

56
2ej



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Química

FORMAS MOLECULARES DE LA PROLACTINA A
TRAVES DEL CICLO MENSTRUAL, EL
EMBARAZO Y LA LACTANCIA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

T E S I S
Que para obtener el Título de
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
p r e s e n t a
RAFAELA GONZALEZ COTA



LEIS CON
FALLA DE ORIGEN

1 9 9 1



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 está 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.

I N D I C E

	Pagina
CAPITULO I: INTRODUCCION	1
CAPITULO II: GENERALIDADES	16
PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS	17
1. <u>Filtración en gel</u>	17
2. <u>Radioinmunoanálisis (RIA)</u>	19
3. <u>Cromatografía por afinidad</u>	21
CAPITULO III: MATERIAL Y METODOS	27
1. Reactivos	28
2. Preparación de las soluciones amortiguadoras empleadas	29
3. Material Clínico	31
4. Procedimiento	32
<u>Filtración en gel</u>	32
<u>Curva de Calibración de Peso Molecular</u>	33
<u>Radioinmunoanálisis de Prolactina</u>	34
<u>Cromatografía por afinidad con Sepharosa-Concanavalina-A</u>	37
CAPITULO IV: RESULTADOS	43
I. CICLO MENSTRUAL NORMAL	44
II. EMBARAZO	46
a) Estudio en líquido amniótico	46
b) Estudio cromatográfico de los sueros	46
III. POSTPARTO Y LACTANCIA	47
IV. PATOLOGIAS ASOCIADAS A LA SECRECION DE PROLACTINA	49
a) Normoprolactinemia con galactorrea	49
b) Hiperprolactinemia con galactorrea	50
c) Síndrome de amenorrea-galactorrea (SAG)	51
d) Hiperprolactinemia con amenorrea	51

CAPITULO V:	DISCUSION Y CONCLUSIONES	83
APENDICE:	Descripción de Figuras y Tablas	90
BIBLIOGRAFIA:		99

C A P I T U L O I
I N T R O D U C C I O N

La prolactina (PRL) es una hormona que se encuentra presente en la mayoría de los vertebrados, siendo secretada por las células acidófilas del lóbulo anterior de la hipófisis. Presenta marcado efecto sobre la lactancia, que fue lo que condujo a su descubrimiento y a su designación temprana de hormona lactogénica.

Fue aislada por primera vez en 1937 a partir de hipófisis de oveja, sin embargo, fue hasta 1971 cuando la PRL pudo ser identificada en la especie humana como una hormona distinta de la hormona del crecimiento (GH), con la que se encuentra mezclada en los extractos hipofisarios, siendo muy difícil de separar, por su baja concentración en relación a la de la GH (1). En la actualidad ha sido bien caracterizada, se sabe que es un polipéptido de 198 aminoácidos con tres puentes disulfuro y un peso molecular (PM) aproximado de 22,000 (Fig. 1) (2).

La PRL presenta gran semejanza estructural con la GH y con el lactógeno placentario (HPL), hormonas polipeptídicas que tienen zonas de gran homología con PRL en su secuencia de aminoácidos (3). Se piensa que las tres hormonas derivan de un gen ancestral común (4), puesto que poseen algunas características biológicas compartidas, como son: 1) su acción lactogénica o propiedad de estimular la glándula mamaria de los mamíferos para la producción de leche, acción que es específica de la PRL, 2) acción sobre el crecimiento de los tejidos y efectos metabólicos, característicos de GH y del HPL durante el embarazo (5). Debido a esta semejanza estructural, la PRL y la GH presentan también cierto grado de inmunoreactividad cruzada, lo que en un principio dificultó su separación haciendo dudar de la existencia de la PRL como una hormona distinta de la GH.

Además de las propiedades lactogénicas ya mencionadas, se atribuye a la PRL un papel mamotrópico, condicionando el crecimiento de la glándula mamaria a la pubertad y un efecto

sobre la biosíntesis y secreción de la progesterona, favoreciendo la formación del cuerpo lúteo del ciclo menstrual normal. A este respecto existen algunas controversias, pues otros investigadores han mostrado una acción luteolítica de la PRL en estudios "in vivo" realizados en ratas durante el ciclo estrogénico y se piensa que dicha acción puede ser extensiva a la mujer en los últimos días del ciclo (6).

Durante el embarazo existe un estado de hiperprolactinemia fisiológica muy importante, sin embargo no ocurre la lactancia, debido a la elevada concentración de esteroides producidos por la placenta. Se ha sugerido que en esta etapa el papel principal de la PRL es el desarrollo de la glándula mamaria (diferenciación lobulillar) y su preparación para la lactancia (Fig. 2), la cual se presenta después del parto, al caer bruscamente los niveles de estrógenos y de progesterona (7).

En el líquido amniótico (LA) también se encuentran grandes cantidades de PRL producida por la decidua de la placenta (8), y se cree que en el feto la PRL tiene varias funciones: acción sobre el crecimiento, un papel de hormona osmorreguladora y posiblemente también en la maduración del pulmón fetal (9).

