceite. La iluminación provino de una lámpara de mercurio de 100W montada en un microscopio invertido Nikon Diaphot, TMD. En cada preparación se contaron, usando un contador manual, un número total de 4000 células, incluyendo a las células positivas y negativas para cada hormona. Los resultados se expresaron como el porcentaje de células de PRL o GH positivas del número total de células analizadas.

La morfología de las células fue analizada en un microscopio confocal de barrido láser (Bio-Rad MRC 1024; Hercules CA) montado en un microscopio invertido Nikon (Diaphot 300; Nikon) del Instituto de Fisiología Celular. Para las observaciones se utilizó un objetivo de inmersión de aceite 60x y un láser con parámetros de excitación y de emisión de 488 nm y 522 nm respectivamente. La apertura del iris se mantuvo fija en 3.3 a 3.6, la de la ganancia de 846 a 1100 y la potencia del láser de 1 a 3%. Las imágenes fueron capturadas usando el programa Lasersharp 1.02 (Bio-Rad) y analizadas y procesadas con el programa Confocal Assistant.

### **Marcaje con el marcador fluorescente FM1-43**

La dinámica de secreción de células AH de ratas macho en condiciones control y bajo la acción estimuladora del medio condicionado, fue estudiada mediante el uso del marcador fluorescente FM1-43 (Molecular Probes; Cal., USA) en cultivos primarios de AH de ratas macho, los cuales fueron obtenidos de la misma manera en que se detalla en la sección anterior. Las propiedades que posee el marcador de 1) tornarse fluorescente de manera reversible al entrar en contacto con membranas celulares, 2) no difundir libremente a través de la membrana lipídica y 3) ser prácticamente no fluorescente en un medio acuoso, han permitido el estudio de los procesos de exocitosis, endocitosis y tránsito de membranas.

Posterior a la liberación y reciclaje de vesículas de secreción, el marcador fluorescente es internalizado en la célula, lo cual puede ser observado como un incremento en la brillantez de la membrana plasmática y aparición de gránulos de secreción (protocolo tomado de Molecular Probes). El procedimiento consistió en exponer a las células (alrededor de 500, 000 células sembradas/pozo) al marcador (5 µg/ml de medio de Earle) por un periodo de 5 a 10 minutos seguido de un lavado exhaustivo

con medio de Earle libre de marcador. Posteriormente, la células fueron incubadas por 30min en medio de Earle, en medio condicionado de ratas macho o en medio condicionado de ratas lactantes. La fluorescencia fue continuamente monitoreada a lo largo de la incubación (excitación 480/30 nm, emisión 535/40 nm; Chroma Technology Corp.), usando un objetivo para fluorescencia de inmersión (63x, 1.3 NA, Leitz Wetzlar; Germany). Las imágenes digitales fueron obtenidas cada 5 minutos con una cámara digital CCD (SenSys 0401E, Roper Scientific; Tucson AZ, USA). La iluminación se limitó a 100ms con un obturador electrónico Uniblitz (Vincent Associates; Rochester NY, USA).

### **Microscopía Electrónica**

Las regiones lateral y central de AHs de ratas macho fueron incubadas en medio de Earle o en medio condicionado de ratas lactantes succionadas, siguiendo el protocolo convencional ya antes descrito. Posterior a la incubación se obtuvieron fragmentos de AHs de 1 mm<sup>3</sup>, los cuales fueron fijados durante 30 min en 3% de glutaraldehído en amortiguador de cacodilatos 0.1 M, pH 7.4 a 4°C. Las muestras fueron deshidratadas usando diluciones graduales de etanol (70-100%), infiltradas por 48 hrs e incluidas en resina LR White (Polysciences). Los bloques incluidos fueron polimerizados en un horno a 60 °C por 24-48 hrs. Una vez talladas las pirámides, sobre cada bloque de tejido se realizaron cortes semifinos en un ultramicrotomo (RMC) usando para ello cuchillas de vidrio. Los cortes obtenidos de cada bloque fueron montados, teñidos con azul de toluidina y analizados bajo el microscopio de luz para evaluar la calidad de preservación del tejido, así como para seleccionar el área de interés a observar bajo el microscopio electrónico. Los cortes finos (70 nm), obtenidos con una cuchilla de diamante, fueron montados en rejillas de níquel (300 mesh) cubiertas con membrana de formvar. La inmunocitoquímica para identificar células de PRL se realizó d ela



siguiente manera: Se incubaron durante 30 min los cortes montados en las rejillas en una solución de bloqueo de PBS-BSA 1% (Amortiguador salino de fosfatos y albúmina sérica bovina) adicionada con 0.1% de Tween 20. Posteriormente los cortes fueron incubados en una cámara húmeda a 4°C por toda una noche con anticuerpo primario contra PRL de rata (Programa Nacional de Hormonas Hipofisarias del NIH-NHIDDK; dilución 1:50). Después de lavar de manera exhaustiva las rejillas en PBS-BSA, estas se incubaron durante 1 hr en una cámara húmeda a 37°C con anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a partículas de oro de 10 nm (1:50, EMS) de diámetro. Finalmente, las muestras fueron contrastadas con plomo y acetato de uranilo siguiendo el protocolo descrito por Hayat (Hayat, 1986) y observadas bajo el microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 JEOL de la Unidad de Microscopía Electrónica del INb.

### **Aislamiento y purificación de gránulos de PRL**

El aislamiento de gránulos se llevó a cabo mediante la técnica continua de fraccionamiento celular por gradientes de densidad usando sacarosa (Zanini & Giannattasio, 1973) (Zanini & Giannattasio, 1972) (Carty et al., 1982), de manera inmediata posterior a la incubación por 30 min de la RL y RC de AHs de ratas macho en medio de Earle (controles) o en medio condicionado de ratas lactantes succionadas. La técnica empleada consistió en homogeneizar en frío como mínimo 100mg de AH de ratas macho con el homogeneizador GLAS COL (Laboratory Motor) durante 10 seg/mg de tejido. El tejido fue homogeneizado usando 100 UL de amortiguador Trizma-Sacarosa pH 7.0) ( Trizma 20 mM, sacarosa 0.27 M) por cada 7 mg de AH. Posteriormente, el homogenado es centrifugado a 4°C durante 5 min a 4000 rpm (Centrífuga SORVALL RC5C). El sobrenadante fue transferido a tubos Eppendorff de 1.5 mL y centrifugado a 4°C durante 20 min a 10,000 rpm. Posteriormente, se tomó el pellet

formado con una espátula y se transfirió a un tubo para centrifuga de 15 mL SORVALL. Se agregaron 10 mL de amortiguador Trizma-sacarosa y 5 mL de Percoll y se centrifugaron las muestras a 4°C durante 1hr a 10,000 rpm (Centrifuga SORVALL RC5C). Al finalizar, se removió con cuidado el exceso de amortiguador hasta llegar al anillo inferior, localizado cerca del fondo del tubo. Esta fracción fue transferida a tubos de policarbonato de 6x 76 mm (Beckman) a los cuales se les agregó amortiguador Trizma-sacarosa. Las muestras fueron centrifugadas 5 veces a 35,000 rpm durante 5 min para remover el percoll. En cada ciclo el pellet fue transferido a un nuevo tubo, agregando amortiguador Trizma-sacarosa fresco.

Finalmente, las variantes moleculares de PRL contenidas en todas las fracciones granulares fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western Blots.

#### *Western Blot*

#### *Electroforesis desnaturalizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)*

Los medios de incubación fueron disueltos e incubados a 95°C por 10 min en presencia o ausencia del agente desnaturalizante  $\beta$ -mercaptoetanol. Las muestras (10  $\mu$ g de proteína/carril), los marcadores de peso molecular (Bio-Rad) y el estándar de PRL (500 ng) se colocaron en geles SDS-PAGE de 0.75mm de grosor (gel concentrador, acrilamida al 4% y gel resolvidor, acrilamida 16%, bisalcrilamida 3%). La electroforesis se llevó a cabo aplicando 90V de manera constante durante 3hrs.

#### *Transferencia a Membranas de Nitrocelulosa*

Una vez terminada la electroforesis, las proteínas separadas en los geles de placa fueron transferidas a papel de nitrocelulosa (Bio-Rad) durante 1 hora aplicando 0.2 A. Al terminar la transferencia, los geles son

teñidos con azul de Coomasie al 0.1%, diluido en una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10%, durante una noche con objeto de analizar la efectividad de la transferencia de las bandas proteínicas a las membranas. Las membranas son lavadas rápidamente con agua desionizada y posteriormente con TBS, antes de ser incubadas por un periodo de 2hrs en una solución de bloqueo con leche al 5% en TBS. Después de ser lavadas las membranas con TTBS, éstas fueron incubadas por toda una noche con anticuerpo primario policlonal contra PRL de rata (Programa Nacional de Hormonas Hipofisarias del NIH-NHIDDK; dilución 1:800) en leche al 1% en TTBS. Al día siguiente, después de ser lavadas las membranas con TTBS, estas se incubaron por 2hrs con un anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a una peroxidasa de rábano (1:2000; Cappel) en una solución de leche al 1% en TTBS y posteriormente con una peroxidasa anti-peroxidasa por 30 min (1:500 Polysciences, Warrington PA, USA). Finalmente, las bandas de PRL inmunorreactivas, fueron visualizadas usando 3,3-diaminobenzidina tetrahidroclicorada (Polysciences; 50%) como sustrato. El peso molecular de las bandas de PRL se estimó usando como referencia marcadores proteínicos preteñidos (Bio-Rad).

La densidad óptica de las bandas de PRL fue determinada usando un escáner densitométrico Hoefer (GS300; San Francisco CA, USA) y un software KODAK 1D V. 3.5.3. (Scientific Imaging System, Eastman Kodak Company), que permitió el análisis densitométrico de dichas bandas. Mediante este procedimiento es posible realizar de manera independiente la cuantificación de cada una de las bandas inmunorreactivas de PRL. Sin embargo, debido a que el tiempo que se requiere para transferir las bandas de PRL puede ser variable así como que las diferentes formas moleculares poseen diferente inmunoreactividad con el anticuerpo empleado, no se llevó a cabo este tipo de análisis en este estudio.

## **Separación de los componentes del Medio Condicionado mediante Cromatografía líquida rápida de alta resolución (FPLC)**

Alícuotas de 3.5ml de medio condicionado 2x, obtenidas a partir de la incubación de 23 AH de ratas lactantes, fueron inyectadas a una columna de filtración molecular HiLoad 200pg 26/20 (Pharmacia Biotech; 26 mm d.i. x 600 mm, 34  $\mu$ m tamaño promedio de las partículas). Con el propósito de no introducir sales, se usó agua desionizada fría para eluir a una velocidad de flujo de 4 ml/min por medio de un sistema de FPLC (FPLC System; Pharmacia Biotech). Las fracciones seleccionadas fueron colectadas a diferentes tiempos y liofilizadas (Freeze Dryer 5, Labconco). Se corrieron marcadores de peso molecular (Bio Rad) en la columna. Sin embargo, no es posible visualizar los intervalos de peso molecular en cada una de las fracciones debido al uso de agua para eluir. Posteriormente, cada una de las fracciones fue disuelta en 3.5 ml de medio de Earle y usada para determinar la presencia de bandas proteínicas mediante SDS-PAGE y para determinar su actividad biológica al ser probadas en sobre AHs de ratas macho (incubaciones por 30 min). La técnica empleada para la obtención de geles en placa (SDS-PAGE) se encuentra detallada en la sección anterior. Para el caso del carril del medio condicionado se aplicaron 1.7  $\mu$ g de proteína, mientras que para cada fracción se aplicaron 0.5  $\mu$ g de proteína/carril, a excepción de la fracción III, en la cual no se obtuvo tal cantidad de proteína. Una vez obtenidos los geles, estos fueron teñidos con azul de Coomassie al 0.1%, diluido en una solución de metanol al 40% y ácido acético al 10%, durante una al menos 4hrs y desteñidos usando metanol al 40% y ácido acético al 10%.

### *Caracterización preliminar de las fracciones obtenidas mediante FPLC en medios condicionados*

Las fracciones liofilizadas I-IV, fueron disueltas en 3.5ml de amortiguador Tris-fosfatos 0.05M, pH 7.8 y tratadas con una mezcla de 4 proteasas: tripsina (tipo IX obtenida de páncreas bovino, Sygma), subtilisina (obtenida de *Bacillus licheniformis*, Carlsberg), proteasa tipo XIV (obtenida de *Streptomyces griseus*) y proteasa tipo V8 (obtenida de *Staphylococcus aureus*) a 37°C durante 24 h. La dilución a la cual se usó la mezcla de proteasas fue de 1µL de solución stock de proteasas (1 mg/mL de agua) por 100µL de fracción disuelta en amortiguador. La muestra control fue preparada al diluir la mezcla de proteasas en 3.5ml de amortiguador Tris-fosfatos 0.05M. Posterior a la incubación con las proteasa, las muestras fueron evaporadas y reconstituidas con 3.5 mL de medio de Earle para determinar la presencia de bandas proteínicas mediante SDS-PAGE y para determinar su actividad biológica al ser probadas sobre AHs de ratas macho (incubaciones por 30 min)

### **Análisis Estadístico**

Los datos correspondientes a la cantidad de total PRL secretada por AHs de ratas macho incubadas en los medios condicionados fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía para cada variable. Las diferencias entre los efectos para cada uno de los experimentos fueron determinadas mediante comparaciones posthoc (Tukey). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. El nivel de significancia fue de  $p < 0.05$ .

Para determinar el efecto del medio condicionado sobre la proporción de células con inmunorreactividad positiva a PRL y GH, se realizaron ANOVA de una vía y una prueba de  $X^2$ . Los datos se encuentran

expresados como el promedio  $\pm$  error estándar. Los valores de  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

La significancia de los efectos de la cicloheximida sobre la secreción de PRL fue determinada mediante un ANOVA de tres vías (medio x droga x muestra) con medidas repetidas en un factor seguida por comparaciones planeadas. Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. El nivel de significancia fue de  $p < 0.05$ .

## **CAPITULO VII**

### **RESULTADOS**

#### **Experimento 1**

*Efectos de tipo dosis-respuesta de medios condicionados por la región lateral de ratas lactantes sobre la cantidad de PRL secretada por AH de ratas macho*

La cantidad de hormona secretada a los medios de incubación fue cuantificada mediante tres diferentes técnicas: PAGE (Fig 16 A y B), Bioensayo (Fig 16 B y C) y ELISA (Fig. 16 E y F).

Como se muestra en la Fig. 16 A-F cuando AHs de rata macho se incuban en medios condicionados de ratas lactantes succionadas y no succionadas se observa, de manera consistente, una estimulación en la secreción de PRL secretada por ambas regiones. En general se puede observar que la región central de la AH del macho responde secretando una mayor cantidad de hormona que la región lateral bajo influencia de ambos medios condicionados. En cuanto a los efectos de dosis-respuesta podemos observar que solo en algunos casos, la intensidad de los efectos varía dependiendo tanto de la concentración a la cual se probó el medio condicionado, como de la región de hipófisis probada. En todos los casos, a excepción de cuando se determinaron los efectos del medio condicionado de ratas succionadas mediante ELISA (Fig. 16E, en el cual solo la concentración 2x mostró un efecto de estimulación), las tres concentraciones de ambos medios condicionados ejercieron efectos estimuladores sobre la secreción de PRL por ambos fragmentos de la AH de la rata macho. Asimismo, se puede observar que a excepción de cuando se determinó mediante bioensayo el efecto del medio condicionado

de ratas succionadas (Fig. 16C, en el cual existen diferencias en los efectos inducidos por las concentraciones 0.5x y 1x), las concentraciones 0.5x y 1x de ambos medios condicionados ejercieron efectos similares sobre la cantidad de PRL secretada por ambas regiones de la AH del macho. Por otro lado, en todos los casos el medio condicionado en su concentración 2x ejerció el efecto estimulador más potente sobre la secreción de PRL comparado con los efectos ejercidos por las concentraciones 0.5 y 1X. Este efecto se observó en todos los casos, independientemente de la técnica usada para cuantificar a la PRL, del origen de medio condicionado y de la región de la AH del macho empleada para probar los efectos. Dada la consistencia de los efectos inducidos por el medio condicionado 2x independientemente de la técnica con la cual se evalúen, decidimos emplear en los experimentos consecutivos dicha concentración y usar la técnica de PAGE para cuantificar de manera rutinaria a la hormona.



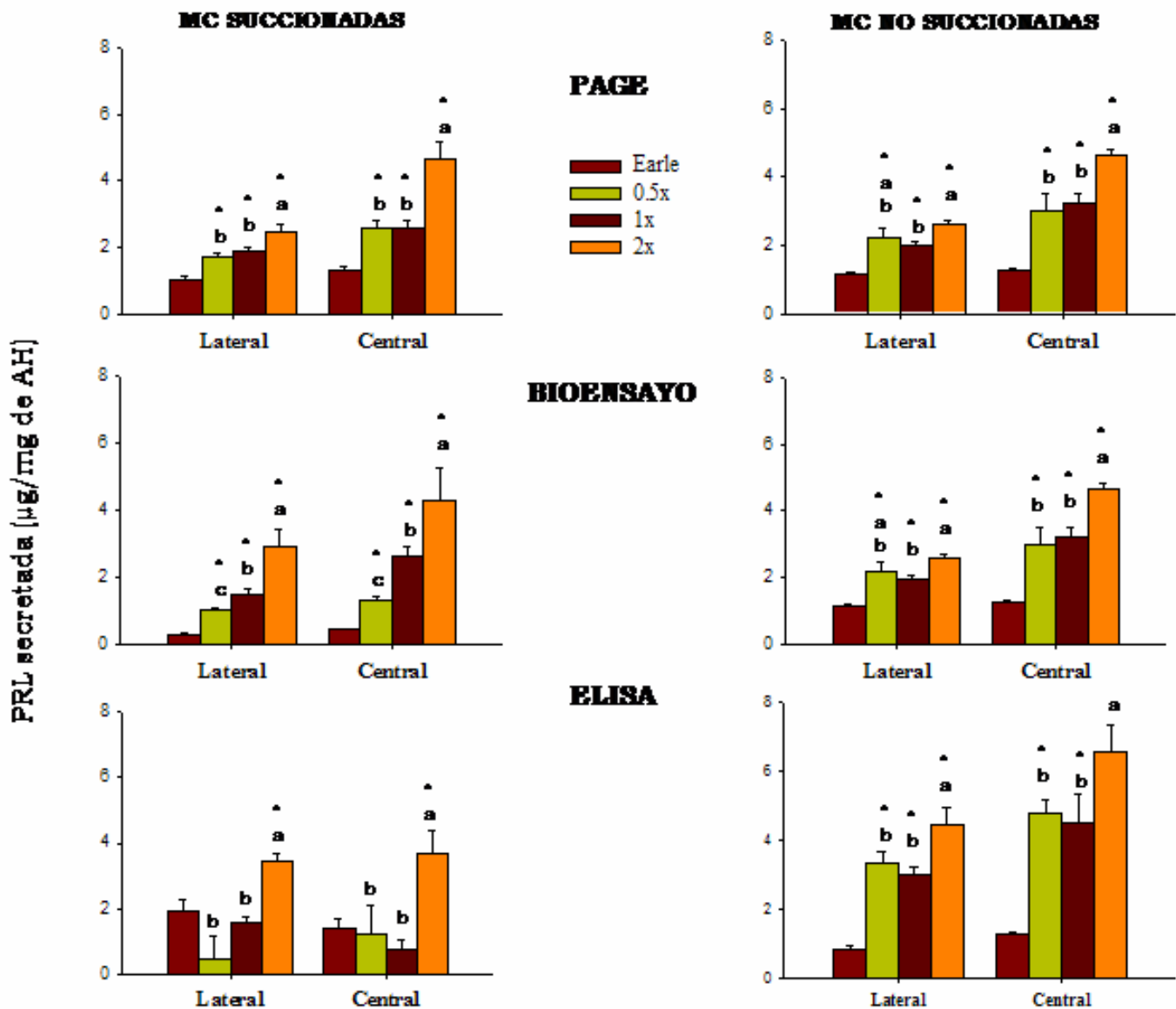


Fig. 16. Efecto de incubar la región lateral y central de AH de ratas macho en medio condicionado (MC) por la región lateral de lactantes succionadas y no succionadas sobre la concentración de PRL secretada y analizada mediante PAGE (A, B), Bioensayo (C,D) y ELISA (E,F). Ambas regiones fueron incubadas durante 30 min en solución de Earle (n=5) o en los MCs reconstituidos a diferentes concentraciones (0.5x, 1x y 2x). Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  vs grupo control. Los grupos que no comparten la misma inscripción son significativamente diferentes unos de otros ( $p < 0.05$ ).