En el puerperio, la prolactina desempeña un papel clave para la secreción de leche en la glándula mamaria diferenciada, acción que requiere el efecto inductor y la participación de otras hormonas como insulina y cortisol; sin embargo, la PRL por sí sola puede estimular la síntesis de proteínas de la leche, tales como caseína y α lactoalbúmina (10) y probablemente también esté implicada en el mantenimiento de la concentración de Na^+ en la leche, ya que se ha demostrado que esta hormona promueve la retención de sodio en la glándula mamaria. Además se sabe que incrementa la capacidad de esta glándula para atraer y retener linfoblastos secretores de IgA. Aunque se desconoce el mecanismo por el cual ésto ocurre, el fenómeno es de gran interés, ya que

los anticuerpos presentes en la leche materna juegan un importante papel en la defensa del infante contra enfermedades microbianas. Después del parto los niveles de PRL disminuyen, pero se mantienen elevados en relación a los del ciclo menstrual en las madres que amamantan a sus hijos, presentandose un aumento notable de la concentración sérica de la PRL después de cada succión, lo que asegura el mantenimiento de la lactancia (Fig. 3) (11).

La PRL se relaciona con la reproducción no solo por su intervención sobre la lactancia, sino colateralmente preservando a la mujer de un embarazo intercurrente, ya que mientras la PRL se conserva elevada, afecta negativamente al ciclo reproductivo. A este respecto, estudios realizados recientemente han permitido establecer que la hiperprolactinemia interrumpe la función ovárica por tres mecanismos diferentes: 1) interfiere con el "feed back" positivo que ejercen los estrógenos ováricos sobre el eje hipotálamo-hipofisario, 2) interrumpe la secreción pulsátil de la hormona hipotálamica liberadora de gonadotropinas (LH-RH) y subsecuentemente la secreción de gonadotropinas hipofisarias y estrógenos ováricos, 3) modifica los receptores ováricos creando cierto grado de insensibilidad a las gonadotropinas (12). Esto explica el por qué se presenta anovulación, amenorrea y/o galactorrea en los estados de hiperprolactinemia patológica (Fig. 4).

Valores de Referencia

Las cifras de referencia de PRL en suero son: en la mujer normal <20 ng/ml, y en el hombre <10 ng/ml; valores por arriba de estas cifras son considerados correspondientes a hiperprolactinemia, que puede ser moderada, si las cifras de PRL no sobrepasan los 50 ng/ml. Este tipo de hiperprolactinemia generalmente se asocia al uso de fármacos y drogas psicotrópicas o bien a una disfunción del eje hipotálamo-hipofisario. La hiperprolactinemia se

considera importante cuando la PRL se encuentra por arriba de la cifra mencionada. Existen varias situaciones clinicas asociadas a concentraciones elevadas de PRL en sangre (Cuadro 1). Una de ellas es por la presencia de un prolactinoma (tumor hipofisario productor de prolactina), en cuyo caso se encuentran generalmente cifras de PRL superiores a los 100 ng/ml (Fig. 5); si éstos se excluyen, queda como causa mas común de hiperprolactinemia lo que se define como un "trastorno disfuncional", término no muy adecuado ya que no ofrece la garantía de descartar un proceso anatómico incipiente.

La expresión clinica más característica de la hiperprolactinemia es la galactorrea, que puede definirse como una secreción persistente de la mama, parecida a la secreción lactea, que ocurre sin relación al parto, o bien que persiste durante varios meses postparto en ausencia de amamantamiento (13).

La galactorrea se presenta tanto en el hombre como en la mujer, en una amplia variedad de trastornos endocrinos y no endocrinos (Cuadro 2). En el hombre la galactorrea es menos frecuente, supuestamente porque la mama recibe menor estimulo estrogenico. La causa más común de galactorrea en el hombre es la presencia de tumor hipofisario. En la mujer se puede presentar hiperprolactinemia con o sin galactorrea en los siguientes trastornos: tumor hipofisario (30% de los casos), amenorrea hipotalamica, anovulación crónica con trastornos menstruales moderados, fase lútea deficiente. En el hombre se pueden mencionar: tumor hipofisario, trastornos tiroideos, acromegalia y el uso de digital y antagonistas dopaminérgicos (14).

Por otra parte, puede presentarse también galactorrea, en mujeres que tienen niveles normales de PRL (15), lo que se ha tratado de explicar en base a varias teorías: 1) una excesiva sensibilidad

del tejido mamario a dicha hormona, debido a un aumento de los receptores de PRL. 2) cambios en los ritmos de secreción de PRL, 3) a una elevada concentración de GH (16).

Como ya se mencionó, la PRL es una hormona que presenta varias funciones que se han tratado de explicar en base a la presencia de diferentes formas moleculares de la hormona. Resultados de estudios realizados recientemente por métodos electroforéticos (17) y cromatográficos (18) demuestran que la PRL al igual que otras hormonas polipeptídicas, se caracteriza por su heterogeneidad molecular. Las diversas formas moleculares de PRL (isohormonas) han sido detectadas en extractos hipofisarios (19), en suero y plasma de mujeres hiperprolactinémicas (20,21) en pacientes con un tumor hipofisario (22), en el líquido cefalorraquídeo (18) y en el líquido amniótico (23). Se ha mencionado que estas isohormonas pueden desempeñar diferentes funciones.

A la fecha son bien conocidas 3 formas moleculares de PRL reveladas por filtración en gel. La más importante en el perfil cromatográfico es la más pequeña de las tres que eluye en las fracciones correspondientes al estándar de 125 I-PRL; es una estructura con peso molecular de 22 Kd. A esta forma molecular se le designa "little" PRL, corresponde a la forma monomérica de la hormona y parece ser la forma más activa. Las otras dos formas moleculares de mayor tamaño son "big-big" PRL que eluye justo después del volumen de exclusión del sistema (V_0) con un peso molecular aproximado de 100 Kd, y la "big" PRL con PM de 40-65 Kd, que aparece en el volumen de elución de la albúmina (24, 25, 26). Ambas formas presentan menor actividad biológica que "little" PRL. Se cree que la "big" PRL puede ser el dímero y "big-big" PRL un polímero o el precursor de la hormona (25, 27, 28).

En estudios recientes se ha reportado la presencia de una

variante de PRL glucosilada (G-PRL) con un PM aproximado de 25 000 - 28 000, ha sido aislada de cultivos de tumores secretores de PRL (29) y se ha identificado también en suero humano (30). Dicha forma parece ser menos activa que la forma monomérica no glucosilada de PRL (NG-PRL) y es de interés por considerarse que regula la concentración de la prolactina activa (22 kD). Así, el polimorfismo de PRL es muy importante porque parece guardar relación con la actividad biológica de la hormona (25, 26, 29).

Por esta razón se consideró necesario estudiar la composición cualitativa y la proporción de las diferentes formas moleculares de PRL, tanto en condiciones normales como en mujeres con trastornos en su secreción. Hasta ahora los escasos estudios realizados en mujeres durante el ciclo menstrual han dado diferentes resultados en cuanto a la distribución cuantitativa de las principales formas moleculares de PRL, debido probablemente a que en condiciones normales, esta hormona se encuentra en una concentración muy baja (100 ng/ml), lo que dificulta su cuantificación en las fracciones resultantes de la cromatografía en gel (18,20,31).

La misma discrepancia se ha presentado en los estudios realizados en sueros de mujeres embarazadas y lactando, tal vez debido a las diferentes características clínicas de las pacientes estudiadas (32, 33, 34). En consecuencia no se conoce con exactitud el perfil cromatográfico normal, ni el significado fisiológico de los cambios que ocurren en las formas moleculares de la PRL a través del ciclo menstrual, la gestación y la lactancia, pensándose que se podrían relacionar con las diferentes funciones atribuidas a la hormona y que podrían residir en estas variantes moleculares. Se ha sugerido también que algunas de las moléculas detectadas pueden ser artificios resultantes de la descomposición del material biológico durante el procesamiento de las muestras o su almacenamiento en condiciones inadecuadas (18).

Por ello, el objetivo principal de esta tésis fue estudiar el perfil cromatográfico de la PRL circulante en mujeres con ciclos menstruales normales (para contar con un punto de referencia confiable), y en mujeres embarazadas y lactando con el fin de realizar un análisis comparativo, y determinar si los cambios de las isohormonas a través del ciclo menstrual, embarazo y lactancia, se relacionan al estado fisiológico.

Colateralmente y con el objeto de complementar la información sobre el posible papel de las formas moleculares de la PRL, se analizó también el suero de algunas mujeres con alteraciones en la secreción de PRL, como son aquellas que presentan galactorrea, amenorrea, o amenorrea-galactorrea (SAG) así como algunas pacientes con prolactinoma; todo esto a fin de relacionar las formas moleculares con el ambiente hormonal y el estado fisiopatológico, tratando de averiguar cuál es el significado biológico de la heterogeneidad de esta hormona.

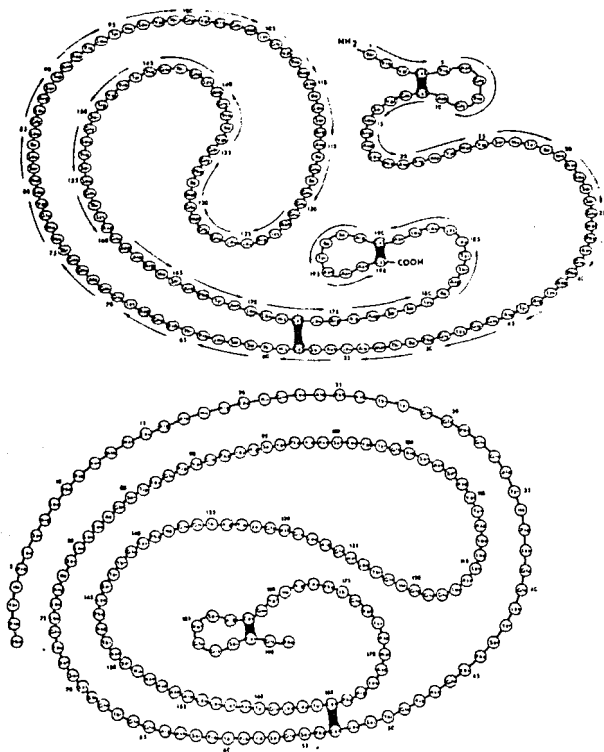


Figura 1. Estructuras de prolactina (parte superior) y de hormona del crecimiento humana (dibujo inferior). Puede apreciarse la semejanza entre ambas hormonas.