## **Experimento 2**

*Efecto del medio condicionado de ratas lactantes succionadas, sobre la proporción y distribución intracelular de PRL y GH inmunorreactiva en lactotropos y somatotropos en cultivos primarios de AH de ratas macho.*

Como se observa en la Fig. 17A, ocurre un incremento en el porcentaje de células inmunorreactivas a PRL *vs.* de  $28 \pm 1.02\%$  en el grupo de células de la región central del macho incubadas en medio de Earle a  $43 \pm 0.98\%$  ( $p < 0.05$ ) cuando células de la misma región son incubadas en el medio condicionado por AH de ratas succionadas, pero no se observó ningún efecto sobre el porcentaje de células inmunorreactivas a GH cuando la misma región de la AH del macho fue incubada en el mismo medio condicionado. De manera similar a lo que ocurre en la región central, se observó un incremento en el porcentaje de células inmunorreactivas a PRL en la región lateral (Fig. 17 B) del macho de  $31 \pm 1\%$  en el grupo control a  $41 \pm 1.2\%$  ( $p < 0.05$ ) en el grupo experimental y tampoco hubieron cambios en ésta región en cuanto al porcentaje de células inmunorreactivas a GH, i.e., de  $47 \pm 0.9\%$  en el grupo control a  $44 \pm 1.3\%$  ( $p > 0.05$ ) en el grupo experimental. No se observaron diferencias en el número de células inmunorreactivas para ambas hormonas entre las dos regiones, tanto en el grupo control como experimental.

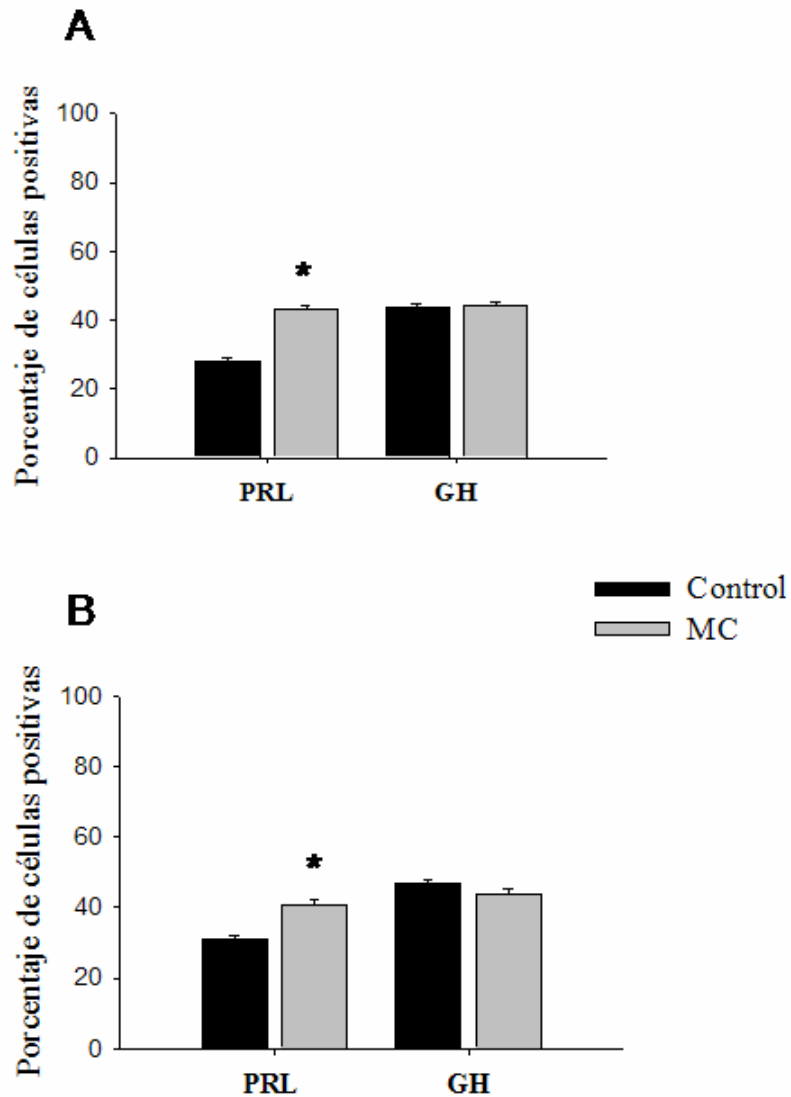


Fig. 17. Efecto de incubar células de la región central (A) y lateral (B) de AH de ratas macho en medio Earle (n=5) o en medio condicionado de ratas lactantes succionadas (n=5) sobre la proporción de células inmunorreactivas a PRL y GH. Las diferencias entre los grupos control y experimental fueron analizadas mediante un ANOVA de una vía y mediante la prueba de  $\chi^2$ . Los datos se expresan como la media  $\pm$  error estándar. \*  $p < 0.05$  vs control.

Como se muestra en la Fig. 18 A-D, la distribución hormonal para el caso de PRL inmunorreactiva se modificó cuando las células de ambas regiones del macho fueron incubadas en el medio condicionado. En el caso del grupo control (Fig. 18 A, C) se observa que la PRL inmunorreactiva se encuentra principalmente concentrada en áreas localizadas cerca del núcleo celular que podrían corresponder al complejo de Golgi (Fig. 18 A, C). De manera contraria, cuando las células son incubadas en el medio condicionado (Fig. 18 B, D) se observa que, adicionalmente a este sitio de expresión, existe inmunorreactividad a la PRL distribuida de manera mucho mas difusa y dispersa en el citoplasma de las células, las cuales pudieran corresponder a gránulos o vesículas de secreción que son movilizadas por efecto del medio condicionado. Por el contrario, la distribución de GH en células incubadas en el medio condicionado es similar a la que se encuentra en los grupos control (Fig. 19 A-D), caracterizada por una distribución homogénea de la hormona en todo el citoplasma, por lo que los efectos del medio condicionado parecerían ser específicos sobre células secretoras de PRL.

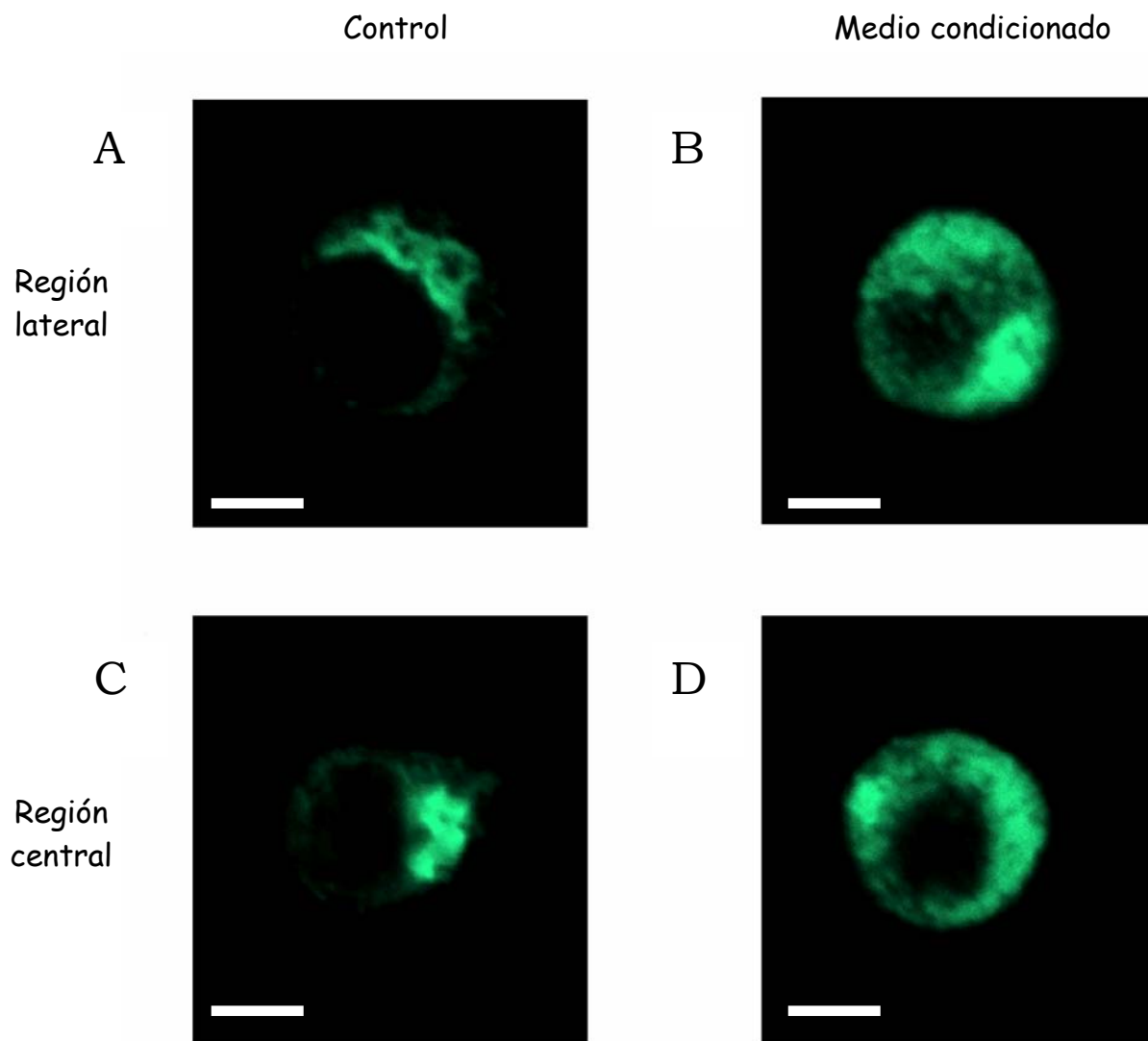


Fig. 18. Efecto de incubar células de la región lateral ( A, B) y central (C, D) de AHs de ratas macho en medio de Earle (A, C) o en medio condicionado (B, D) de ratas lactantes succionadas sobre la distribución intracelular de PRL inmunorreactiva. Las barras de calibración corresponden a 10 $\mu$ m. Imágenes representativas de al menos 10 experimentos.

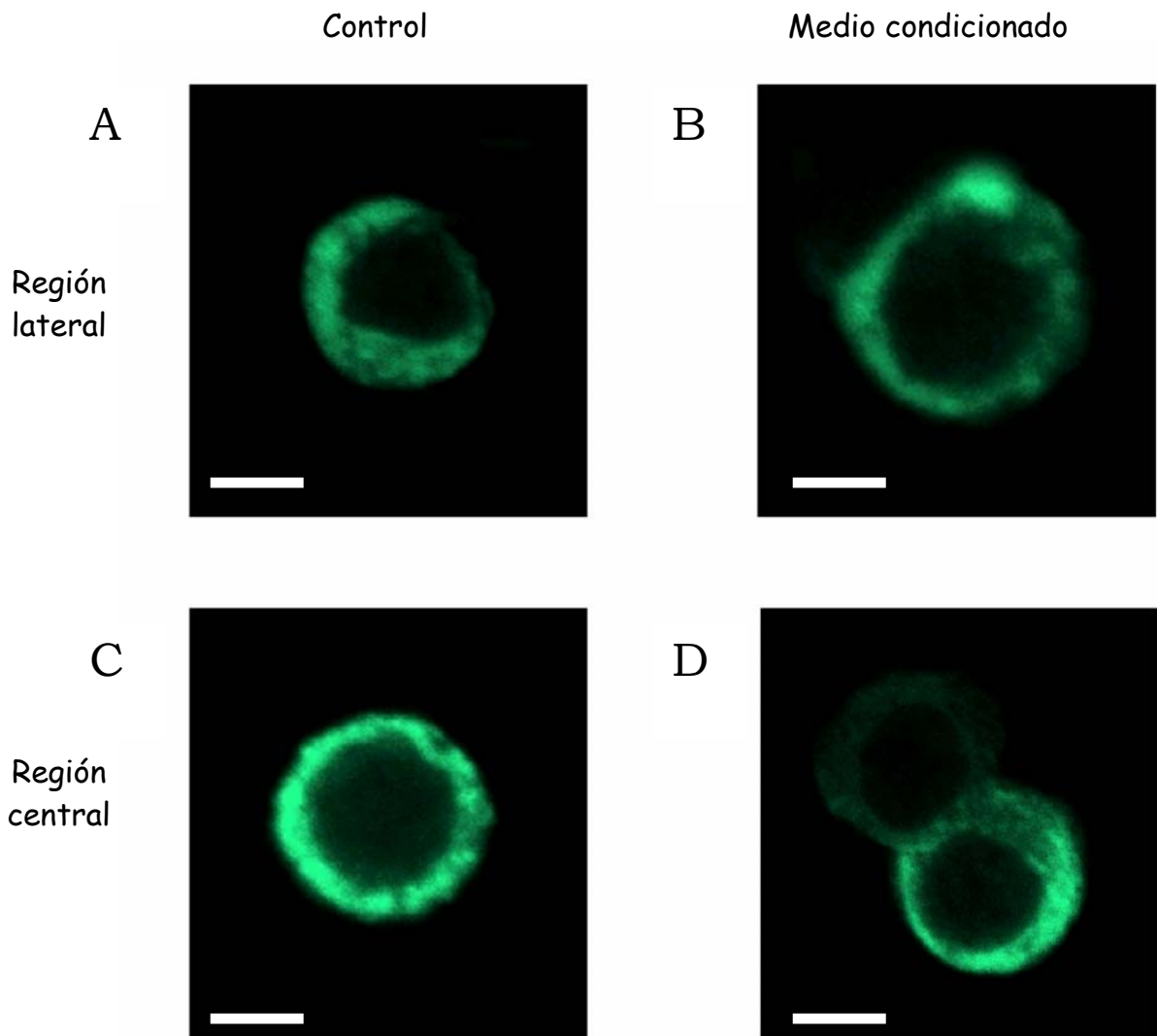


Fig. 19. Efecto de incubar células de la región lateral (A, B) y central (C, D) de AHs de ratas macho en medio de Earle (A, C) o en medio condicionado (B, D) de ratas lactantes succionadas sobre la distribución intracelular de GH-inmuno-reactiva. Las barras de calibración corresponden a 10 $\mu$ m. Imágenes representativas de al menos 10 experimentos.

### **Experimento 3**

*Evaluación del efecto del medio condicionado de ratas lactantes succionadas sobre la dinámica de secreción en células adenohipofisarias usando el marcador FM1-43*

La incubación de células AHs en cultivos primarios durante 10 min. en presencia del marcador fluorescente FM1-43, produjo un marcaje muy débil y difuso en la mayoría de las células. Cuando las células marcadas se incubaron en el medio condicionado, la intensidad en la fluorescencia fue incrementando de manera temporal, sugiriendo que ocurre un proceso de exocitosis y posteriormente el marcador se internaliza en la célula mediante endocitosis. El incremento en la fluorescencia intracelular ocurrió a partir de los 5 min. posteriores a la incubación y pudo ser observado en algunos casos como pequeñas vesículas de secreción (Fig. 20 A-C). Por otro lado, cuando las células marcadas fueron incubadas durante 20 min. en medio de Earle no se detectaron cambios en la intensidad de fluorescencia (Fig. 20), lo cual sugiere que los efectos de estimulación en la dinámica de secreción resultan de la adición de medio condicionado.

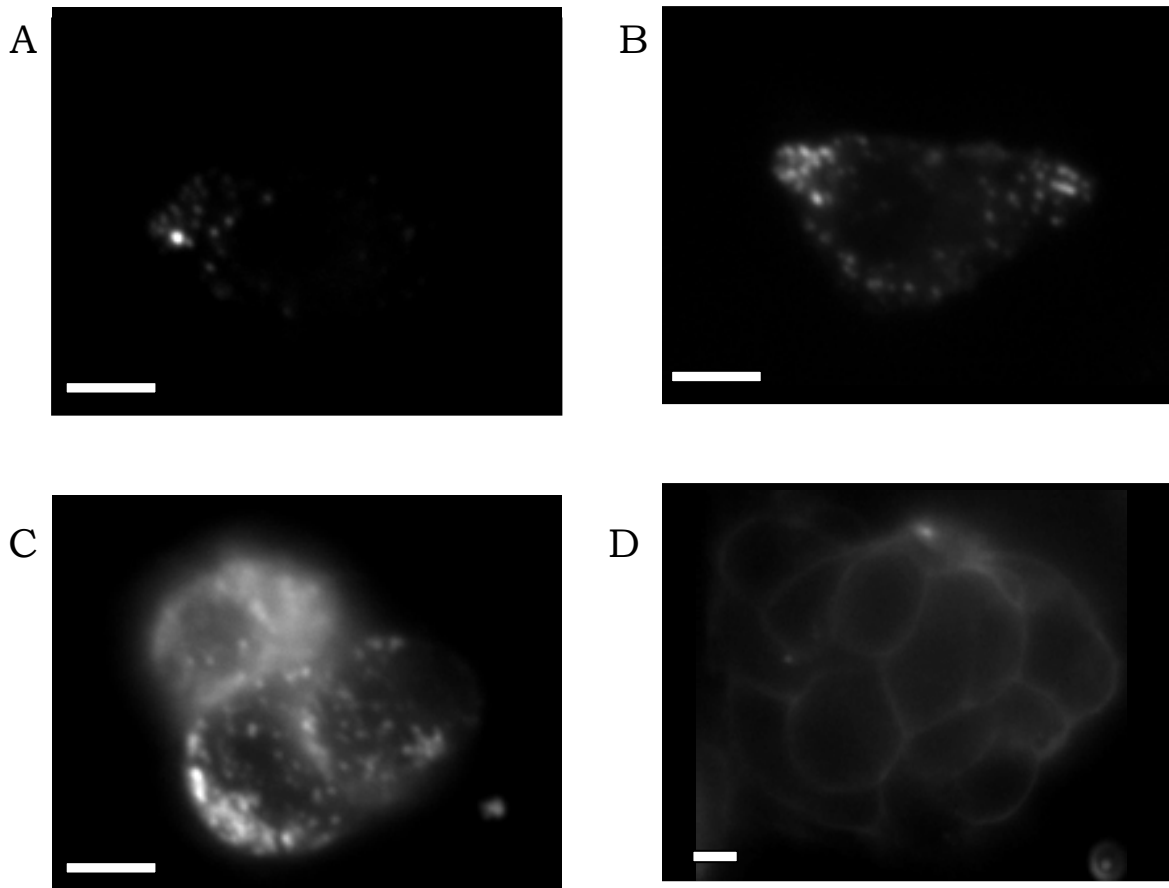


Fig. 20. Efecto del medio condicionado sobre el patrón y distribución del marcador fluorescente FM1-43 en cultivos primarios de células AHs de rata macho incubadas por 20 min. en medio de Earle (D) o en medio condicionado de ratas lactantes (A-C). Las imágenes fueron tomadas a diferentes intervalos de la incubación. A: 5min, B: 15min, C y D: 20min. Las fotografías fueron tomadas usando el objetivo 100x y con un tiempo de exposición de 300ms. Las barras de calibración representan 10 $\mu$ m.