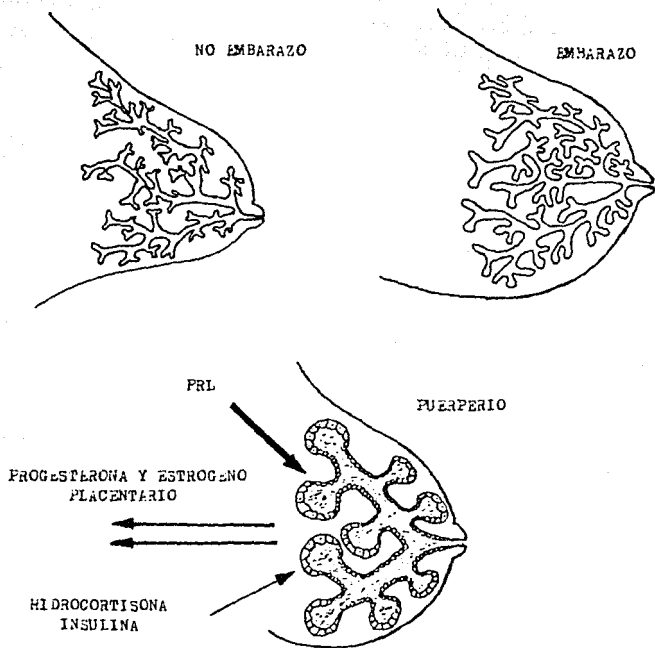


Figura 2. Cambios en la estructura lobulillar-alveolar en la mama humana. En ausencia de embarazo se observan simples conductos ramificados. Durante la gestación cabe apreciar proliferación de lobulillos y alveolos. En el puerperio, con la lactogénesis, el sistema de conductos se llena de leche y las células lactógenas aumentan de volumen con síntesis activa.

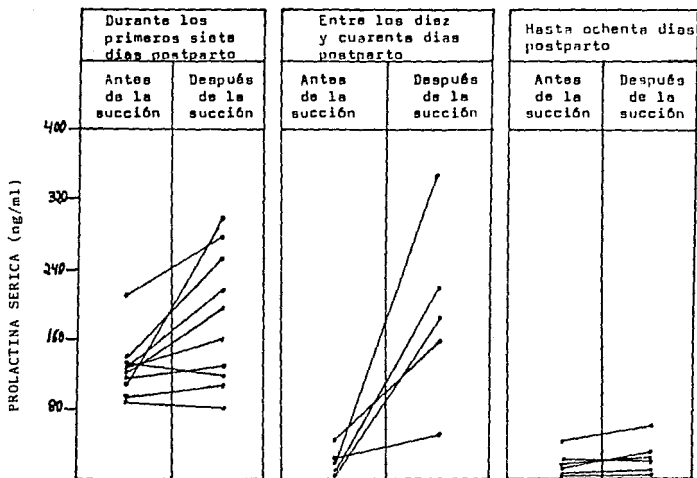
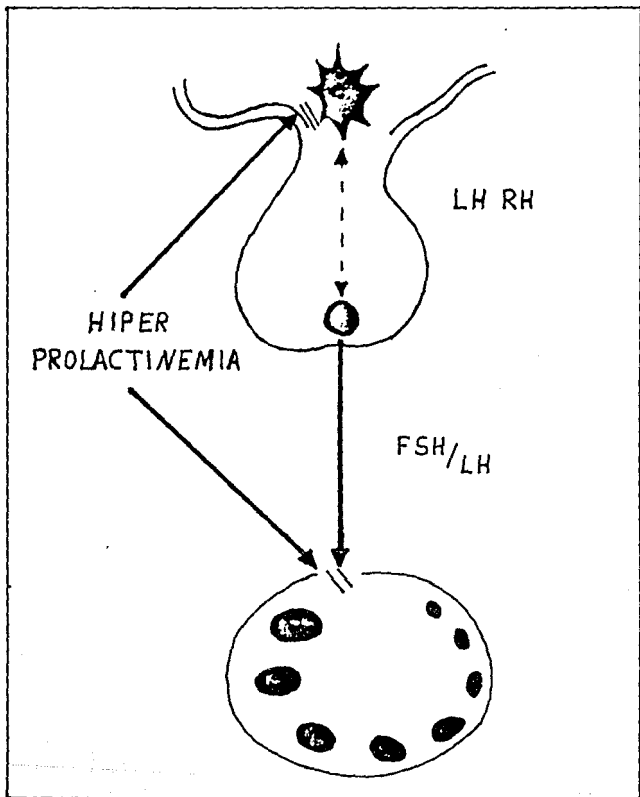


Figura 3.- Respuesta de la prolactina sérica a la succión durante el postparto en mujeres normales.

Figura 4.- La hiperprolactinemia tiene predominantemente dos sitios de interferencia: uno sobre la secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (LHRH) y la otra a nivel ovarico antagonizando con las gonadotropinas (FSH y LH).



CUADRO 1.

ESTADOS DE HIPERPROLACTINEMIA.

DESTRUCCION HIPOTALAMICA

SECCION O COMPRESION DEL TALLO HIPOFISARIO

TUMOR HIPOFISARIO

HIPOTIROIDISMO

INSUFICIENCIA RENAL

SINDROME DE OVARIO POLIQUISTICO

FARMACOLOGICOS

NIVELES DE PROLACTINA SERICA EN MUJERES
CON DIVERSOS TRASTORNOS

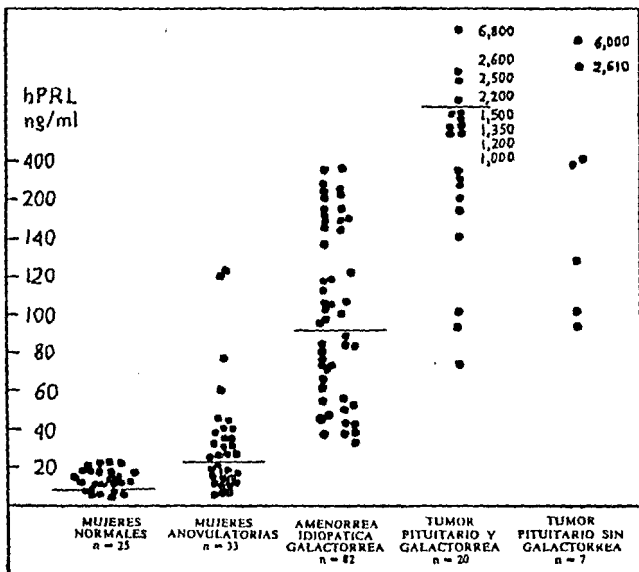


Figure 5.- En algunos casos de tumor hipofisario los niveles de prolactina superan los 2,000 ng/ml.

CUADRO 2.

CAUSAS MAS FRECUENTES DE GALACTORREA.

1. ENDOCRINA

- TUMOR HIPOFISARIO
- SINDROME DE AMENORRREA-GALACTORREA
- SINDROME DE SILLA TURCA VACIA
- SECCION DEL TALLO HIPOFISARIO
- SINDROME DE CUSHING
- HIPOTIROIDISMO
- ACROMEGALIA

2. NO ENDOCRINA

- ESTIMULACION REPETIDA DEL PEZON
- IRRITACION DE LA PARED TORACICA (HERPES, QUEMADURA, CIRUGIA)
- IATROGENICA (ANTAGONISTAS DOPAMINERGICOS, BLOQUEADORES ADRENERGICOS, ANTICONCEPTIVOS SISTEMICOS)
- CIRUGIA PELVICA (HISTERECTOMIA Y OOFORECTOMIA)
- IRRITACION UTERINA (DISPOSITIVOS ANTICONCEPTIVOS)
- NEFROPATIA CRONICA

C A P I T U L O I I G E N E R A L I D A D E S

PROCEDIMIENTOS UTILIZADOS

1. Filtración en gel

La cromatografía tiene gran importancia como procedimiento analítico a utilizar cuando las sustancias por analizar deben ser separadas de otras antes de someterse a su determinación cuantitativa. El principio general de la separación cromatográfica de una mezcla de sustancias es el de su distribución o partición entre dos fases. Una de estas fases, llamada "fase estacionaria", es inmóvil y su superficie grande; la otra en cambio es móvil y atraviesa la fase estacionaria.

La fase estacionaria generalmente es sólida (adsorbente), pero puede ser líquida, en cambio como fase móvil se utilizan líquidos o gases no miscibles con la fase estacionaria. El flujo de la fase móvil a través de la fase estacionaria logra separar las sustancias que fueron retenidas de acuerdo a sus características físico-químicas.

En función de los distintos tipos de fuerza que actúan entre las sustancias por separar y la fase estacionaria, los procedimientos cromatográficos se dividen en cromatografía de adsorción, de intercambio iónico, de distribución, de filtración en gel y cromatografía de afinidad (35).