## **Experimento 4**

*Efectos del medio condicionado de ratas lactantes succionadas sobre la distribución y variantes moleculares de PRL inmunorreactiva en gránulos de secreción aislados por gradientes de densidad y analizados por microscopia electrónica y SDS-PAGE/Western Blot.*

Las electrofotomicrografías (Fig 21 A-D) de AH de ratas macho incubadas en medio condicionado muestran una distribución de inmunorreactividad a PRL en gránulos de secreción y en el citoplasma diferente de aquellas AHs incubadas en condiciones control. En las AHs de ratas macho sin incubar e incubadas en medio de Earle, se observa que la hormona se encuentra principalmente concentrada en gránulos de secreción. Por el contrario, cuando las AHs son incubadas en medio condicionado, el macaje no se encuentra confinado a los granulos de secreción, sino que se observan particulas de oro distribuídas en el citoplasma (asociada al RER y/o Golgi) (Fig. 21 C) y localizadas muy cercanas a los gránulos de secreción (Fig. 21 D). La secreción de PRL a partir de los gránulos de secreción puede estar asociada con la formación de microvesículas (Fig. 21 D y E) a partir de las cuales se secreta a la hormona.

Los resultados obtenidos a partir del Western Blot en condiciones no reductoras (Fig. 22 a) y reductoras (Fig. 22 b) en gránulos aislados de PRL posterior a la incubación de AHs de ratas macho en medio de Earle (carril 1) o en medio condicionado (carril 2), muestran que bajo condiciones no reductoras, ocurre una disminución en la inmunorreactividad de la PRL 23K, así como en la mayoría de las bandas que se encuentran entre los 27 a 97 kDa tras la incubación durante 30 min de AHs de ratas macho en medio condicionado (Carril 2 vs 1 en Fig. 22 a). Estos resultados pueden ser también observados en la Fig. 22c, en la cual se muestra que en condiciones control, existe una mayor absorbancia de las bandas

proteínicas que se encuentran en el rango de 23-25 kDa, así como en bandas de mas alto peso molecular (rango de 40-54 kDa) cuando se compara con el grafico de absorbancia obtenido cuando las AHs de ratas macho son incubadas en el medio condicionado. Por el contrario, cuando se analizan los blots obtenidos en condiciones reductoras, solo se observa una sutil reducción en las bandas de 23 kDa y en las bandas que se encuentran entre 27 a 97 kDa posterior a la incubación en el medio condicionado (Carril 2 vs 1 en Fig. 22 b), cuando se comparan con aquellos incubados en medio de Earle (Carril 1 in Fig. 22A y B). Asimismo, en la Fig. 22d, podemos observar que en condiciones reductoras, el patrón de absorbancia entre los dos grupos es muy similar.

La disminución en algunas de las variantes moleculares de PRL inmunorreactiva en granulos aislados posterior a la incubación en medio condicionado, parecería correlacionarse con el aumento en la secreción de PRL, cuantificada por PAGE, bioensayo en células Nb2 y ELISA, por AHs de ratas macho bajo acción del medio condicionado.

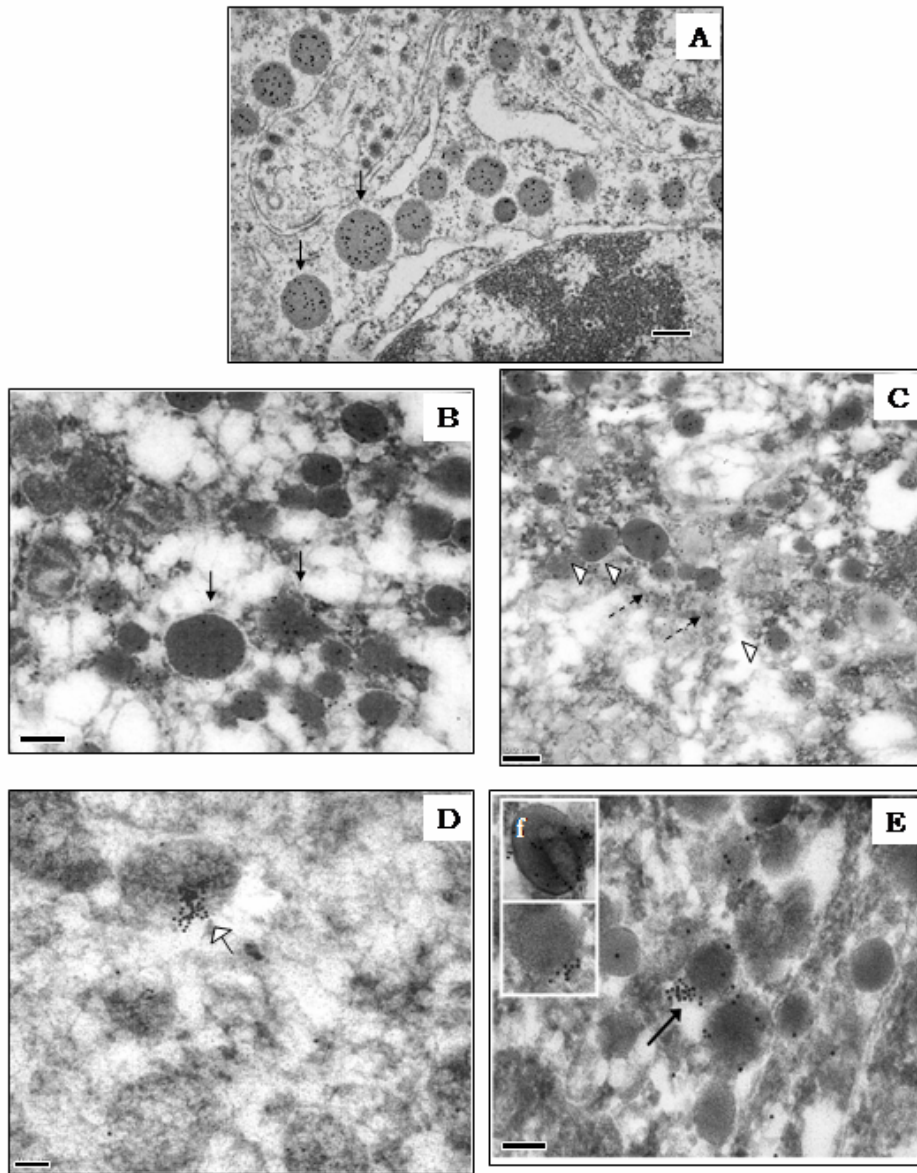


Fig. 21. Electrofotomicrografías que muestran células secretoras de PRL, identificadas mediante inmunocitoquímica usando partículas de oro de 10 nm, en AH de ratas macho sin incubar (A), incubadas en medio de Earle (B) e incubadas en medio condicionado (B-D). En A y B, localización principal de la hormona en gránulos de secreción (flechas). En C, localización de partículas de oro en RER (flechas interrumpidas) y microvesículas (cabezas de flecha). En D y E, localización de varias partículas de oro muy próximas a gránulos de secreción. Nótese que las partículas parecerían ser liberadas de los gránulos (flechas). En el panel f, se muestra un acercamiento de los gránulos. Las barras de calibración corresponden a 200nm.

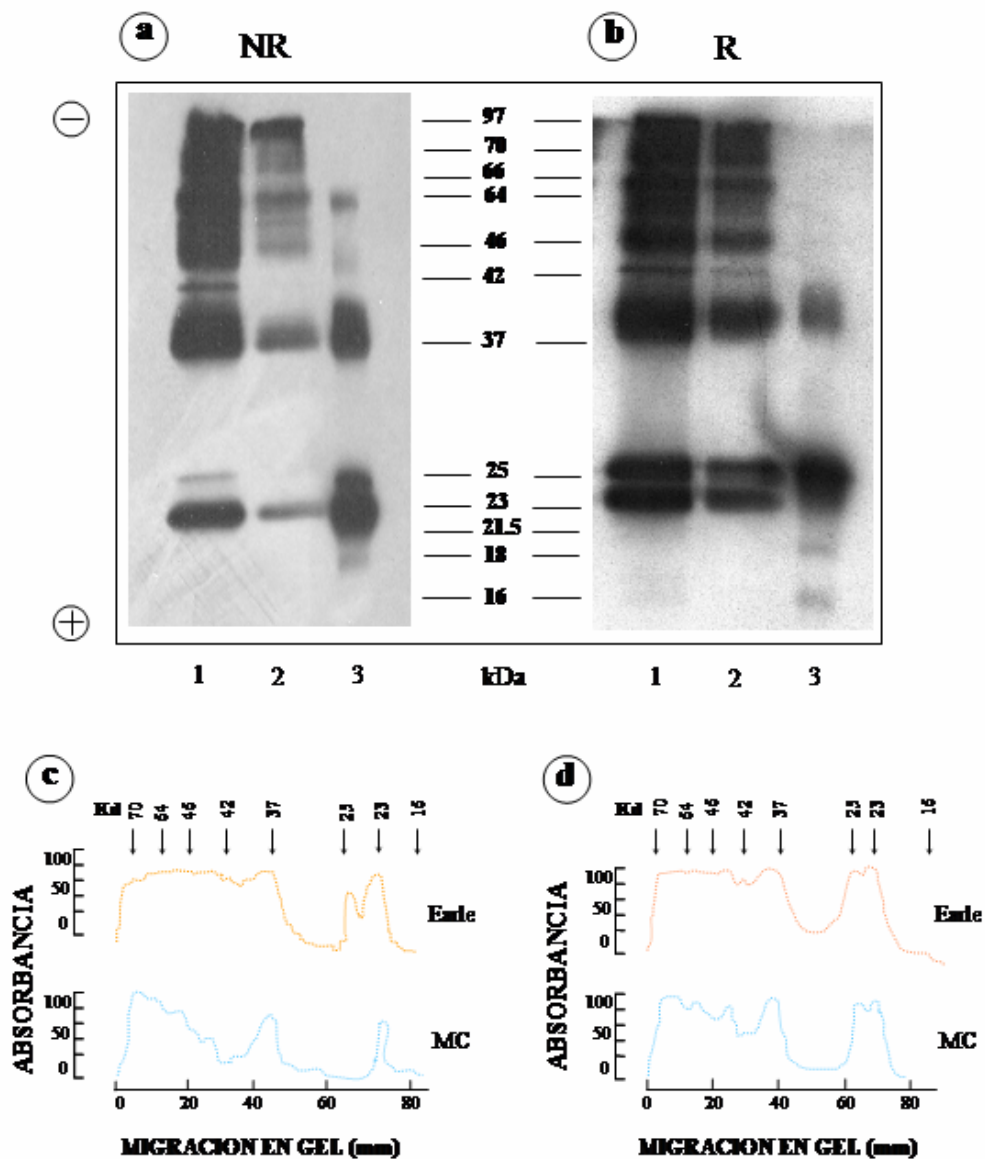


Fig. 22. Western Blot que muestra las bandas inmunorreactivas correspondientes a las diferentes variantes moleculares de la PRL contenida en gránulos aislados de ratas macho obtenidos después de la incubación durante 30 min en medio de Earle n=15 (carril 1) o en medio condicionado (carril 2) de ratas lactantes n=15. El estándar de PRL (500 ng) se muestra en el carril 3. a. Condiciones no-reductoras (NR) y b. Condiciones reductoras (R). En c y d se muestra el grado de absorbancia de las bandas inmunorreactivas presentadas en a y b. Este experimento fue repetido tres veces.

## **Experimento 5**

*Efecto del medio condicionado de ratas lactantes succionadas sobre la secreción de PRL madura y recién sintetizada mediante el marcaje radioactivo in vivo e in vitro de la hormona.*

Como se muestra en la Fig. 23, cuando la RL y RC de AH provenientes de de ratas macho previamente inyectadas (60 min) con [3H]-leucina son incubadas bajo la acción estimuladora del medio condicionado, ocurre un incremento en la cantidad de hormona total secretada al medio de incubación a los 30 y 60 min. posteriores a la incubación comparado con el grupo control. Sin embargo, no existen diferencias en cuanto a la cantidad de PRL marcada contenida en los mismos medios de incubación. De lo contrario, en el grupo de ratas inyectadas 6 hrs. previas a la incubación, se observa una disminución significativa en la secreción de [3H]-PRL por ambas regiones de la AH de la rata macho en las muestras colectadas a los primeros 30 min. de incubación, con relación a los grupos control, pero no a los 60 min (Fig. 23D). Asimismo, no se detectaron cambios en la cantidad de hormona contenida en los tejidos postincubados (no se muestran los datos). Con relación a la cantidad de PRL marcada secretada a las 24 hrs post-inyección, no existen diferencias en cuanto a la cantidad de PRL marcada secretada por ambas regiones a los 30 y a los 60 min de incubación. Sin embargo, la cantidad de hormona marcada parecería ser mayor que la secretada a los 60 min y 6hrs posteriores a la inyección.

En los experimentos en los cuales el marcaje de PRL se llevó a cabo *in vitro* se observa que cuando los fragmentos de AH son incubados en el medio condicionado, existe un incremento en la cantidad de PRL total secretada a los 30 y 60 min. de incubación. Sin embargo, no existen diferencias en la cantidad de [3H]-PRL secretada a los medios de incubación (Fig. 24).

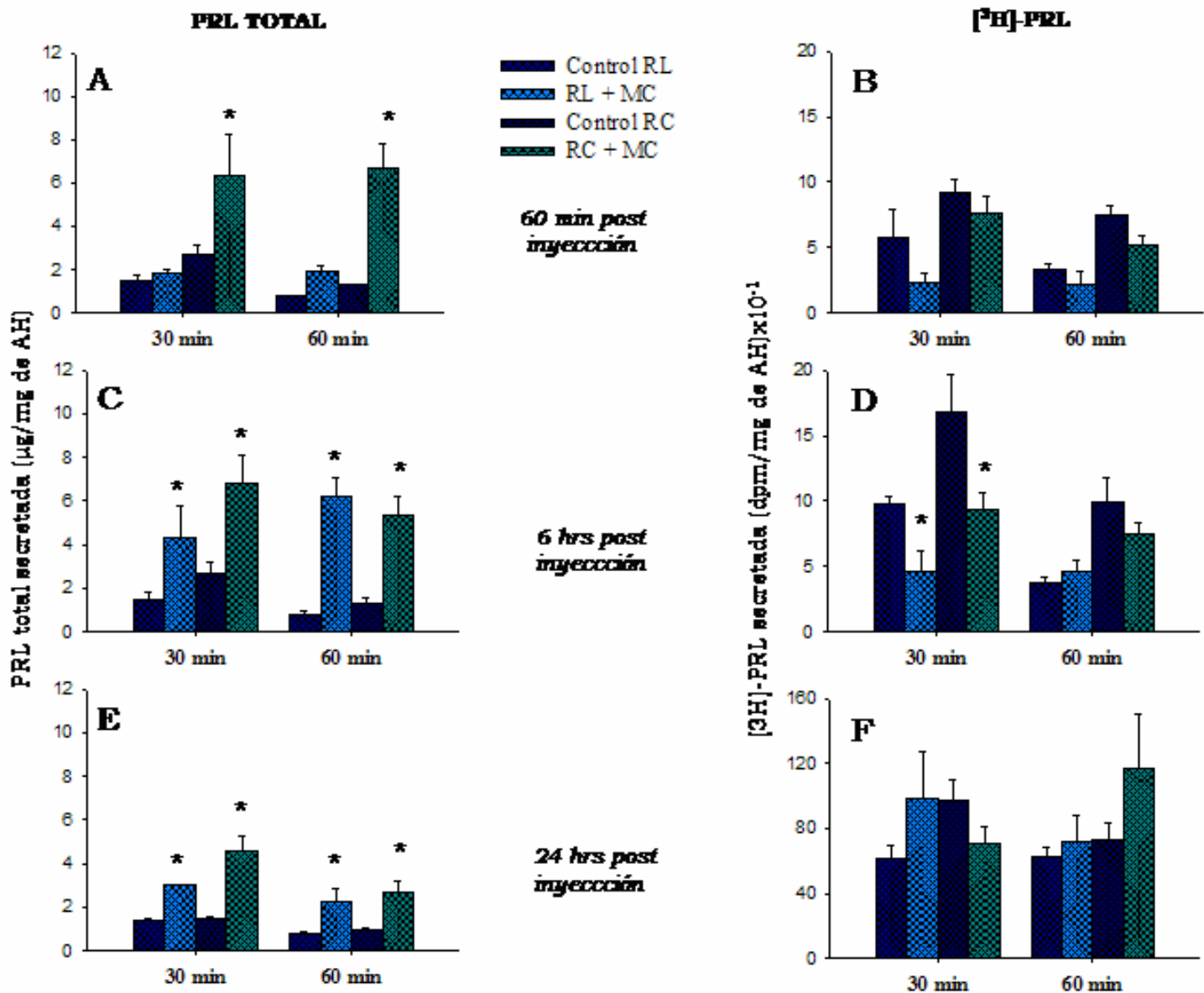


Fig. 23 Secreción de PRL previamente almacenada y sintetizada 1 hr (B), 6hrs (D) ó 24hrs (F) previas a la incubación durante 30 min. de la región lateral (RL) y central (RC) de AH de ratas macho en medio condicionado (MC) de ratas lactantes succionadas n=3, o en medio de Earle n=3. La secreción total de PRL (A,C,E) fue cuantificada mediante PAGE. \* p< 0.05 vs grupo control.

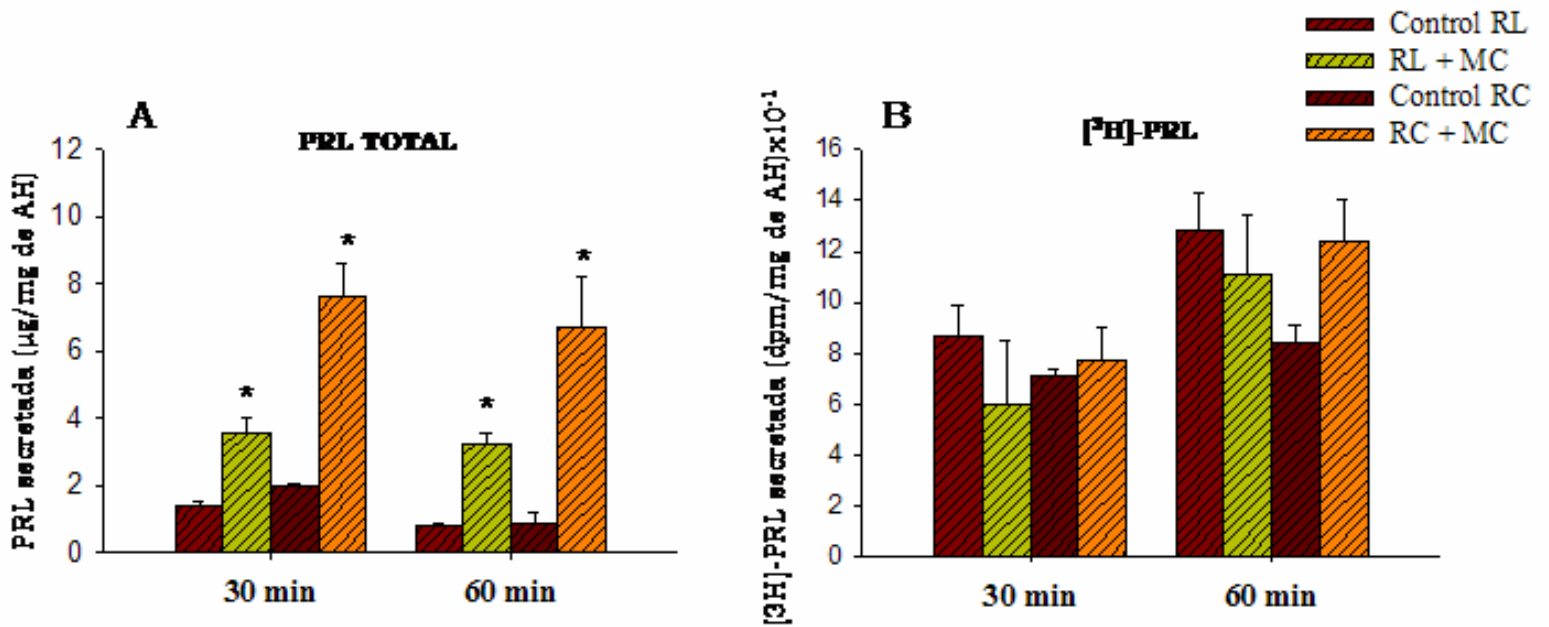


Fig. 24. Secreción de PRL previamente almacenada y sintetizada *in vitro*. Ambas regiones de la AH del macho fueron incubadas de manera previa durante 30 min en (3h)-leucina antes de ser incubadas durante 30 min. en medio condicionado (MC) de ratas lactantes succionadas n=4 o en medio de Earle n=4. En A se muestra la cantidad total de PRL secretada al medio de incubación, mientras que en B, se muestra la cuantificación de la PRL marcada contenida en los mismos medios de incubación. La cantidad de PRL secretada fue determinada por PAGE\* p< 0.05 vs grupo control.

## Experimento 6

*Efecto de la cicloheximida y Brefeldina-A sobre la estimulación de la secreción de PRL inducida por acción del medio condicionado de ratas lactantes sucionadas en AH de ratas macho*

Para evaluar el papel del medio condicionado en la síntesis *de novo* de proteínas, AH de ratas macho fueron incubadas en medio de Earle y en medio condicionado en presencia o ausencia de cicloheximida (inhibidor de la traducción del ARNm a proteína).

En la Fig. 25A se observa que en el grupo de AHs de machos incubadas en medio de Earle, la región central secreta una menor cantidad de PRL a los 60 min en comparación con los primeros 30 min de incubación ( $F(1, 16) = 8.14, p < 0.05$ ) y que este efecto no se modifica cuando al medio de Earle se le adiciona cicloheximida ( $50\mu\text{g/ml}$ ). Tal y como se esperaba, debido a los efectos descritos anteriormente, se observó un incremento tanto a los 30 como a las 60 minutos de incubación en la cantidad de PRL secretada por las regiones lateral y central del macho cuando fueron incubadas en el medio condicionado, el cual no se modificó ante la presencia de cicloheximida.

En una serie de experimentos independientes, se evaluó el efecto del medio condicionado sobre el tránsito de vesículas de secreción, mediante la incubación de AH de ratas macho en medio de Earle y en medios condicionados en presencia o ausencia de brefeldina-A ( $0.05\mu\text{g/ml}$ ). Los resultados muestran que el incremento en la cantidad de PRL inducido por efecto del medio condicionado no se afecta ante la presencia de brefeldina en el medio condicionado (Fig. 25B).



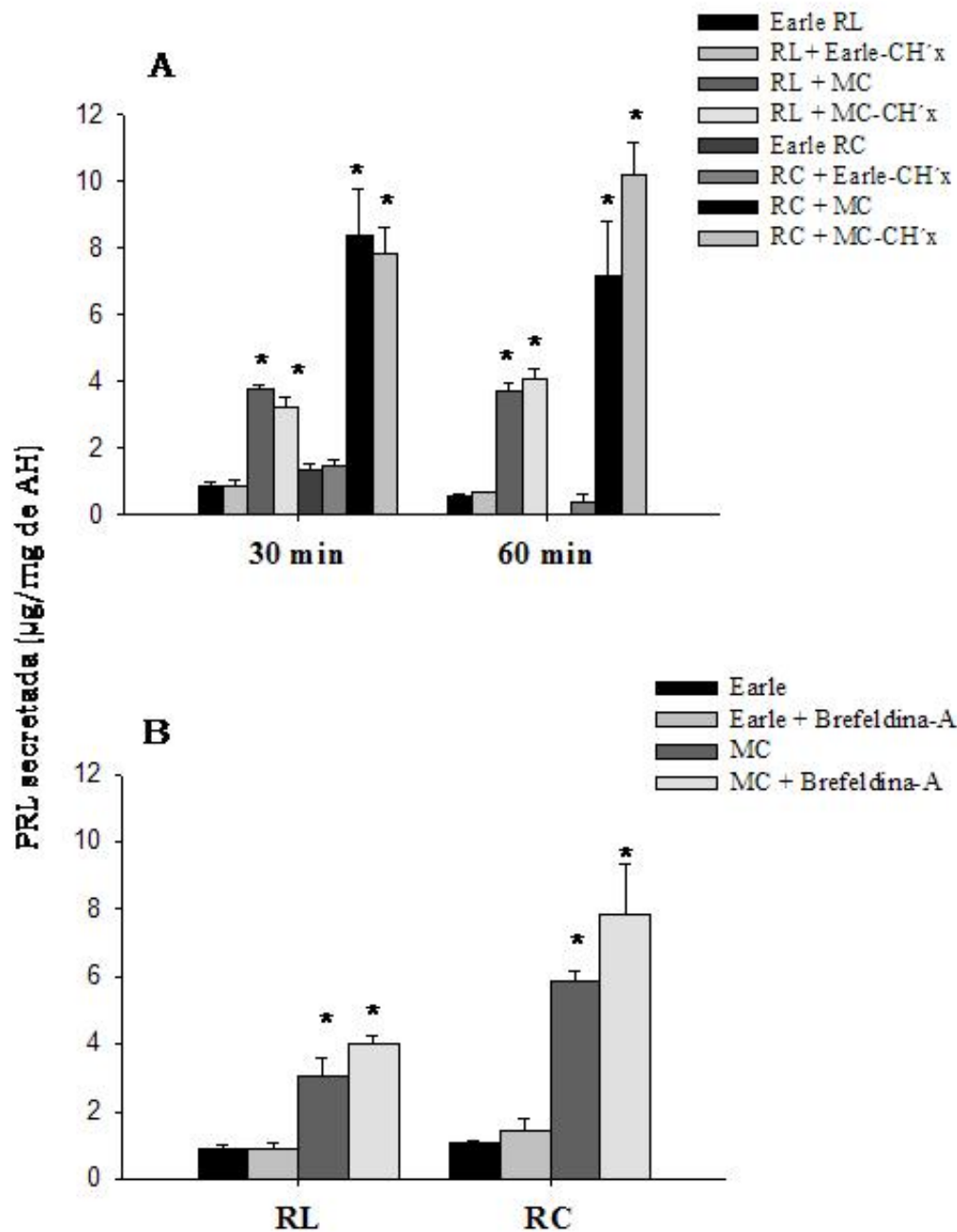


Fig. 25. Efecto de la cicloheximida (CH'x) (A) y brefeldina-A (B) sobre el incremento de PRL inducido por el medio condicionado (MC) de ratas lactantes succionadas sobre ambas regiones de la AH del macho. La región lateral (RL) y región central (RC) fueron incubadas por 30 min. en medio de Earle con y sin CH'x o brefeldina-A (grupos control, n=5) y con MC con o sin CH'x o brefeldina en los grupos experimentales, n=5.\*  $p < 0.05$  vs grupo control.

## **Experimento 7**

### *Caracterización preliminar de los factores activos presentes en el medio condicionado de ratas lactantes*

Con el propósito de identificar los posibles factores presentes en el medio condicionado responsables de los efectos de estimulación de secreción de PRL, se llevo a cabo su fraccionamiento en una columna Superdex 200 mediante FPLC. De esta manera se colectaron 4 fracciones (Fig. 24A), las cuales fueron analizadas individualmente mediante SDS-PAGE para analizar las bandas proteínicas contenidas en cada una de dichas fracciones (Fig. 26B) y comparadas con las bandas obtenidas en medio condicionado 2x sin fraccionar. En cuanto al rendimiento entre la cantidad de proteína colocada en la columna y la recuperada en las fracciones fue de un 23.5% (promedio de todas las corridas), mientras que el rendimiento por separado de la fracción II fue del 0.34%.

A partir de la obtención de las fracciones por FPLC, así como de la obtención de geles en placa, se evidenció que en el medio condicionado sin fraccionar se distinguen varias bandas proteínicas de los siguientes pesos moleculares: 15 kDa, 23 KDa, así como dos bandas que se encuentran entre los 50-75 kDa. Al analizar las bandas proteínicas presentes en cada una de las fracciones se observa que el mayor contenido proteínico se encuentra en las fracciones II y IV (Fig. 26A y B). La fracción II contiene la mayoría de las bandas que se observan en el medio condicionado sin fraccionar. El peso molecular de estas proteínas es de 15, 23 y 50-75 kDa, aproximadamente, mientras que en la fracción IV la banda proteínica mas intensa posee un peso molecular de aproximadamente 15 kDa. Sin embargo, es posible llegar a apreciar bandas tenues que poseen un peso molecular de 23 kDa y de 50-75 kDa. La fracción I y III por su parte, contienen bandas proteínicas cuyos pesos moleculares se ubican entre los

50-75 kDa y en los 15, 23 y 50-75 kDa, respectivamente. Sin embargo, la intensidad de estas bandas proteínicas es muy ténue.

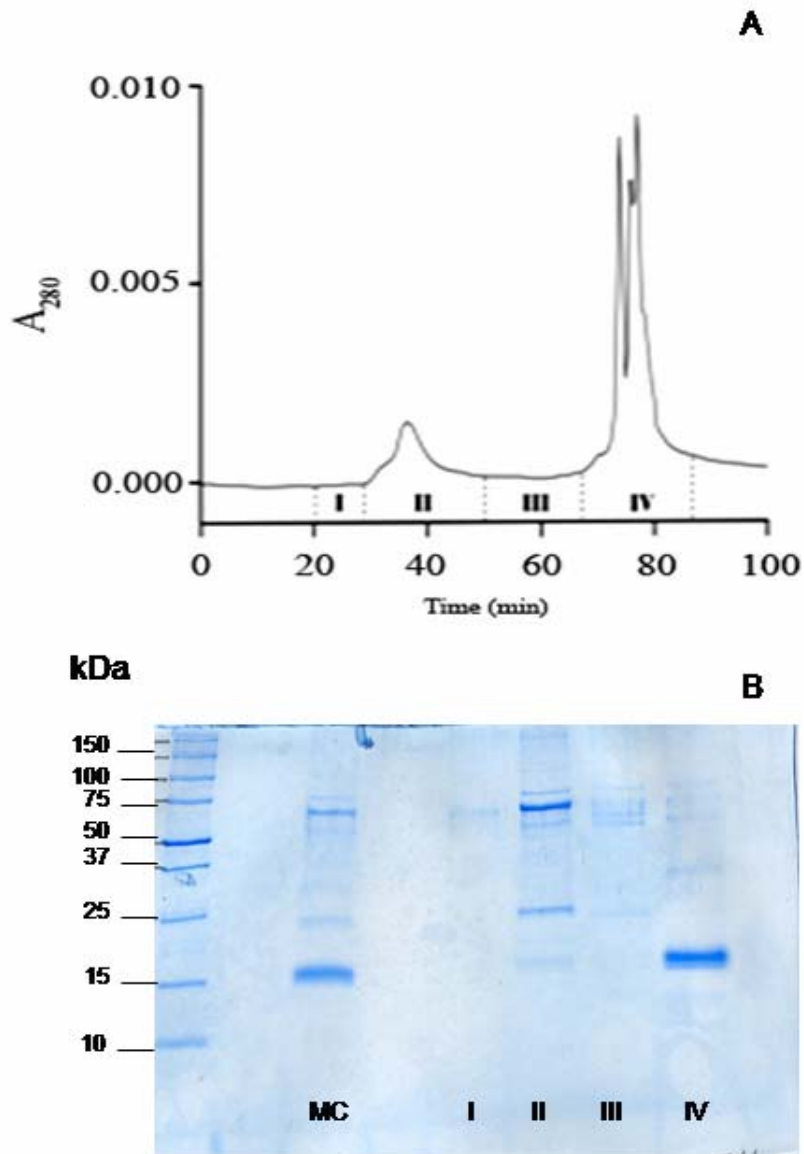


Fig. 26. A. Perfil cromatográfico del medio condicionado de ratas lactantes succionadas obtenido mediante FPLC en donde se muestran las fracciones (I-IV) obtenidas a diferentes tiempos. B. SDS-PAGE que muestra las bandas proteicas contenidas en el medio condicionado sin fraccionar (1.7  $\mu\text{g}/\text{carril}$ ) (MC) y contenidas en cada una de la fracciones obtenidas (0.5  $\mu\text{g}/\text{carril}$ ). Los geles fueron teñidos con Azul de Coomasie. Este experimento fue replicado 4 veces.

## **Experimento 8**

*Estudios acerca de la naturaleza del factor estimulador de la secreción de PRL presente en el medio condicionado de ratas lactantes succionadas*

Los efectos de estimulación de la secreción de PRL en ambas regiones de la AH del macho inducidos por el medio condicionado desaparecen cuando el medio condicionado es hervido a 95°C durante 10 minutos (Fig. 27A), lo cual sugiere que el factor responsable de dichos efectos es termolábil. Por otro lado, al separar el medio condicionado por FPLC y cuando las fracciones aisladas son reconstituidas en medio de Earle para probar sus efectos sobre la secreción de PRL por AHs de ratas macho, se observa que sólo la fracción II estimula la secreción de hormona sobre la región central de la AH del macho (Fig. 27B). Este efecto se pierde cuando la fracción II es tratada con un cocktail de proteasas (Fig. 27C). En conjunto, los resultados preliminares obtenidos hasta el momento sugieren que el factor activo presente en el medio condicionado de ratas lactantes, es posiblemente de naturaleza proteica, presente en la fracción II obtenida mediante FPLC.

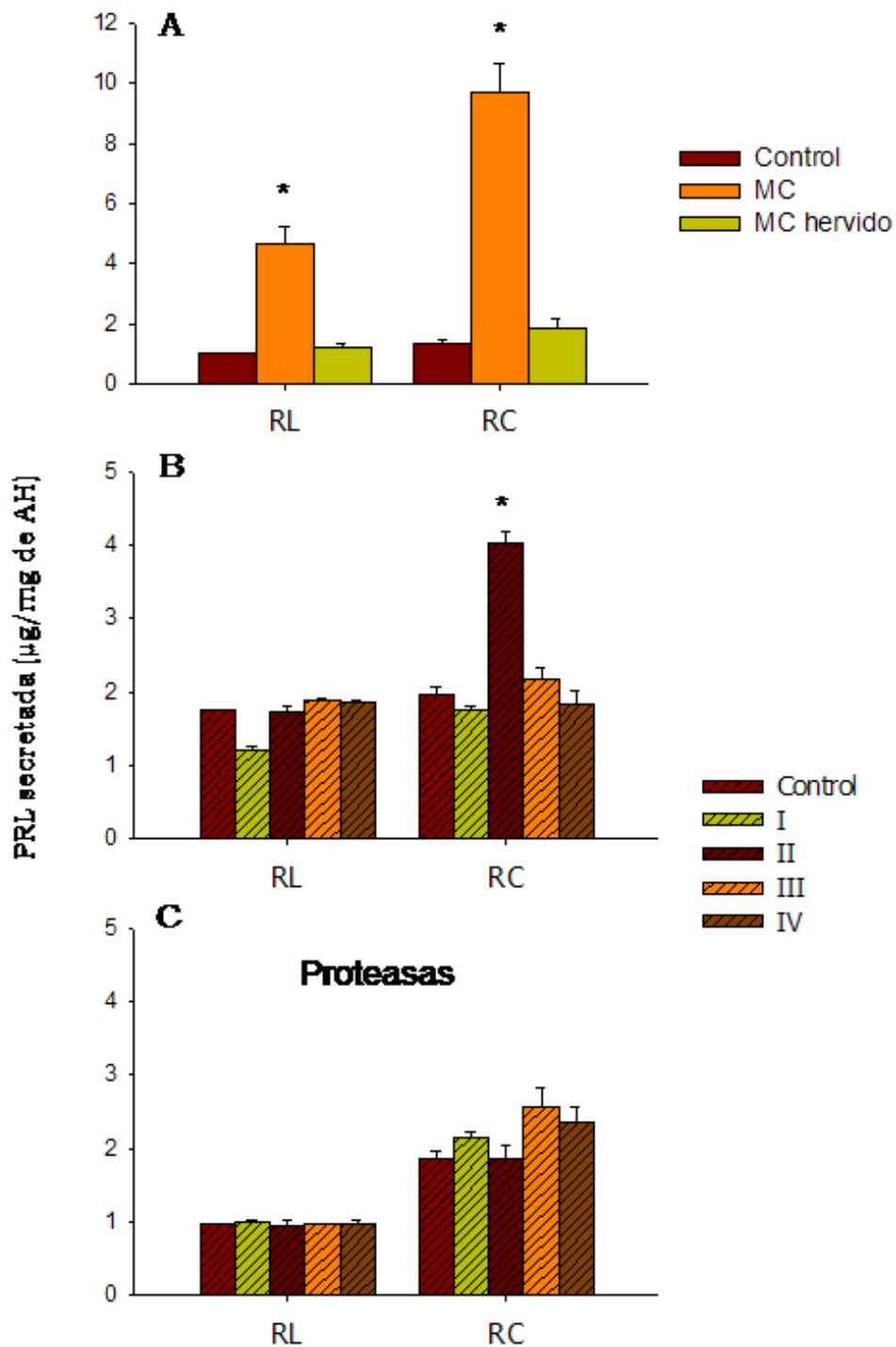


Fig. 27. A. Efecto del medio condicionado (MC) de ratas lactantes, tras haber sido hervido por 10 min., sobre la cantidad de PRL secretada por AHs de ratas macho. Actividad biológica de cada una de las fracciones obtenidas mediante FPLC tratadas (C) o no (B) con proteasas sobre AHs de ratas macho. Las incubaciones se llevaron a cabo por 30 min. \*  $p < 0.05$  vs grupo control.  $n=5$ , en cada grupo.