La filtración en gel es un procedimiento cromatográfico introducido por Porath y Flodin en 1959 (36), en él la separación se basa en una propiedad relativamente nueva entre los métodos de fraccionamiento: la diferencia de las dimensiones moleculares que poseen los componentes del análisis. La cromatografía en gel utiliza como fase estacionaria un gel sin cargas, que típicamente está formado por polímeros de glucosa o destranas, macromoléculas que se caracterizan por presentar enlaces entrecruzados (cross-linked) que da un armazón tridimensional que los hace insolubles,

y en lugar de disolverse en el líquido, se hinchan, tomando gran cantidad de disolvente.

Así la cromatografía en gel, también llamada cromatografía de exclusión, separa a las sustancias de acuerdo a su peso molecular, las moléculas grandes emergen primero, mientras las más pequeñas permanecen por más tiempo en la fase estacionaria (Fig. 6). Para muchos grupos de sustancias, se encuentra una correlación estrecha entre el peso molecular o tamaño de la molécula y el comportamiento de elución, y para fines prácticos, el volumen de elución está determinado enteramente por el peso molecular, lo cual se explica en base al modelo introducido por Flodin, según el cual el coeficiente de partición del soluto entre la fase del gel y la fase líquida está regido por efectos estéricos exclusivamente.

El autor hace notar que la matriz del gel ocupa gran espacio en las cercanías de los enlaces cruzados. Así las moléculas grandes no pueden penetrar dentro de estas regiones, mientras que las pequeñas pueden aproximarse y penetran a los espacios entre las cadenas de la matriz del gel, por lo cual estarán igualmente distribuidas entre el líquido libre y el líquido en el gel. Las moléculas grandes no tienen acceso dentro del gel y el coeficiente de partición se desplaza en favor del líquido que se encuentra afuera de las partículas del gel. Esto induce a que las moléculas grandes salgan del medio cromatográfico antes que las moléculas pequeñas (37).

Desde su introducción, la cromatografía en gel ha tenido gran aceptación, tal vez debido a que es una técnica fácil de realizar, poco afectada por factores como la temperatura o el eluyente y útil para fraccionar compuestos muy lábiles, con poco riesgo de que sean desnaturalizados durante el proceso. Dependiendo del tipo de gel empleado, se pueden fraccionar sustancias con peso molecular por abajo de 700 daltons (d), hasta

aquellas con valores superiores a 40×10^4 d. Además, los geles pueden ser utilizados una y otra vez, ya que generalmente son muy estables y no necesitan regeneración, un mismo gel puede ser usado varias veces sin que se alteren sus propiedades cromatográficas, siempre y cuando se evite su contaminación con bacterias u hongos.

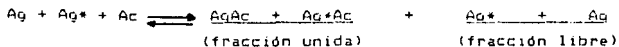
Por todas las características anteriormente expuestas, la cromatografía en gel es uno de los métodos de elección para el fraccionamiento de proteínas y el seleccionado para separar las diversas formas moleculares de la PRL en el presente trabajo.

2. Radioinmunoanálisis (RIA)

Para poder identificar y cuantificar la PRL en los sueros de las pacientes a estudiar y en las fracciones resultantes de la filtración en gel, se utilizó el radioinmunoanálisis (RIA) procedimiento introducido por Yalow y Berson en 1960. Esta metodología significó un avance muy importante en las mediciones de las hormonas, y junto con otras técnicas como las inmunocitoquímicas y los estudios de receptores han revolucionado a la Endocrinología.

En el caso de las determinaciones hormonales y en relación a los ensayos biológicos clásicos, con el RIA se ganó sensibilidad, especificidad y precisión, además de ser un método de fácil realización y muy confiable (38).

Este procedimiento se basa en la competencia que se establece entre dos antígenos iguales (uno "frío" y otro radioactivo) por unirse a una cantidad limitada de anticuerpo. La reacción es la siguiente:



El antígeno frío (Ag) es la hormona que se desea medir, en la muestra por analizar o en las soluciones estándar de dicha hormona, mientras que el antígeno radiactivo (Ag^{*}) es una determinada concentración de la misma hormona, pero marcada generalmente con ^{125}I , siendo Ac un anticuerpo elaborado específicamente contra la hormona que se va a determinar.

La reacción se lleva a cabo incubando el sistema a $25 - 37^{\circ}\text{C}$ durante el tiempo suficiente para alcanzar el equilibrio de la reacción, siendo necesario después de la incubación efectuar la separación de las dos fracciones del radioinmunoanálisis (fracción libre y unida al anticuerpo) por algún procedimiento bioquímico adecuado, a fin de conocer la cantidad de antígeno radiactivo que se ha unido al anticuerpo y que será inversamente proporcional a la concentración de hormona presente en el problema.

Después de la separación, se evalúa la cantidad de radioactividad en una o en ambas fracciones del ensayo, utilizando un detector de radiaciones para así determinar el grado de desplazamiento de la hormona radiactiva por la hormona fría en su unión con el Ac finalmente el porcentaje de unión de la hormona marcada en cada muestra (MU) se relaciona a una curva estándar elaborada con concentraciones conocidas de la hormona por medir.

En la actualidad, el RIA es el método de elección para la determinación cuantitativa de PRL y ha sido el instrumento diagnóstico por el cual se han determinado y descrito en gran número de reportes, los niveles de PRL en situaciones clínicas normales y patológicas (12).