## **CAPITULO VIII**

### **DISCUSION**

Los mecanismos neuroendócrinos juegan un papel muy importante en el mantenimiento de la homeostasis de las funciones reproductivas, metabólicas y conductuales. La glándula hipófisis o pituitaria es la principal glándula endocrina involucrada en el control dichas funciones, lo cual logra mediante la recepción, transmisión e integración de señales centrales y periféricas que traduce en la regulación de secreción de hormonas adenohipofisarias (AH).

La síntesis y secreción de las hormonas AH se encuentra bajo el control de un gran número de factores que actúan a diferentes niveles. Un primer nivel de regulación se encuentra determinado por factores presentes en la circulación sistémica, así como por las concentraciones de hormonas secretadas por las glándulas periféricas, las cuales mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, inhiben la producción de una determinada hormona AH. Un segundo nivel de control lo determinan las influencias provenientes del hipotálamo, a través de la secreción de hormonas liberadoras e inhibidoras, las cuales llegan hasta las células AH a través del sistema porta-hipotálamo-hipofisiario. Finalmente, en un tercer nivel de regulación, los diversos factores provenientes del lóbulo posterior y/o neurointermedio, influyen ejerciendo influencias estimuladoras e inhibidoras a través de su paso por los vasos portales cortos. Asimismo, se ha demostrado que diferentes factores tanto autócrinos como parácrinos producidos localmente en la AH tienen un papel importante en la diferenciación celular y el desarrollo de los distintos tipos celulares contenidos en la AH (Baes et al., 1987; Deneff & Andries, 1983; Schwartz, 2000).

En el caso particular de la PRL, resultados previos obtenidos en nuestro laboratorio, apoyan la existencia de una regulación regional de la secreción de esta hormona (Diaz et al., 2002). Lo anterior se encuentra sustentado por evidencias experimentales que demuestran que existe una heterogeneidad morfológica y funcional en los lactotrofos contenidos en la AH. Diversos estudios anatómicos a nivel de microscopía de luz y electrónica han permitido la clasificación de lactotrofos en distintas subpoblaciones con base en el tamaño, forma y número de sus gránulos (Nogami & Yoshimura, 1982). Los lactotrofos tipo I contienen grandes gránulos pleomórficos de alrededor de 300 a 700nm de diámetro, mientras que los lactotrofos tipo II se caracterizan por poseer numerosos gránulos esféricos de menor tamaño (130-200nm). Asimismo, existen lactotrofos con gránulos mixtos (esféricos y pleomórficos de tamaño intermedio (250-300nm). Recientemente, en la rata enana ha sido caracterizado un nuevo tipo de lactotrofo cuyos gránulos son de tamaño comparables a los que se observan en los lactotrofos tipo I, pero de forma esférica, similares a los que se observan en el lactotrofo tipo II, por lo cual ha sido llamado lactotrofo tipo “intermedio” (Huerta-Ocampo et al., 2005).

Por otro lado, estudios *in vitro*, utilizando el inmunoensayo de placa, han permitido la clasificación funcional de los lactotrofos de ratas adultas en lactotrofos que liberan pequeñas cantidades de PRL por unidad de tiempo y lactotrofos de placas grandes con mayor actividad secretora (Luque et al., 1986). Se ha considerado que la heterogeneidad funcional de los lactotrofos puede ser un reflejo de la susceptibilidad de subpoblaciones celulares para cambiar su funcionalidad de acuerdo a los requerimientos fisiológicos de secreción de PRL. Así, como ha sido mostrado por Nagy y cols, lactotrofos de diferentes regiones de la AH cambian rápidamente su funcionamiento y sensibilidad a ciertos secretagogos después de un periodo de succión (Nagy & Frawley, 1990; Nagy et al., 1991).



Trabajos realizados en nuestro laboratorio muestran que puede existir una diferencia regional en la cantidad de PRL que se secreta. Sin embargo, la ocurrencia de este fenómeno depende de la condición fisiológica en que se encuentre el animal. Resultados obtenidos acerca de la secreción basal de PRL por la AH de ratas lactantes succionadas (S) y no succionadas (NS) muestran que la secreción de hormona por la AH de ratas NS es mayor en los fragmentos de tejido provenientes de la región central de la glándula que en los provenientes de la región lateral. Esta diferencia no es evidente en tejido proveniente de ratas S, donde no hay diferencia significativa en la secreción de PRL por ambas regiones (Diaz et al., 2002). Lo anterior sugiere que el estímulo de la succión, a través de algún factor secretado por el hipotálamo o por la propia glándula (de manera regional o no) ejerce un efecto estimulador diferencial sobre los lactotopos localizados exclusivamente en la región lateral de la glándula. Este fenómeno de regionalización también ha sido observado en AH de ratas macho, mientras que en ratas gestantes la cantidad de PRL secretada por ambas regiones es la misma. El significado funcional de la regionalización de la secreción de PRL, así como los mecanismos y factores de secreción involucrados en dicho fenómeno no han sido estudiados en detalle hasta la fecha. Sin embargo, a partir de estas observaciones se puede inferir que la propia hipófisis cuenta con mecanismos intrínsecos que le permiten autorregular de manera regional la secreción de hormona para satisfacer las necesidades y demandas fisiológicas particulares. A partir de esta hipótesis de trabajo, se plantearon una serie de experimentos posteriores en los cuales se probó la influencia que tendría la incubación de AH de animales en diferentes condiciones fisiológicas en medios condicionados por AH de animales también en diferentes condiciones fisiológicas y se ha observado que la acción ejercida sobre el tejido incubado (estimulación, inhibición o no efecto) depende tanto de la condición fisiológica del animal donador como del receptor. De esta manera, dependiendo del contexto fisiológico del animal, la hipófisis

secreta de manera diferencial, factores regionales que regulan la secreción regional de PRL. El hecho de que un mismo factor regulador de la secreción de PRL ejerza acciones diferentes en cada una de las regiones de la glándula en las diferentes condiciones filológicas probadas, apoya la hipótesis de que la capacidad secretora de los lactotopos localizados en las diferentes regiones de la glándula y su susceptibilidad a responder a los diferentes factores se encuentra determinada por el contexto fisiológico.

El trabajo incluido en esta tesis ha servido para comprender y profundizar acerca del fenómeno de regionalización y los mecanismos involucrados en la regulación regional de la secreción de PRL en AHs de ratas macho por acción de factores solubles presentes en medios condicionados por ratas lactantes succionadas. Asimismo, en esta tesis se incluye, un análisis preliminar acerca de la naturaleza del (los) factor (es) regional (es) contenido (s) en el medio condicionado por ratas lactantes que ejerce los efectos estimuladores sobre la secreción de PRL en AHs de ratas macho.

De esta manera, una primera serie de experimentos fue diseñada con el propósito de caracterizar los efectos de medios condicionados por la región lateral de ratas lactantes S y NS, empleados a diferentes concentraciones, sobre la secreción de PRL por AHs de ratas macho. A partir de los resultados obtenidos en esta primera fase de experimentos, los cuales mostraron que los medios condicionados ejercen un efecto estimulador muy importante sobre la secreción de PRL, consideramos importante investigar acerca de los mecanismos celulares involucrados en dicho fenómeno.

El empleo de cultivos primarios de AHs de ratas macho permitió por un lado cuantificar los posibles cambios en el porcentaje de células inmunorreactivas a PRL y GH, y por otro lado permitió estudiar la dinámica de secreción de células de la AH bajo el efecto estimulador del medio condicionado, mediante el uso del marcador fluorescente FM1-43.

Con el propósito de complementar los resultados morfológicos obtenidos a partir de las observaciones realizadas en los dos experimentos anteriores, se llevo a cabo el análisis ultraestructural mediante inmunocitoquímica para PRL usando anticuerpos secundarios acoplados a partículas de oro.

Dado, que los resultados obtenidos a partir de los experimentos anteriores sugerían un efecto del medio condicionado sobre la secreción de PRL contenida en gránulos de secreción, se realizó el análisis de las variantes moleculares de PRL mediante western blots, en gránulos aislados, esperando ver una reducción en la cantidad de PRL contenida en los gránulos posterior a la incubación de AHs de ratas macho en medio condicionado. Asimismo, como complemento, los estudios de marcaje de PRL *in vivo* e *in vitro*, fueron diseñados para conocer el origen de la hormona secretada por efecto de estimulación del medio condicionado y para determinar el efecto del medio condicionado sobre la secreción de hormona en diferentes etapas de maduración.

Finalmente, se obtuvo evidencia preliminar acerca de la identidad y naturaleza del factor(es) estimulador de la secreción de PRL contenido en dicho medio condicionado.

#### *Efectos de dosis-respuesta de medios condicionados por ratas lactantes sobre ambas regiones de la AH del macho*

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que al incubar AHs de rata macho en medio condicionado (MC) por AHs de ratas lactantes S y NS, se observa de manera consistente un incremento importante en la secreción de PRL por ambas regiones de la AH de la rata macho, independientemente de la concentración de MC empleada (0.5x, 1x y 2x; a excepción del efecto que se muestra en la Gráfica 16E). Estos efectos de estimulación ocurren en tan solo 30 min de incubación y son parcialmente

dependientes de la dosis. Es importante señalar que la cuantificación de la secreción de PRL se llevó a cabo mediante tres diferentes métodos: PAGE, bioensayo en células Nb2 y ELISA, y que a excepción de un caso en particular, los efectos fueron reproducibles independientemente de la técnica usada para cuantificar a la hormona. Por tal razón, decidimos emplear la técnica de PAGE como técnica rutinaria de medición para los experimentos posteriores, puesto que representa un método de cuantificación rápido, confiable y reproducible. Asimismo, dado que la concentración de medio condicionado 2x provocó en todos los casos un efecto claro de estimulación, independientemente de la técnica empleada para cuantificar a la PRL, dicha dosis fue la que se eligió emplear de manera rutinaria para probar los efectos del medio condicionado sobre AHs de ratas macho en los experimentos subsecuentes.

A partir de estos resultados se concluye que el factor o factores reguladores de la secreción de PRL secretados por la AH de ratas lactantes y contenidos en los medios condicionados, tienen un efecto sobre la secreción de PRL en AHs de ratas macho. Resultados obtenidos previamente en el laboratorio (Diaz et al., 2002), demuestran que estos mismos medios condicionados ejercen efectos mas diversos (estimulación, inhibición y no efecto) sobre AH de ratas lactantes. Asimismo, los efectos de estimulación sobre AHs de ratas macho, son tan potentes como los que se reportan en el caso de ratas lactantes (Ver Fig. 14, Pág. 61). Lo anterior sugiere que los lactotropos de ambas regiones de la AH de la rata macho son más susceptibles y responden de manera mas eficaz y consistente a los factores contenidos en dichos medios. Por otro lado, es importante señalar que los medios condicionados por AHs de ratas macho carecen de la presencia de dichos factores estimuladores de la secreción de PRL (Tabla 2). En resumen, los resultados obtenidos en esta primera fase de experimentos sugieren que la AH de la rata macho es susceptible de modificar sustancialmente y de manera eficaz la tasa de secreción de PRL ante factores secretados de manera regional por la AH de la rata lactante,

pero es incapaz de sintetizar dichos factores estimuladores, y que la producción y liberación de factores reguladores, así como la expresión de receptores funcionales a dichos factores varía dependiendo de la condición fisiológica del animal.

Ratas Macho		
Región AH incubada	Control <sup>a</sup>	MC
Lateral	1.04 ± 0.31	1.12 ± 0.06
Central	0.98 ± 0.16	1.05 ± 0.32

**Tabla 2.** Efecto del medio condicionado 2x por AHs de ratas macho sobre la secreción del PRL ( $\mu\text{g}/\text{mg}$  de AH) por AHs de ratas macho. <sup>a</sup> Las incubaciones control se realizaron en medio de Earle

Existe un gran número de trabajos realizados por diferentes grupos de investigación, en los cuales se han reportado efectos estimuladores sobre la secreción de PRL. Sin embargo, algunos de estos efectos solo se ha comprobado suceden en cultivos primarios de células AHs provenientes de ratas de neonatas (Denef & Andries, 1983); (Baes et al., 1987); (Andries & Denef, 1995) y se desconocen los mecanismos por los cuales dichos factores actúan estimulando la secreción de PRL. Otros grupos de estudio han empleado como estrategia, el uso de antagonistas específicos o anticuerpos para bloquear el efecto de los factores con una supuesta acción. Así se ha demostrado, que la administración de un antisuero del péptido intestinal vasoactivo provoca una disminución en la liberación basal de PRL en los lactotropos (Hagen et al., 1986). Asimismo, Frawley y cols han propuesto al  $\alpha$ -MSH como el factor responsable del incremento en la secreción de PRL inducida por estrógenos, el cual actúa de manera postraduccional induciendo el reclutamiento de células secretoras de PRL a partir de células que solo secretan GH (Ellerkmann et al., 1991; Porter et al., 1992).

## *Estudio de los mecanismos celulares de regulación regional de la secreción de PRL*

El incremento tan importante en la cantidad de PRL secretada por la AH de la rata macho, puede deberse a un incremento en la capacidad secretora de los lactotopos y/o a un aumento en la población de células secretoras de PRL.

La utilización del marcador fluorescente FM1-43 permitió indagar si el medio condicionado inducía un incremento en la dinámica de secreción en células AH en cultivo. Las propiedades que posee el marcador de 1) tornarse fluorescente de manera reversible al entrar en contacto con la membranas celulares, 2) no difundir libremente a través de la membrana lipídica y 3) ser prácticamente no fluorescente en un medio acuoso, permite el estudio de los procesos de exocitosis, endocitosis y tránsito de membranas (Brumback et al., 2004). A partir de las imágenes obtenidas y presentadas en la Fig. 20 (Pag. 89) se observa que a partir de los 5 min posteriores a la incubación de las células AHs con el medio condicionado ocurre un incremento gradual en la intensidad de fluorescencia intracelular, así como la aparición de pequeñas vesículas de secreción. De esta manera, si correlacionamos estas observaciones morfológicas con los resultados obtenidos a partir de la medición de la secreción de PRL, podemos sugerir que el factor o factores contenidos en el medio condicionado por ratas lactantes actúan incrementando la dinámica de secreción de PRL en células de la AH del macho.

En la rata, la diferenciación de corticotropos, gonadotropos, tirotropos, somatotropos y lactotropos, ocurre a los 16, 17, 17-18, 19 y 21 días de gestación, respectivamente (Chatelain et al., 1979). La diferenciación de dichos tipos celulares ocurre por etapas y se encuentra regulada por la expresión espacio-temporal de factores de transcripción, citocinas y neuropéptidos (Kioussi et al., 1999). En un inicio durante la ontogenia, los somatotropos, lactotropos y tirotropos comparten una

misma línea de diferenciación celular, en la cual la expresión secuencial de los factores de transcripción Prop-1 y Pit-1 ejercen un papel determinante (Melmed, 2003). Posteriormente en el desarrollo, los lactotropos y somatotropos se diferencian a partir de un mismo progenitor bihormonal, el mamosomatotrofo (MS). La proliferación de células monosecretoras de GH se promueve a través del factor liberador de GH, glucocorticoides suprarrenales y hormonas tiroideas, (Dean & Porter, 1999; Porter, 2005), mientras que la proliferación de células monosecretoras de PRL es regulada por el factor de crecimiento transformante tipo  $\alpha$  (TGF- $\alpha$ ) (Oomizu et al., 2000), el factor de crecimiento neural (NGF) (Patterson & Childs, 1994), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) (Felix et al., 1995), el factor de crecimiento fibroblástico (FGF) (Porter et al., 1994), la dopamina y los estrógenos (Kakeya et al., 2002).

Algunos autores han propuesto al MS como célula de transición entre el lactotrofo y somatotrofo, debido a que éste puede diferenciarse hacia uno u otro tipo celular dependiendo de las demandas fisiológicas (Kineman et al., 1991a; Kineman et al., 1991b; Nikitovitch-Winer et al., 1987). El incremento tan importante de células secretoras de PRL durante la lactancia, se piensa que proviene del reclutamiento de somatotropos hacia MS y lactotropos (Porter et al., 1990) mediante un mecanismo de “transdiferenciación”.

Con base en los antecedentes anteriores, consideramos importante analizar si el incremento tan importante en la secreción de PRL inducido por factores presentes en el medio condicionado por AHs de ratas macho, producía de manera concomitante un incremento en la población de células de PRL a expensas de una disminución en el porcentaje de células de GH posterior a la incubación con medio condicionado de ratas lactantes. Los resultados muestran de manera interesante que el efecto del medio condicionado produce un incremento en el porcentaje de células de PRL pero no de GH, lo cual demuestra que existe cierta especificidad del factor(es) para actuar exclusivamente sobre lactotropos. El hecho de que

no haya cambiado el porcentaje de células inmunorreactivas a GH nos sugiere que es poco probable que los efectos tan importantes de estimulación reportados se deban a la transdiferenciación de somatotropos a MS o de MS a lactotopos, ya que lo anterior se reflejaría en una disminución concomitante en el porcentaje de células inmunorreactivas a GH. El análisis morfológico de estas células bajo el microscopio confocal, es congruente con el obtenido usando el marcador fluorescente FM1-43 y muestra que, por efecto del medio condicionado, la PRL inmunorreactiva se distribuye de manera mas difusa y dispersa en el citoplasma lo cual podría corresponder con la movilización de gránulos o vesículas de secreción.

#### *Origen de la hormona secretada*

El incremento en la secreción de PRL por la AH de la rata macho bajo influencia del medio condicionado puede tener su origen en un aumento en 1) la traducción del mensajero de PRL, 2) la movilización de vesículas de secreción del RER y Golgi y/o 1) en la liberación de gránulos de PRL ya existentes, almacenados en el citoplasma de la célula. Con objeto de determinar en que paso de la vía intracelular actúan los factores presentes en el MC ejerciendo sus efectos de estimulación, fueron diseñados los experimentos de marcaje de la hormona y uso de fármacos capaces de bloquear puntos específicos de la biosíntesis y secreción de hormonas.

En células productoras de PRL se ha observado que después de marcar con isótopos radiactivos a la hormona recién sintetizada, ésta es liberada preferencialmente en vez ser almacenada. Se ha sugerido que la heterogeneidad funcional de células de PRL puede explicar al menos en parte este fenómeno, debido a que es una subpoblación muy activa de lactotopos la que sintetiza, concentra y secreta PRL a una tasa muy



rápida y es la responsable de esta liberación preferencial (Walker & Farquhar, 1980). Sin embargo, en el animal lactante se han obtenido resultados diferentes, indicando que la secreción preferencial no es de la hormona recién sintetizada sino de la PRL madura, vgr., de 4 a 8 horas después de haber sido sintetizada (Mena et al., 1984).

Experimentos realizados *in vitro* previamente en el laboratorio usando cicloheximida (50 µg/ml) mostraron ser capaces de detener la secreción de PRL hacia el medio de incubación, en condiciones basales o con factores estimuladores como el TRH (Mena et al., 1989a). Por tal motivo, consideramos importante, probar el efecto de fármacos como la cicloheximida y brefeldina-A con el objeto de evaluar el papel del medio condicionado sobre la síntesis y secreción de *novo* de PRL así como sobre el tránsito de vesículas de secreción, respectivamente. Los resultados muestran que los efectos de estimulación del medio condicionado persisten aún y cuando las AHs del macho son incubadas en medio condicionado suplementado con cualquiera de los dos fármacos empleados, con lo cual se sugiere que el efecto del medio condicionado se ejerce sobre la liberación de hormona sintetizada previa a la incubación en el medio condicionado, almacenada en gránulos de secreción.

Los resultados de marcaje *in vivo* e *in vitro* de la PRL corroboran que el medio condicionado no ejerce efectos sobre la síntesis y secreción acoplada de hormona recién sintetizada, debido a que el patrón de secreción de hormona marcada *in vitro* 30 min y 60 min posteriores a la incubación en medio condicionado es el mismo que el observado en el grupo control. Por otro lado, a partir de los experimentos de marcaje *in vivo* de la PRL se exploró la posibilidad de que el medio condicionado ejerciera un efecto preferencial sobre la liberación de hormona sintetizada 1, 6 ó 24 horas previas a la incubación en medio condicionado. Sin embargo, los resultados muestran que la cantidad de PRL marcada posee un mismo patrón de secreción en los tres grupos. Los resultados anteriores en conjunto sugieren que el incremento en la secreción de PRL

inducido por el factor(es) contenidos en los medios condicionados actúan incrementando la liberación de PRL a partir de gránulos sintetizados mas de 24 horas previas a la incubación en medio condicionado.

El mecanismo por el cual el medio condicionado se encuentra favoreciendo la secreción de hormona madura contenida en gránulos de secreción aun no se conoce. Sin embargo, es probable que la existencia de una heterogeneidad funcional y morfológica de los lactotrofos contenidos en la AH de la rata explique en parte los efectos observados en estos experimentos, y sugiere que algunas subpoblaciones de lactotrofos son más susceptibles de ser activados que otras.

#### *Análisis de gránulos de PRL*

Se han identificado tres diferentes vías intracelulares para la exportación de los productos de secreción. La llamada “regulada”, involucra la fusión de gránulos inmaduros de secreción y la concentración de la hormona en gránulos maduros de secreción, cuya descarga se encuentra regulada por secretragogos específicos (Mena et al., 1989b). Mientras que a través de una vía de secreción llamada “constitutiva” ocurre la liberación continua de pequeñas vesículas de secreción (Larson & Wise, 1994; Pellegrini et al., 1990). Alternativamente, de un gránulo inmaduro de secreción pueden desprenderse pequeños gránulos que pueden ser secretados a través de una vía “tipo constitutiva” (Proctor, 1998).

En la rata macho en condiciones control se ha sido descrito un tipo de lactotrofo denominado “atípico”, el cual se encuentra de manera relativamente abundante en estos animales. A partir de estudios morfológicos, dicho tipo de lactotrofo ha sido descrito posee una apariencia quiescente (De Paul et al., 1997) compatible con una actividad secretora reducida. De esta manera, es posible que los efectos de estimulación en la secreción de PRL y el concomitante incremento en el

numero de celulas de PRL inmunorreactivas provenga de este tipo celular. De esta manera el medio condicionado actuaria incrementando la tasa de secreción en células de PRL con una tasa de actividad secretora baja.

El análisis a nivel ultraestructural de las AHs incubadas en condiciones control así como de los tejidos incubados bajo el efecto estimulador del medio condicionado se realizó con el objeto de investigar si existían cambios en la morfología y/o distribución de gránulos de PRL, mediante su identificación inmunocitoquímica utilizando partículas de oro. Las imágenes obtenidas hasta el momento, sugieren que la distribución de inmunorreactividad a PRL es diferente en el grupo de AHs incubadas en medio condicionado con relación al grupo control, en los cuales la hormona se encuentra concentrada principalmente en gránulos de secreción. Por el contrario, cuando las AHs de ratas macho son incubadas con el medio condicionado se observa que la hormona se encuentra asociada al RER y contenida en pequeñas vesículas de secreción, las cuales parecerían protruir de los granulos maduros de secreción. Sin embargo, los resultados son aun preliminares y se requiere de un nivel de análisis mas complejo.

La localización intracitoplásmica de las diferentes variantes moleculares de PRL y su significado funcional se desconoce. A la fecha ha sido descrito que la solubilidad de la PRL varía dependiendo del método de extracción. Esta peculiaridad se encuentra relacionada con la existencia de dos diferentes fracciones de PRL localizadas en el citoplasma de la célula. Una de ellas es una forma soluble que es recuperable cuando el tejido es homogeneizado, mientras que la otra forma se encuentra almacenada en gránulos de secreción y es necesario un proceso de despolimerización para obtener las formas monoméricas. Aoki y cols, han demostrado que los dos diferentes pools de PRL son susceptibles de modificar su tasa de síntesis, almacenamiento y liberación con el propósito de adaptarse a las demandas en la secreción de PRL ante la presencia de un factor estimulador (Torres & Aoki, 1987). Con base en estos antecedentes, puede existir la posibilidad

de que el medio condicionado actúe por un lado, incrementando la secreción de PRL que está siendo sintetizada en ese momento, evitando su concentración en gránulos de secreción y por otro lado podría estar actuando sobre la liberación de hormona monomérica proveniente de gránulos maduros que contiene a la hormona polimerizada.

Por otro lado, el análisis de las variantes moleculares contenidas en gránulos aislados de AHs de rata macho muestra que bajo condiciones reductoras, ocurre una disminución en las bandas proteínicas que poseen un peso molecular de 23-25 kDa, tras la incubación de AHs de ratas macho en medio condicionado, lo cual sugiere que debe ocurrir un mecanismo alternativo de secreción de PRL a partir de gránulos maduros de secreción.

#### *Caracterización y naturaleza química de los factores activos presentes en el medio condicionado*

Al tratar de indagar sobre la naturaleza bioquímica del factor(es) que podrían estar involucrados en los efectos observados y compararlos con los factores hipofisarios hasta ahora descritos en la literatura con acciones autócrinas y parácrinas sobre la secreción de PRL, tales como: el TRH, el Péptido intestinal vasoactivo (VIP), la Angiotensina II, la neurotensina, la sustancia P, el  $\alpha$ -MSH, la galanina, la serotonina (Denef, 1990), el factor de crecimiento tumoral  $\beta$ 1, TGF- $\alpha$  (Oomizu et al., 2000), el NGF (Patterson & Childs, 1994), el EGF (Felix et al., 1995), el FGF (Porter et al., 1994), y los estrógenos (Kakeya et al., 2002) entre otros, encontramos que la gran mayoría de los anteriores poseen un peso molecular por debajo de los 10 kDa y dado que el filtro utilizado para la concentración de medio condicionado tiene como límite los 10 kDa, la participación de alguno de estos factores en los efectos reportados en este trabajo es poco probable. Sin embargo, esto no implica que bajo ciertas condiciones fisiológicas pueda ocurrir la interacción del factor activo presente en el medio

condicionado con estos o algún otro factor de regulación. Es importante mencionar que la acción de varios de los factores mencionados dependen de la presencia de hormonas tales como glucocorticoides, estrógenos y hormonas tiroideas, por lo cual existe la posibilidad de que el factor(es) forme complejos proteínicos de alto peso molecular con acciones estimuladoras sobre la secreción de PRL.

El fraccionamiento del medio condicionado mediante FPLC y el análisis de bandas proteínicas contenidas en cada una de las 4 fracciones obtenidas, representa un primer paso hacia la caracterización bioquímica del factor(es) estimulador de la secreción de PRL. En experimentos posteriores, se probó la actividad biológica de cada una de las fracciones sobre la secreción de PRL por AHs de ratas macho y se observó que solo la fracción II conserva la capacidad de estimular la secreción de hormona. Por tal motivo, es de particular interés el subsiguiente análisis bioquímico y funcional por separado de cada una de las bandas proteicas contenidas en la fracción II, cuyos pesos moleculares van de 13 a 50 kDa. Estos resultados, en conjunto con los obtenidos al anular el efecto del medio condicionado mediante el tratamiento con agentes proteolíticos o inactivación de proteínas termosensibles mediante la ebullición, sugieren que el factor(es) activo presente en el medio condicionado de ratas lactantes posee un peso molecular mayor a los 10kDa y que se encuentra presente en la fracción II obtenida mediante FPLC y que es posiblemente de naturaleza proteínica.

## CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos concluir que:

- El medio condicionado por la región lateral de AHs de ratas lactantes succionadas, ejerce efectos estimulatorios importantes sobre la secreción de PRL por AHs de ratas macho. Tales efectos, son parcialmente dosis-dependientes.
- El medio condicionado provoca un incremento en el número de células inmunorreactivas a PRL, mientras que el número de células inmunorreactivas a GH se mantiene sin cambios.
- La distribución intracelular de PRL inmunorreactiva cambia posterior a la incubación con medio condicionado, mientras que la distribución intracelular de GH inmunorreactiva se mantiene sin cambios.
- El efecto estimulatorio del medio condicionado se correlacionó con un incremento en la actividad secretora de células en la AHs de la rata macho.
- El análisis ultraestructural revela que posterior a la incubación de AHs de ratas macho en medio condicionado, la PRL se localiza en microvesículas y asociada al RER, además de encontrarse almacenada en gránulos de secreción.
- El análisis de las variantes moleculares contenidas en gránulos aislados por gradientes de densidad muestra que bajo condiciones

reductoras, existe una disminución en las bandas proteínicas localizadas entre los 23-25 kDa así como en bandas de mas alto peso molecular, 40-54 kDa.

- El medio condicionado no parece favorecer la secreción de PRL recién sintetizada o de hormona madura. La secreción de hormona de ambas edades sigue un mismo patrón de secreción.
- El efecto estimulador del medio condicionado sobre la secreción de PRL por AHs de ratas macho persiste posterior al tratamiento con cicloheximida y la brefeldina-A, sugiriendo que la secreción de hormona proviene de gárrulos previamente almacenados.
- Mediante la separación de los componentes del medio condicionado mediante FPLC se obtienen 4 fracciones, de las cuales la fracción II es la única que mantiene su actividad biológica al ser probada para incubar AHs de ratas macho.

## APENDICE I

<b>Indice de Figuras y Tablas</b>	<b>Página</b>
Fig. 1. Arbol filogenético de la familia GH/PRL	2
Fig. 2. Influencia hormonal en el desarrollo mamario a lo largo del ciclo reproductor	8
Fig. 3. Estructura primaria de la PRL	13
Fig. 4. Variantes moleculares de la PRL	18
Fig. 5. Eventos intracelulares involucrados en la síntesis y procesamiento de la PRL	19
Fig. 6. Isoformas del receptor de PRL y vías de señalización	23
Fig. 7. Procesamiento intracelular de la PRL en ratas hembras tratadas con 17- $\beta$ estradiol	28
Fig. 8. Transición de los diferentes tipos de gránulos de secreción en células secretoras de PRL	29
Fig. 9. Vías intracelulares que existen para la exportación de los productos de secreción	33



Fig. 10. Principales factores sistémicos, hipotalámicos e hipofisarios que participan en la regulación de la secreción de PRL	41
Fig. 11. Interacciones autócrinas y parácrinas en la AH	44
Fig. 12. Anatomía de la glándula hipófisis	48
Fig. 13. Regionalización de la secreción de PRL	59
Fig. 14. Esquema que resume los efectos obtenidos de incubar AHs de ratas lactantes en medios condicionados por AHs de ratas lactantes	62
Fig. 15. Separación quirúrgica de la AH	68
Fig. 16. Efecto de incubar AHs de ratas macho en medio condicionado de ratas lactantes sobre la cantidad de PRL secretada analizada mediante PAGE , Bioensayo y ELISA	87
Fig. 17. Efecto del medio condicionado sobre la proporción de células inmunorreactivas a PRL y GH	89
Fig. 18. Efecto del medio condicionado	

sobre la distribución inmunocitoquímica de PRL	91
Fig. 19. Efecto del medio condicionado sobre la distribución inmunocitoquímica de GH	92
Fig. 20. Efecto del medio condicionado sobre el patrón y distribución del marcador fluorescente FM1-43	94
Fig. 21. Electrofotomicrografías de células secretoras de PRL, identificadas mediante inmunocitoquímica usando partículas de oro en AH de ratas macho	97
Fig. 22. Western Blot que muestra las variantes moleculares de PRL contenida en gránulos aislados	98
Fig. 23. Secreción de PRL previamente almacenada y sintetizada 1 hr , 6hrs ó 24hrs previas a la incubación	100
Fig. 24. Secreción de PRL previamente almacenada y sintetizada <i>in vitro</i>	101
Fig. 25. Efecto de la cicloheximida y brefeldina-A sobre el incremento de PRL inducido por el medio condicionado por ratas lactantes	103
Fig. 26. A. Perfil cromatográfico del medio	

condicionado por ratas lactantes obtenido mediante FPLC. B. SDS-PAGE de cada una de la fracciones obtenidas	106
---	-----

Fig. 27. A. Efecto del medio condicionado, tras haber sido hervido por 10 min B y C. Actividad biológica de cada una de las fracciones obtenidas mediante FPLC	108
--	-----

## Índice de Tablas

Tabla 1. Resumen de los efectos obtenidos al incubar AHs de ratas lactantes no succionadas y succionadas en medios condicionados por animales en las mismas condiciones fisiológicas	63
--	----

Tabla 2. Efecto del medio condicionado por AHs de ratas macho sobre la secreción del PRL por AHs de ratas macho	115
---	-----

## APENDICE II

### Publicaciones

1. Nestor Díaz, **Icnelia Huerta**, Nephtali Marina y Flavio Mena (2002). Regional mechanisms within the anterior pituitary of lactating rats may regulate prolactin secretion. *Endocrine*; 18 (1): 41-46.
2. **Huerta-Ocampo I**, Christian HC, Thompson NM, El-Kasti MM y Wells T (2005). The 'intermediate' lactotroph: a morphologically distinct, ghrelin-responsive lactotroph in the dwarf (*dw/dw*) rat pituitary. *Endocrinology*; 146 (11): 5012-23.
3. **Huerta-Ocampo I**, Mena F, Barrios F, Martínez G, González L y Larriva-Sahd J (2005). Perinatal exposure to androgen suppresses sexual dimorphism in nerve trunk diameter, axon number, and fiber size spectrum: A quantitative ultrastructural study of the adult rat mammary nerve. *Brain Research*; 1060 (1-2): 179-83.

## REFERENCIAS

- Adler RA, Herzberg VL, Brinck-Johnsen T, Sokol HW (1986) Increased water excretion in hyperprolactinemic rats. *Endocrinology* 118:1519-1524.
- Allaerts W, Deneff C (1991) Selectivity of juxtaposition between cup-shaped lactotrophs and gonadotrophs from rat anterior pituitary in culture. *Cell & Tissue Research* 263:217-225.
- Anderson RR (1974) Development and structure of the mammary gland: Endocrinological control. In: *Lactation: A comprehensive treatise* (Larson BL, Smith VR, eds), pp 97-142. London: Academic Press.
- Andries M, Deneff C (1995) Gonadotropin-releasing hormone influences the release of prolactin and growth hormone from intact rat pituitary in vitro during a limited period in neonatal life. *Peptides* 16:527-532.
- Andries M, Tilemans D, Deneff C (1992) Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochemical Journal* 281:393-400.
- Baes M, Allaerts W, Deneff C (1987) Evidence for functional communication between folliculo-stellate cells and hormone-secreting cells in perfused anterior pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 120:685-691.
- Baldocchi RA, Tan L, King DS, Nicoll CS (1993) Mass spectrometric analysis of the fragments produced by cleavage and reduction of rat prolactin: evidence that the cleaving enzyme is cathepsin D. *Endocrinology* 133:935-938.
- Ball JN, M. ED (1965) Effect of prolactin on plasma sodium in the teleost, *poecilia latipinna*. *Journal of Endocrinology* 32:269-270.
- Batten TF, Ingleton PM (1987) The structure and function of the hypothalamus and pituitary gland. In: *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology* (Chester-Jones I, Ingleton PM, Philips JG, eds), pp 285-409. New York: Plenum Press.
- Ben-Jonathan N (1985) Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Reviews* 6:564-589.
- Ben-Jonathan N, Peters LL (1982) Posterior pituitary lobectomy: differential elevation of plasma prolactin and luteinizing hormone in estrous and lactating rats. *Endocrinology* 110:1861-1865.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW (1996) Extrapituitary prolactin: Distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews* 17:639-669.
- Bentzien F, Struman I, Martini JF, Martial J, Weiner R (2001) Expression of the antiangiogenic factor 16K hPRL in human HCT116 colon

- cancer cells inhibits tumor growth in Rag1(-/-) mice. *Cancer Research* 61:7356-7362.
- Berlanga JJ, Fresno Vara JA, Martin-Perez J, García-Ruiz JP (1995) Prolactin receptor associated with c-src kinase in rat liver. *Molecular Endocrinology*:1461-1467.
- Bern HA, Nicoll CS (1968) The comparative endocrinology of prolactin. *Recent Progress in Hormone Research* 24:681-720.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews* 19:225-268.
- Boockfor FR, Frawley LS (1987) Functional variations among prolactin cells from different pituitary regions. *Endocrinology* 120:874-879.
- Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE (1997) Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: Seroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology* 138:756-763.
- Brumbach AC, Lieber JL, Angleson JK, Betz WJ (2004) Using FM1-43 to study neuropeptide granule dynamics and exocytosis. *Methods* 33:287-294.
- Burgess TL, Kelly RB (1987) Constitutive and regulated secretion of proteins. *Annual Review of Cell Biology* 3:243-293.
- Cabrera V, Chape A, Rodriguez JC, Machado AJ, Larrea F (1998) Differential effects of glycosylated and non-glycosylated porcine prolactin on estradiol and progesterone secretion by rat granulosa cells in culture. *Archives of Medical Research* 29:13-19.
- Carey RM, Johanson AJ, Seif SM (1977) The effects of ovine prolactin on water and electrolyte excretion in man are attributable to vasopressin contamination. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 44:850-858.
- Carty SE, Johnson RG, Scarpa A (1982) Electrochemical proton gradient in dense granules isolated from anterior pituitary. *Journal of Biological Chemistry* 257:7269-7273.
- Chabot JC, Walker P, Pelletier G (1986) Distribution of epidermal growth factor binding sites in the adult rat anterior pituitary gland. *Peptides* 7:45-50.
- Champier J, Claustrat B, Sassolas G, Berger M (1987) Detection and enzymatic deglycosylation of a glycosylated variant of prolactin in human plasma. *FEBS Letters* 212:220-224.
- Chatelain A, Dupouy JP, Dubois MP (1979) Ontogenesis of cells producing polypeptide hormones (ACTH, MSH, LPH, GH, prolactin) in the fetal hypophysis of the rat: influence of the hypothalamus. *Cell and Tissue Research* 196:409-427.