De esta manera, los métodos de filtración en gel y el RIA en conjunto constituyen la mejor herramienta para el estudio de la composición cualitativa y cuantitativa de PRL en las diversas situaciones clínicas, razón por la cual fueron los procedimientos

seleccionados.

3. Cromatografía por afinidad

Otro método de purificación utilizado en el presente trabajo fue la cromatografía por afinidad, que es una técnica que permite purificar las biomoléculas, en base a su función biológica o a su estructura química individual. Por este método se aprovechan las propiedades de las sustancias en una reacción altamente específica en la que los participantes interaccionan entre sí, por la afinidad que existe entre ellos, formando un complejo estable, que se puede disociar una vez que han sido eliminadas del medio las sustancias contaminantes, obteniendo así la sustancia afín en forma pura.

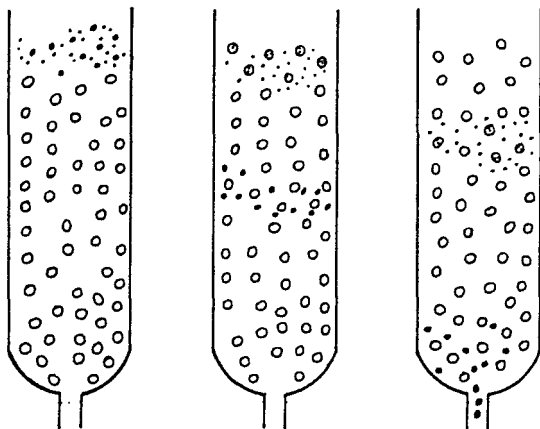
La primera aplicación de la cromatografía por afinidad, fue la adsorción selectiva de la amilasa en el almidón insoluble, en 1910. Después en 1937, Axen, Porath y Ernback (39) reportaron que las moléculas conteniendo grupos amino primarios podrían ser acopladas a matrices de polisacáridos activados por bromuro de cianuro (CNBr); ésto representó el inicio de la cromatografía por afinidad como una técnica de separación, que puede ser empleada como un procedimiento de rutina para el análisis bioquímico de gran cantidad de compuestos biológicamente importantes (40).

El principio básico de este tipo de cromatografía es inmovilizar uno de los componentes del sistema (ligando) a un material o soporte poroso e insoluble (matriz), ya unidos ambos forman una resina de afinidad (Fig. 7) que puede emplearse para adsorber selectivamente del medio acuoso al componente con el que interactúa el ligando específicamente (40).

Para purificar una sustancia por este método generalmente se utiliza una columna con la resina de afinidad seleccionada y se carga con la solución acuosa que contiene el compuesto por

aislar. La sustancia por ligar se retiene selectivamente en la columna formando un complejo con el ligando, mientras que las sustancias contaminantes son eluidas y se eliminan totalmente por medio de un lavado continuo con un eluyente adecuado (Fig. 8). Enseguida se procede a romper el complejo formado cambiando las condiciones iniciales del sistema cromatográfico, lo cual puede hacerse por medio de un cambio de pH o de la fuerza iónica del amortiguador usado en la cromatografía, o también usando agentes de desnaturalización reversible, como la urea o el cloruro de guanidina; entonces la sustancia unida a la columna de afinidad es eluida en forma pura.

La purificación que se logra es frecuentemente del orden de varios miles de veces y las recuperaciones del material activo son generalmente muy altas. Así la cromatografía por afinidad tiene un efecto de concentración que permite procesar grandes volúmenes con recuperaciones muy elevadas. La gran selectividad de las separaciones deriva de la especificidad natural de las biomoléculas interactuantes. Debido a esto, la cromatografía por afinidad se ha empleado para separar formas nativas de formas desnaturalizadas de la misma proteína, para purificar compuestos de mezclas biológicas complejas y remover pequeñas cantidades de material biológico, eliminando grandes cantidades de sustancias contaminantes (41). Por estas razones, se eligió este método como el más adecuado para separar la fracción glucosilada de "little" prolactina (G-PRL) de la fracción no glucosilada (NG-PRL) mediante la unión específica de la G-PRL a una columna de Sepharosa-Concanavalina-A, lectina perteneciente a un notable grupo de proteínas que poseen la habilidad de reaccionar reversiblemente, por afinidad, con residuos de azúcares específicos como manosa y glucosa (Fig. 9).



O PARTICULAS DE SEPHADEX

● MOLECULAS GRANDES

• MOLECULAS PEQUEÑAS

Figura 6.- Representación del principio de la filtración en gel.