- Childs GV (2002) Development of gonadotropes may involve cyclic transdifferentiation of growth hormone cells. *Archives Physiological Biochemistry* 110:42-49.
- Childs GV, Unabia G (1997) Cytochemical studies of the effects of activin on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) binding by pituitary gonadotropes and growth hormone cells. *Journal Histochemistry Cytochemistry* 45:1603-1610.
- Clapp C, Martial JA, Guzman RC, Rentier-Delure F, Weiner RI (1993) The 16-kilodalton N-terminal fragment of human prolactin is a potent inhibitor of angiogenesis. *Endocrinology* 133:1292-1299.
- Clapp C, Sears PS, Russell DH, Richards J, Levay-Young BK, Nicoll CS (1988) Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin. *Endocrinology* 122:2892-2898.
- Clevenger CV, Plank TL (1997) Prolactin as an autocrine/paracrine factor in breast tissue. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 2:59-68.
- Clevenger CV, Furth PA, Hankinson SE, Schuler LA (2003) The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocrine Reviews* 24:1-27.
- Colbran RJ, Soderling TR (1990) Calcium/calmodulin-independent autophosphorylation sites of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: studies on the effect of phosphorylation or threonine 305/306 and serine 314 on calmodulin binding using synthetic peptides. *Journal of Biological Chemistry* 265:11213-11219.
- Cooke NE, Coit D, Weiner RI, Baxter JD, Martial JA (1980) Structure of cloned DNA complementary to rat prolactin messenger RNA. *Journal of Biological Chemistry* 255:6502-6510.
- Corbacho AM, Martinez de la Escalera G, Clapp C (2002) Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology* 173:219-238.
- Corbacho AM, Nava G, Eiserich JP, Noris G, Macotela Y, Struman I, Martinez De La Escalera G, Freeman BA, Clapp C (2000) Proteolytic cleavage confers nitric oxide synthase inducing activity upon prolactin. *Journal of Biological Chemistry* 275:13183-13186.
- Cowie AT, Tindal JS (1971) Physiology of the mammary gland. In: *The physiology of lactation*. Monographs of the physiological society (Cowie AT, Tindal JS, eds), pp 3-34. London: Arnold Press.
- Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC (1980) Growth and development of the mammary gland. In: *Hormonal control of lactation* (Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC, eds), pp 58-74. Berlin: Springer-Verlag.
- Cronin MJ, Evans WS (1983) Dopamine receptors in the normal and abnormal anterior pituitary gland. *Clinical Endocrinology Metabolism* 12:15-30.

- Daniel JC, Jr., Jetton AE, Chilton BS (1984) Prolactin as a factor in the uterine response to progesterone in rabbits. *Journal of Reproduction & Fertility* 72:443-452.
- Davis SL (1998) Environmental modulation of the immune system via the endocrine system. *Domestic Animal Endocrinology* 15:283-289.
- De Paul AL, Pons O, Aoki A, Torres AI (1997) Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochemistry*.
- De Vito WJ, Stone S, Shamgochian M (1995) Prolactin induced expression of glial fibrillary acidic protein and tumor necrosis factor-alpha at wound site in the rat brain. *Molecular and Cellular Endocrinology* 108:125-130.
- De Vito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C (1992) Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology* 130:2549-2556.
- de Vos AM, Ultsch M, Kossiakoff AA (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex. *Science* 255:306-312.
- Dean CE, Porter TE (1999) Regulation of somatotroph differentiation and growth hormone (GH) secretion by corticosterone and GH-releasing hormone during embryonic development. *Endocrinology* 140:1104-1110.
- Denef C (1990) Autocrine/paracrine intermediates in hormonal actions and modulation of cellular responses to hormones. In: *Handbook of Physiology, Section 7: The endocrine system* (Conn MC, ed), pp 461-514. New York: Oxford University Press.
- Denef C, Andries M (1983) Evidence for paracrine interaction between gonadotrophs and lactotrophs in pituitary cell aggregates. *Endocrinology* 112:813-822.
- Diaz N, Huerta I, Marina N, Navarro N, Mena F (2002) Regional mechanisms within anterior pituitary of lactating rats may regulate prolactin secretion. *Endocrine Journal* 18:41-46.
- Dombrowicz D, Sente B, Closset J, Hennen G (1992) Dose-dependent effects of human prolactin on the immature hypophysectomized rat testis. *Endocrinology* 130:695-700.
- Dorflinger LJ, Schonbrunn A (1983) Somatostatin inhibits basal and vasoactive intestinal peptide-stimulated hormone release by different mechanisms in GH pituitary cells. *Endocrinology* 113:1551-1558.
- Drouhault R, Guerinéau NC, Mollard P, Cadoret MA, Corcuff JB, Vacher AM, Vilayleck N (1994) Prolactin and growth hormone release and calcium influx are stimulated by galanin within a 'window' range of concentrations in pituitary GH3 B6 cells. *Neuroendocrinology* 60:179-184.
- Drouin J, Lagace L, Labrie F (1976) Estradiol-induced increase of the LH responsive to LH releasing hormone (LHRH) in rat anterior pituitary cells in culture. *Endocrinology* 99:1477-1481.



- Duenas Z, Torner L, Corbacho AM, Ochoa A, Gutierrez-Ospina G, López-Barrera F, Barrios FA, Berger P, Martínez de la Escalera G, Clapp C (1999) Inhibition of rat corneal angiogenesis by 16-kDa prolactin and endogenous prolactin-like molecules. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 40:2498-2505.
- Ellerkmann E, Nagy GM, Frawley LS (1991) Rapid augmentation of prolactin cell number and secretory capacity by an estrogen-induced factor released from the neurointermediate lobe. *Endocrinology* 129:838-842.
- Ellerkmann E, Nagy GM, Frawley LS (1992a) Alpha-melanocyte-stimulating hormone is a mammatrophic factor released by neurointermediate lobe cells after estrogen treatment. *Endocrinology* 130:133-138.
- Ellerkmann E, Porter TE, Nagy GM, Frawley LS (1992b) N-acetylation is required for the lactotrope recruitment activity of alpha-melanocyte-stimulating hormone and beta-endorphin. *Endocrinology* 131:566-570.
- Emanuele NV, Jurgens JK, Halloran MM, Tentler JJ, Lawrence AM, Kelley MR (1992) The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Molecular Endocrinology* 6:35-42.
- Enjalbert A, Arancibia S, Priam M, Bluet-Pajot MT, Kordon C (1982) Neurotensin stimulation of prolactin secretion in vitro. *Neuroendocrinology* 34:95-98.
- Epanand RM, Stafford AR, Orlowski RC (1989) Calcitonin inhibits the rise of intracellular calcium induced by thyrotropin-releasing hormone in GH3 cells. *Cell Calcium* 10:145-149.
- Everett JW (1954) Luteotropic function of autografts of the rat hypophysis. *Endocrinology* 54:685-690.
- Everett JW (1956) Functional corpora lutea maintained for months by autografts of rat hypophysis. *Endocrinology* 58:786-796.
- Fan X, Childs GV (1995) Epidermal growth factor and transforming growth factor- $\alpha$  messenger ribonucleic acid and their receptors in the rat anterior pituitary: localization and regulation. *Endocrinology* 136:2284-2293.
- Farquhar M, Reid J, Daniell L (1978) Intracellular transport and packaging of prolactin: a quantitative electron microscopic autoradiographic study of mammatrophs dissociated from rat pituitaries. *Endocrinology* 102:269-311.
- Felix R, Meza U, Cota G (1995) Induction of classical lactotropes by epidermal growth factor in rat pituitary cell cultures. *Endocrinology* 136:939-946.
- Ferrara N, Clapp C, Weiner R (1991) The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal or fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129:896-900.

- Ferrari M, Fornasiero MC, Isetta AM (1990) MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity in vitro. *Journal of Immunological Methods* 131:165-172.
- Fiordeliso T, Hernández-Cruz A (2002) Oestrogen regulates neurofilament expression in a subset of anterior pituitary cells of the adult female rat. *J Neuroendocrinol* 14:411-424.
- Foord SM, Peters J, Scanlon MF, Rees Smith B, Hall R (1980) Dopaminergic control of TSH secretion in isolated rat pituitary cells. *FEBS Letters* 121:257-259.
- Frawley LS, Hoeffler JP, Boockfor FR (1985) Identification by plaque assays of a pituitary cell type that secretes both growth hormone and prolactin. *Endocrinology* 116:734-737.
- Freeman ME, Banks JA (1980) Hypothalamic sites which control the surges of prolactin secretion induced by cervical stimulation. *Endocrinology* 106:668-673.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin: Structure, function and regulation of secretion. *Physiological Reviews* 80:1523-1631.
- Freemark M, Nagano M, Edery M, Kelly PA (1995) Prolactin receptor gene expression in the fetal rat. *Journal of Endocrinology* 144:285-292.
- Freemark M, Driscoll P, Andrews J, Kelley PA, Royster M (1996) Ontogenesis of prolactin receptor gene expression in the rat olfactory system: potential roles of lactogenic hormones in olfactory development. *Endocrinology* 137:934-942.
- Fuxe K (1965) The distribution of monoamine terminals in central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica* 247 (suppl):39-85.
- Fuxe K, Hokfelt T, Eneroth P, Gustafsson J-A, Skett P (1977) Prolactin-like immunoreactivity: localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* 196:899-900.
- Galfione M, Luo W, Kim J, Hawke D, Kobayashi R, Clapp C, Yu-Lee LY, Lin SH (2003) Expression and purification of the angiogenesis inhibitor 16-kDa prolactin fragment from insect cells. *Protein Expression and Purification* 28:252-258.
- Goffin V, Kelley PA (1996) Prolactin and growth hormone receptors. *Clinical Endocrinology* 45:247-255.
- Goffin V, Martial JA, Summers NL (1995) Use of a model to understand prolactin and growth hormone specificities. *Protein Engineer* 8:1215-1231.
- Goffin V, Binart N, Touraine P, Kelley PA (2002) Prolactin: The new biology of an old hormone. *Annual Reviews of Physiology* 64:47-67.
- Goldsmith PC, Cronin MJ, Weiner RI (1979) Dopamine receptor sites in the anterior pituitary. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 27:1205-1207.
- Gonzalez JG, Elizondo G, Saldivar D, Nanez H, Todd LE, Villarreal JZ (1988) Pituitary gland growth during normal pregnancy: an in vivo

- study using magnetic resonance imaging. *American Journal of Medicine*:217-220.
- Gonzalez-Mariscal G (2001) Neuroendocrinology of maternal behavior in the rabbit. *Hormones and behavior* 40:125-132.
- Gonzalez-Mariscal G, Melo AI, Jimenez P, Beyer C, Rosenblatt JS (1996) Estradiol, progesterone and prolactin regulate maternal nest-building in rabbits. *Journal of Neuroendocrinology* 8:901-907.
- Gonzalez-Mariscal G, Melo AI, Parlow AF, Beyer C, Rosenblatt JS (2000) Pharmacological evidence that prolactin acts from late gestation to promote maternal behaviour in rabbits. *Journal of Neuroendocrinology* 12:983-992.
- Grattan DR, Pi X, J., Andrews ZB, Augustine RA, Kokay IC, Summerfield MR, Todd B, Bunn SJ (2001) Prolactin receptors in the brain during pregnancy and lactation: Implications for behavior. *Hormones and Behavior* 40:115-124.
- Greenan JR, Balden E, Ho TW, Walker AM (1989) Biosynthesis of the secreted 24 K isoforms of prolactin. *Endocrinology* 125:2041-2048.
- Grosvenor CE, Turner CW (1958) Pituitary lactogenic in lactating rats. *Endocrinology* 63:535-539.
- Grosvenor CE, Mena F (1971) Effect of suckling upon the secretion and release of prolactin from the pituitary gland of the lactating rat. *Journal of Animal Science* 32:115-136.
- Grosvenor CE, Mena F (1974) Neural and hormonal control of milk secretion and milk ejection. In: *Lactation: A comprehensive treatise* (Larson BL, Smith VR, eds), pp 227-267. London: Academic Press.
- Grosvenor CE, Mena F (1980) Evidence that tyrotropin-releasing hormone and a hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 107:863-868.
- Grosvenor CE, Mena F (1982) Regulating mechanisms for oxytocin and prolactin secretion during lactation. In: *Neuroendocrine Perspectives* (Muller EE, McCleod RM, eds), pp 69-92. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press.
- Grosvenor CE, Mena F, Whitworth NS (1977) Sensory stimuli from pups involved in inhibition of milk secretion in rats during late lactation. *Hormones & Behavior* 8:287-296.
- Grosvenor CE, Mena F, Whitworth NS (1979) The secretion rate of prolactin in the rat during suckling and its metabolic clearance rate after increasing intervals of nonsuckling. *Endocrinology* 104:372-376.
- Grosvenor CE, Mena F, Withworth NS (1980) Evidence that dopaminergic prolactin-inhibiting factor mechanism regulates the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. *Endocrinology* 106:481-485.

- Grosvenor CE, Shyr SW, Goodman GT, Mena F (1986) Comparison of plasma profiles of oxytocin and prolactin following suckling in the rat. *Neuroendocrinology* 43:679-685.
- Gunnet JW, Freeman ME (1984) Hypothalamic regulation of mating-induced prolactin release. Effect of electrical stimulation of the medial preoptic area in conscious female rats. *Neuroendocrinology* 38:12-16.
- Gunnet JW, Freeman ME (1985) The interaction of the medial preoptic area and the dorsomedial-ventromedial nuclei of the hypothalamus in the regulation of the mating-induced release of prolactin. *Neuroendocrinology* 40:232-237.
- Hagen TC, Arnaout MA, Scherzer WJ, Martinson DR, Garthwaite TL (1986) Antisera to vasoactive intestinal polypeptide inhibit basal prolactin release from dispersed anterior pituitary cells. *Neuroendocrinology* 43:641-645.
- Harlan RE, Shivers BD, Fox SR, Kaplove KA, Schachter BS, Pfaff DW (1989) Distribution and partial characterization of immunoreactive prolactin in the rat brain. *Neuroendocrinology* 49:7-22.
- Harris GW (1960) Central control of pituitary secretion. Section 1: Neurophysiology. In: *Handbook of physiology* (Field J, Magoun HW, Hall VE, eds), pp 1007-1038. Baltimore, Maryland: American Physiological Society.
- Harvey S, Scanes C, G, Daughaday WH (1995) *Growth hormone*. Florida: CRC Press Inc.
- Hayat MA (1986) *Basic techniques for transmission electron microscopy*: Academic Press.
- Hiraoka Y, Tatsumi K, Shiozawa M, Aiso S, Fukasawa T, Yasuda K, Miyai K (1991) A placenta-specific 5' non-coding exon of human prolactin. *Molecular and Cellular Endocrinology* 75:71-80.
- Ho TW, Leong FS, Olaso CH, Walker AM (1993) Secretion of specific nonphosphorylated and phosphorylated rat prolactin isoforms at different stages of the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 58:160-165.
- Holzbauer M, Racke K (1985) The dopaminergic innervation of the intermediate lobe and of the neural lobe of the pituitary gland. *Medical Biology* 63:97-116.
- Holzbauer M, Sharman DF, Godden U (1978) Observations on the function of the dopaminergic nerves innervating the pituitary gland. *Neuroscience* 3:1251-1262.
- Horrobin DF (1980) Prolactin as a regulator of fluid and electrolyte metabolism in mammals. *Federation Proceedings* 39:2567-2570.
- Houben H, Denef C (1990) Stimulation of growth hormone and prolactin release from rat pituitary cell aggregates by bombesin- and ranatensin-like peptides is potentiated by estradiol, 5- $\alpha$ -dehydrotestosterone, and dexamethasone. *Endocrinology* 126:2257-2266.

- Huerta-Ocampo I, Christian HC, Thompson NM, El-Kasti MM, Wells T (2005) The Intermediate lactotroph: a morphologically distinct, ghrelin-responsive pituitary cell in the dwarf (dw/dw) rat. *Endocrinology* 146:5012-5023.
- Hyde JF, Ben-Jonathan N (1989) The posterior pituitary contains a potent prolactin-releasing factor: in vivo studies. *Endocrinology* 125:736-741.
- Imagawa W, Yang J, Guzman R, Nandi S (1994) Mammary gland development. In: *The physiology of reproduction* (Knobil E, Neill JD, eds), pp 1085-1130. New York: Raven Press.
- Judd AM, Kubota T, Kuan SI, Jarvis WD, Spangelo BL, Macleod RM (1990) Calcitonin decreases thyrotropin-releasing hormone-stimulated prolactin release through a mechanism that involves inhibition of inositol phosphate production. *Endocrinology* 127:191-199.
- Takeya T, Takeuchi S, Takahashi S (2002) Induction of mammatroph development by a combination of epidermal growth factor, insulin, and estradiol-17beta in rat pituitary tumor GH3 cells. *Zoological Sciences* 19:789-795.
- Kashio Y, Chomczynski P, Downs TR, Frohman LA (1990) Growth hormone and prolactin secretion in cultured somatomammotroph cells. *Endocrinology* 127:1129-1135.
- Kato Y, Iwasaki Y, Iwasaki J, Abe H, Yanihara N, Imura H (1978) Prolactin release by vasoactive intestinal polypeptide in rats. *Endocrinology* 103:554-558.
- Kineman RD, Faught WF, Frawley LS (1991a) Mammosomatotropes are abundant in bovine pituitaries: Influence of gonadal status. *Endocrinology* 128:2229-2233.
- Kineman RD, Henricks DM, Faught WJ, Frawley LS (1991b) Fluctuations in the proportions of growth hormone- and prolactin-secreting cells during the bovine estrous cycle. *Endocrinology* 129:1221-1225.
- Kioussi C, Carriere C, Rosenfeld MG (1999) A model for the development of the hypothalamic-pituitary axis: transcribing the hypophysis. *Mech Dev* 81:23-35.
- Kohli R, Chadha N, Muralidhar K (1987) Are sheep and buffalo prolactins sulfated? *Biochemical & Biophysical Research Communications* 149:515-522.
- Kohli R, Chadha N, Muralidhar K (1988) Presence of tyrosine-O-sulfate in sheep pituitary prolactin. *FEBS Lett* 19:139-143.
- Kohmoto K, Tsunasawa S, Sakiyama F (1984) Complete amino acid sequence of mouse prolactin. *European Journal of Biochemistry* 138:227-237.
- Kordon C, Wandscheer D, Shu C, Rotten D, Drouva SV, Enjalbert A, Epelbaum J, Bockaert J, Hubert C (1985) Neural control of prolactin secretion. In: *Prolactin basic and clinical correlates* (M.

- MR, Scapagnini U, Thorner MO, eds), pp 61-71. Italy: Liviana Press.
- Krasnow JS, Hickey GJ, Richards JS (1990) Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Molecular Endocrinology* 4:13-12.
- Labrie F, Gauthier M, Pelletier G, Borgeat P, Lemay A, Gouge JJ (1973) Role of microtubules in basal and stimulated release of growth hormone and prolactin in rat adenohypophysis in vitro. *Endocrinology* 93:903-914.
- Lamberts SW, Macleod RM (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* 70:279-318.
- Langenheim JF, Tan D, Walker AM, Chen WY (2006) Two wrongs can make a right: Dimers of prolactin and growth hormone receptors antagonists behave as agonist. *Molecular Endocrinology* 20:661-674.
- Larson GH, Wise PM (1994) Constitutive and regulated prolactin secretion: effects of estradiol. *Biology of Reproduction* 50:357-362.
- Levy A (2002) Physiological implications of pituitary trophic activity. *Journal of Endocrinology* 174:147-155.
- Lewis UJ, Singh RN, Lewis LJ, Seavey BK, Sinha YN (1984) Glycosylated ovine prolactin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:385-389.
- Li C (1976) Studies on pituitary lactogenic hormone: The primary structure of the porcine hormone. *International Journal of Peptide Protein Research* 8:205-224.
- Li C, Dixon JS, Lo TB, Schmidt KD, Pankov YA (1970) Studies on pituitary lactogenic hormone. XXX. The primary structure of the sheep hormone. *Archives in Biochemistry and Biophysics* 141:705-737.
- Lieberman ME, Maurer RA, Gorski J (1978) Estrogen control of prolactin synthesis in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 75:5946-5949.
- Little AB, Billiar RB (1983) Progestagens. In: *Endocrinology of pregnancy* (Fuchs F, Klopper A, eds), pp 92-111. Philadelphia, E. U.: Harper & Row.
- Lockett MF (1972) Actions of adrenal, hypophyseal and renal hormones on the renal excretion of water and electrolytes. *Progress in Biochemistry and Pharmacology* 7:94-145.
- Luque EH, Munoz del Toro M, Smith PF, Neill JD (1986) Subpopulations of lactotropes detected with the reverse hemolytic plaque assay show differential responsiveness to dopamine. *Endocrinology* 118:2120-2124.
- Lyons WR, Li CH, Johnson RE (1958) The hormonal control of mammary growth and lactation. *Recent Progress of Hormone Research* 14:219-254.

- MacLeod RM (1969) Influence of norepinephrine and catecholamine-depleting agents on the synthesis and release of prolactin and growth hormone. *Endocrinology* 85:916-923.
- Mangoura D, Pelletiere C, Leung S, Sakellaridis N, Wang DX (2000) Prolactin concurrently activates src-PLD and JAK/Stat signaling pathways to induce proliferation while promoting differentiation in embryonic astrocytes. *International Journal of Developmental Neurosciences* 18:693-704.
- Manku MS, Mtabaji JP, Horrobin DF (1975) Effect of cortisol, prolactin and ADH on the amniotic membrane. *Nature* 258:78-80.
- Mantera L (1996) Endocrine, paracrine and autocrine actions of prolactin on immune cells. *Life Sciences* 59:599-614.
- Manzon LA (2002) The role of prolactin in fish osmoregulation: a review. *General & Comparative Endocrinology* 125:291-310.
- Markoff E, Sigel MB, Lacour N, Seavey BK, Friesen HG, Lewis UJ (1988) Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 123:1303-1306.
- Martini JF, Piot C, Humeau LM, Struman I, Martial JA, Weiner RI (2000) The antiangiogenic factor 16K PRL induces programmed cell death in endothelial cells by caspase activation. *Molecular Endocrinology* 14:1536-1549.
- Matsuyama S, Shiota K, Takahashi M (1990) Possible role of transforming growth factor beta as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell cultures. *Endocrinology* 127:1561-1567.
- Maurer RA (1982) Estradiol regulates the transcription of prolactin gene. *The Journal of Biological Chemistry* 257:2133-2136.
- Maurer RA, Gorski J, McKean DJ (1977) Partial amino acid sequence of rat pre-prolactin. *Biochemistry Journal* 161:189-192.
- Mejia S, Torner LM, Jeziorski MC, González C, Morales MA, Martínez de la Escalera G, Clapp C (2003) Prolactin and 16 K prolactin stimulate release of vasopressin by a direct effect on hypothalamo-neurohypophyseal system. *Endocrine* 20:155-162.
- Melmed S (2003) Mechanisms for pituitary tumorigenesis: the plastic pituitary. *Journal of Clinical Investigation* 112:1603-1618.
- Mena F, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Grosvenor CE (1984) In vivo and in vitro secretion of prolactin by lactating rat adenohypophyses as a function of intracellular age. *Journal of Endocrinology* 101:27-32.
- Mena F, Clapp C, Aguayo D, Martínez de la Escalera G (1989a) Differential effects of thyrotropin-releasing hormone on in vitro release of in vivo or in vitro newly synthesized and mature prolactin by lactating rat adenohypophyses. *Neuroendocrinology* 49:207-214.
- Mena F, Clapp C, Aguayo D, Lorenson MY, Martínez de la Escalera G (1986) Thiol regulation of depletion-transformation and release of

- prolactin by pituitary of the lactating rat. *Endocrinology* 118:1795-1802.
- Mena F, Montiel JL, Aguayo D, Morales MT, Aramburo C (1993) Recent findings on prolactin transformation by the lactating rat pituitary. *Endocrine Regulations* 27:105-113.
- Mena F, Clapp C, Aguayo D, Morales T, Grosvenor CE, Martínez de la Escalera G (1989b) Regulation of prolactin secretion by dopamine and thyrotropin-releasing hormone in lactating rat adenohypophyses: influence of intracellular age of the hormone. *Endocrinology* 125:1814-1820.
- Mena F, Hummelt G, Aguayo D, Clapp C, Martínez de la Escalera G, Morales MT (1992) Changes in molecular variants during *in vitro* transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology* 130:3365-3377.
- Mena F, Aguayo D, Vigeras M, Quintanar-Stephano A, Perera G, Morales T (1996) Effect of posterior pituitary lobectomy on *in vivo* and *in vitro* secretion of prolactin in lactating rats. *Endocrine* 5:285-290.
- Menashi S, Lu H, Soria C, Legrand Y (1993) Endothelial cell proteases: physiological role and regulation. *Baillieres Clinical Haematology* 6:559-576.
- Mitra I (1980a) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: part I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 95:1750-1759.
- Mitra I (1980b) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II. *In vivo* mammary mitogenic activity of its N-terminal 16K moiety. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 95:1760-1767.
- Morel G, Chabot JG, Enjalbert A, Priam M, Dubois PM (1989) Evidence for direct action of calcitonin in the rat pituitary gland. *Acta Endocrinologica* 120:682-688.
- Murai I, Ben-Jonathan N (1990) Acute stimulation of prolactin release by estradiol: mediation by the posterior pituitary. *Endocrinology* 126:3179-3184.
- Murai I, Reichlin S, Ben-Jonathan N (1989) The peak phase of the proestrous prolactin surge is blocked by either posterior pituitary lobectomy or antisera to vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 124:1050-1055.
- Murphy BD, Rajkumar K (1985) Prolactin as a luteotrophin. *Canadian Journal of Physiology & Pharmacology* 63:257-264.
- Nagy G, Mulchahey JJ, Neill JD (1988) Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 122:364-366.
- Nagy GM, Frawley LS (1990) Suckling increases the proportions of mammatropes responsive to various prolactin-releasing stimuli. *Endocrinology* 127:2079-2084.



- Nagy GM, Boockfor FR, Frawley LS (1991) The suckling stimulus increases the responsiveness of mammotropes located exclusively within the central region of the adenohypophysis. *Endocrinology* 128:761-764.
- Neill JD, Nagy GM (1994) Prolactin secretion and its control. In: *The physiology of reproduction* (Knobil E, Neill JD, eds), pp 1833-1860. New York: Raven Press.
- Nicoll C (1974) Physiological actions of prolactin. In: *Handbook of Physiology/Endocrinology* (Society AP, ed), pp 253-281.
- Nicoll CS, Parsons JA, Fiorindo RP, Nichols CW, Jr. (1969) Estimation of prolactin and growth hormone levels by polyacrylamide disc electrophoresis. *Journal of Endocrinology* 45:183-196.
- Nikitovitch-Winer MB, Atkin J, Maley BE (1987) Colocalization of prolactin and growth hormone within specific adenohypophyseal cells in male, female, and lactating female rats. *Endocrinology* 121:625-630.
- Nogami H, Yoshimura F (1982) Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *The Anatomical Record* 202:261-274.
- Obál FJ, Kacsóh B, Aldofi P, Payne L, Marckovic O, Grosvenor CE, Krueger JM (1992) Antiserum to prolactin decreases rapid eye movement sleep (REM sleep) in the male rat. *Physiology & Behaviour* 52:1063-1068.
- Oomizu S, Honda J, Takeuchi S, Kakeya T, Masui T, Takahashi S (2000) Transforming growth factor- $\alpha$  stimulates proliferation of mammotrophs and corticotrophs in the mouse pituitary. *Journal of Endocrinology* 165:493-501.
- Pan JT, Mai LM (1990) Dopamine antagonism does not potentiate the effects of oxytocin and vasopressin on prolactin secretion. *Life Sciences* 47:2443-2450.
- Pan J-T, Gala RR (1985) Central nervous system regions involved in the estrogen-induced afternoon prolactin surge. *Endocrinology* 117:382-387.
- Pankov Yu A, Butnev V (1986) Multiple forms of pituitary prolactin, a glycosylated form of porcine prolactin with enhanced biological activity. *International Journal of Peptide & Protein Research* 28:113-123.
- Papka RE, Yu SM, Nikitovitch-Winer MB (1986) Use of immunoperoxidase and immunogold methods in studying prolactin secretion and application of immunogold labelling for pituitary hormones and neuropeptides. *American Journal of Anatomy* 175:289-306.
- Pasteels JL (1963) Recherches morphologiques et expérimentales sur la sécrétion de prolactine. *Archives of Biology (Liege)* 74:439-553.
- Patterson JC, Childs GV (1994) Nerve growth factor and its receptor in the anterior pituitary. *Endocrinology* 135:1689-1696.

- Pellegrini I, Gunz G, Grisoli F, Jaquet P (1990) Different pathways of secretion for glycosylated and nonglycosylated human prolactin. *Endocrinology* 126:1087-1095.
- Porter TE (2005) Regulation of pituitary somatotroph differentiation by hormones of peripheral endocrine glands. *Domestic Animal Endocrinology* 29:52-62.
- Porter TE, Frawley LS (1992) Neurointermediate lobe peptides recruit prolactin-secreting cells exclusively within the central region of the adenohypophysis. *Endocrinology* 131:2649-2652.
- Porter TE, Wiles CD, Frawley LS (1984) Stimulation of lactotrope differentiation *in vitro* by fibroblast growth factor. *Endocrinology* 134:164-168.
- Porter TE, Ellerkmann E, Frawley LS (1992) Acute recruitment of prolactin-secreting cells is regulated posttranscriptionally. *Molecular and Cellular Endocrinology* 84:23-31.
- Porter TE, Wiles CD, Frawley LS (1994) Stimulation of lactotrope differentiation *in vitro* by fibroblast growth factor. *Endocrinology* 134:164-168.
- Porter TE, Bryan HJ, Wiles CD, Frawley LS (1990) Is the mammosomatotrope a transitional cell for the functional conversion of growth hormone-and-prolactin-secreting cells? Suggestive evidence from virgin, gestating and lactating rats. *Endocrinology* 127:2789-2794.
- Powers CA, Hatala MA (1990) Prolactin proteolysis by glandular kallikrein: *in vitro* reaction requirements and cleavage sites, and detection of processed prolactin *in vivo*. *Endocrinology* 127:1916-1927.
- Prevorskaya NB, Skryma RN, Vacher P, Daniel N, Djiane J, Dufy B (1995) Role of tyrosine phosphorylation in potassium channel activation. Functional association with prolactin receptor and JAK2 tyrosine kinase. *Journal of Biological Chemistry* 270:24292-24299.
- Proctor GB (1998) Secretory protein synthesis and constitutive (vesicular) secretion by salivary glands. *Frontiers in Oral Biology*, Basel Karger 10:73-88.
- Proesmans M, Bael AV, Andries M, Denef C (1997) Mitogenic effects of nerve growth factor on different cell types in reaggregate cell cultures of immature rat pituitary. *Molecular & Cellular Endocrinology* 134:119-127.
- Purvis K, Clausen OP, Olsen A, Haug E, Hansson V (1979) Prolactin and Leydig cell responsiveness to LH/hCG in the rat. *Archives of Andrology* 3:219-230.
- Ratovondrahona D, Fahmi M, Fournier B, Odessa MF, Skryma R, Prevorskaya N, Djiane J, Dufy B (1998) Prolactin induces an inward current through voltage-independent Ca<sup>2+</sup> channels in Chinese hamster ovary cells stably expressing prolactin receptor. *Journal of Molecular Endocrinology* 21:85-95.

- Roky R, Valatx JL, Jouvet M (1993) Effect of prolactin on the sleep-wake cycle in the rat. *Neuroscience Letters* 156:117-120.
- Roky R, Obál FJ, Valatx JL, Bredow S, Fang J, Pagano LP, Krueger JM (1995) Prolactin and eye movement sleep regulation. *Sleep* 18:536-542.
- Rose-Hellekant TA, Arendt LM, Schroeder MD, Gilchrist K, Sandgren EP, Schuler LA (2003) Prolactin induces ERα-positive and ERα-negative mammary cancer in transgenic mice. *Oncogene* 22:4664-4674.
- Saffran M, Schally AV, Benfey BG (1955) Stimulation of the release of corticotropin from the adenohypophysis by a neurohypophysial factor. *Endocrinology* 57:439-444.
- Saiduddin S, Zassenhaus HP (1977) Effect of prolactin on specific oestradiol receptors in the rat uterus. *Journal of Endocrinology* 72:101-102.
- Samson WK, Schell DA (1995) Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 395:355-364.
- Sano M (1962) Further studies on the theta cell of the mouse anterior pituitary as revealed by electron microscopy, with special reference to the mode of secretion. *Journal of Cell Biology* 15:85-97.
- Schneider AB, Kowalski K, Buckman G, Sherwood LM (1977) Dimeric ("big") human placental lactogen. Immunological and biological activity. *Biochim Biophys Acta* 493.
- Schwartz J (2000) intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocrine Reviews* 21:488-513.
- Selander RK, Yang SY (1966) The incubation patch of the house sparrow, *Passer domesticus* Linnaeus. *General Comparative Endocrinology* 6:325-333.
- Shah GN, Hymer WC (1989) Prolactin variants in the rat adenohypophysis. *Molecular & Cellular Endocrinology* 61:97-107.
- Sharoni Y, Eimerl S, Schramm M (1976) Secretion of old versus new exportable protein in rat parotid slices. Control by neurotransmitters. *J Cell Biol* 71:107-122.
- Sharp PJ (1997) Comparative regulation of prolactin secretion. XIII International Congress of Comparative Endocrinology Yokohama, Japan:951-955.
- Shome B, Parlow AF (1977) Human pituitary prolactin (hPRL): The entire linear amino acid sequence. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 45:1112-1115.
- Signorella AP, Hymer WC (1984) An enzyme-linked immunosorbent assay for rat prolactin. *Analytical Biochemistry* 136:372-381.
- Sinha YN (1992) Prolactin variants. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 3:100-106.
- Sinha YN (1995) Structural variants of prolactin: Occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews* 16:354-369.

- Sinha YN, Gilligan TA (1985) Identification and partial characterization of a 25K protein structurally similar to prolactin. *Proceedings of the Society for experimental biology and medicine* 178:505-514.
- Sinha YN, DePaolo LV, Haro LS, Singh RN, Jacobsen BP, Scott KE, Lewis UJ (1991) Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Molecular & Cellular Endocrinology* 80:203-213.
- Smith MS, Freeman ME, Neill JD (1975) The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96:219-226.
- Smith RE, Farquhar MG (1966) Lysosome function in the regulation of secretory process in cells of the anterior pituitary gland. *The Journal of Cell Biology* 31:319-347.
- Sorin B, Goupille O, Vacher AM, Paly J, Djiane J, Vacher P (1998) Distinct cytoplasmic regions of the prolactin receptor are required for prolactin-induced calcium entry. *Journal of Biological Chemistry* 273:28461-28469.
- Spinolo LH, Crowley WR (1993) Neurochemical regulation of hypothalamic oxytocin messenger ribonucleic acid levels during early lactation in rats. *Endocrinology* 132:2631-2638.
- Stachura ME, Tyler JM (1986) Functional substructure of the rat somatotroph immediate release pool: definition by responses to N6,2'-O-dibutyryl cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, potassium ion, and/or prostaglandin E1. *Endocrinology* 119:2168-2176.
- Stachura ME, Tyler JM, Kent PG (1989) Pituitary immediate release pools of growth hormone and prolactin are preferentially refilled by new rather than stored hormone. *Endocrinology* 125:444-449.
- Stricker P, Grueter R (1928) Action du lobe antérieure de l'hypophyse sur la montée laiteuse. *C R Soc Biol* 99:1978-1980.
- Struman I, Bentzien F, Lee H, Mainfroid V, D'Angelo G, Goffin V, Weiner RI, Martial JA (1999) Opposing actions of intact and N-terminal fragments of the human prolactin/growth hormone family members on angiogenesis: an efficient mechanism for the regulation of angiogenesis. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 96:1246-1251.
- Torner L, Toschi N, Nava G, Clapp C, Neumann ID (2002) Increased hypothalamic expression of prolactin in lactation: involvement in behavioural and neuroendocrine stress responses. *European Journal of Neuroscience* 15:1381-1389.
- Torres AI, Aoki A (1987) Release of big and small molecular forms of prolactin: dependence upon dynamic state of the lactotroph. *Journal of Endocrinology* 114:213-220.

- Toubeau G, Desclin J, Parmentier M, Pasteels JL (1979) Compared localizations of prolactin-like and adrenocorticotropin-like immunoreactivities within the brain of the rat. *Neuroendocrinology* 29:374-384.
- Tougard C, Picart R, Tixer-Vidal A (1980) Electron-microscopic cytochemical studies on the secretory process in rat prolactin cells in primary culture. *American Journal of Anatomy* 158:471-490.
- Truong AT, Duez C, Belayew A, Renard A, Pictet R, Bell GI, Martial JA (1984) Isolation and characterization of the human prolactin gene. *EMBO Journal* 3:429-437.
- Tucker HA (1994) Lactation and its control. In: *The physiology of reproduction* (Knobil E, Neill JD, eds), pp 1065-1097. New York: Raven Press.
- Vidal S, Roman A, Oliveira MC, De La Cruz LF, Moya L (1998) Simultaneous localization of Pit-1 protein and gonadotropins on the same cell type in the anterior pituitary glands of the rat. *Histochemistry & Cell Biology* 110:183-188.
- Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Lloyd RV, Smyth HS (2001) Reversible transdifferentiation: interconversion of somatotrophs and lactotrophs in pituitary hyperplasia. *Modern Pathology* 14:20-28.
- Vidal S, Horvath E, Kovacs K, Cohen SM, Lloyd R, Scheithauer BW (2000) Transdifferentiation of somatotrophs to thyrotrophs in the pituitary of patients with protracted primary hypothyroidism. *Virchows Archives* 436:43-51.
- Vonderhaar BK (1999) Prolactin involvement in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 6:389-404.
- Walker AM, Farquhar MG (1980) Preferential release of newly synthesized prolactin granules is the result of functional heterogeneity among mammatrophs. *Endocrinology* 107:1095-1104.
- Wallis M (1984) The molecular evolution of prolactin and related hormones. In: *Prolactin secretion: A multidisciplinary approach* (Mena F, Valverde C, eds), pp 1-16. Vogt, E.U.: Ed. Marcella, W.
- Wuttke W, Meites J (1971) Luteolytic role of prolactin during the estrous cycle of the rat. *Proc Soc Exp Biol Med* 137:988-991.
- Yu-Lee LY (2002) Prolactin modulation of immune and inflammatory responses. *Recent Progress in Hormone Research* 57:435-455.
- Zanini A, Giannattasio G (1972) Polyacrilamide gel electrophoresis of rat anterior pituitary gland after different extraction procedures. *Journal of Endocrinology* 53:177-178.
- Zanini A, Giannattasio G (1973) Isolation of prolactin granules from rat pituitary glands. *Endocrinology* 92:349-357.