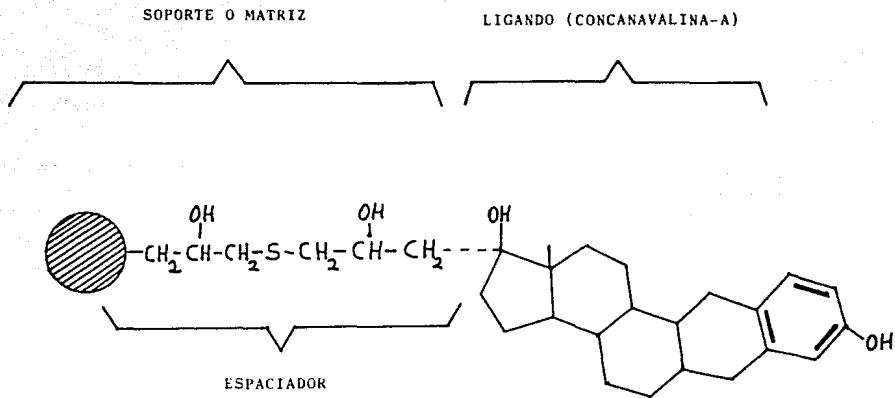
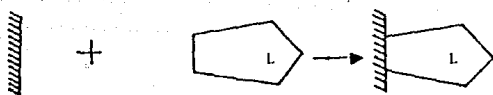
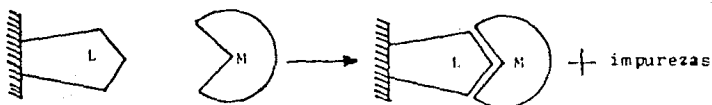


Figura 7.- Esquematación de una resina de afinidad



INMOVILIZACION DEL LIGANDO (L)



RETENCION DE LA MUESTRA (M) POR EL LIGANDO



ROMPIMIENTO DEL COMPLEJO CON OBTENCION DE LA MUESTRA PURA

Figura 8.- Principio de la cromatografía por afinidad.

CAPITULO III

MATERIAL Y METODOS

1. REACTIVOS

- Sephadex G-100. Tamaño de partículas: 40 - 120 μ . Volumen de lecho por gramo de gel seco: 15 -20 ml.
- Sepharosa-Concanavalina-4, suministrada como una suspensión de 100 ml de gel sedimentado en una solución de buffer de acetatos (0.1M, pH6) conteniendo NaCl 1M, CaCl₂ 1mM, MgCl₂ 1mM, MnCl₂ 1mM y Merthiolate (0.02%) adicionado como conservador. El gel deberá guardarse a 4 - 8°C.
- Buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4
- PBS pH 7.4 (buffer de fosfatos salino)
- PBS-BSA 0.1% pH 7.4 (buffer de fosfatos salino con albúmina bovina)
Hidróxido de amonio
Acido acético
Acetato trisódico
K₂HPO₄·3H₂O
KH₂PO₄
NaCl
CaCl₂
MgCl₂
BSA (albúmina sérica bovina)

Marcadores de peso molecular para filtración en gel, de Sigma Chemical Company : Citocromo C (CYTOCHROME C, horse heart, PM 12 400) 10 mg/vial. Anhidrasa carbónica (CARBONIC ANHYDRASE, bovine erythrocytes, PM 29 000) 15 mg/vial. Ovoalbúmina (OVOALBUMIN, egg, PM 45 000) 25 mg/vial. Albúmina bovina (ALBUMIN, bovine serum, PM 66 000) 50 mg/vial. Azul Dextran (BLUE DEXTRAN, PM 2'000,000) 50 mg/vial.

Los siguientes reactivos para el radioinmunoanálisis de prolactina, de la casa CIS-SORIN (Prolactin radioimmunoassay kit): 125 I-PRL liofilizada, con radioactividad aproximada de 1.5 μ Ci. Estándar de prolactina (7 viales con las siguientes concentraciones de prolactina, en ng/ml: 0, 3.3, 6.6, 13.2, 33, 66 y 132).

Antisuero de conejo para prolactina humana: contiene antisuero específico para prolactina humana, proteínas, conservadores y un colorante azul.

Reactivo inmunoprecipitante: contiene buffer de fosfatos, polietilen glicol, segundo anticuerpo (anti gammaglobulina de conejo) y conservadores.

Buffer de fosfatos 0.1 M pH 7.4: contiene KH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , $2\text{H}_2\text{O}$, proteínas y conservadores.

Sueros control: contienen suero humano con una concentración conocida de prolactina y conservadores.

2. Preparación de las soluciones amortiguadoras empleadas:

Buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 22.823 g

Aforar a un litro con agua destilada

KH_2PO_4 13.609 g

Aforar a un litro con agua destilada

A un litro de la solución de K_2HPO_4 0.1M agregar un volumen suficiente de KH_2PO_4 0.1 M para obtener el pH deseado. Adicionar

1 g de azida de sodio por cada litro de solución preparada, como conservador.

Buffer de fosfatos salino 0.1M pH 7.4 (PBS)

A un litro de buffer de fosfatos 0.1M pH 7.4 adicionarle 9 g de NaCl y medir el pH, si es necesario ajustar nuevamente el pH de la solución con KH_2PO_4 0.1M.

Buffer de fosfatos salino, con albúmina bovina 0.1% (PBS-BSA 0.1%), pH 7.4

K_2HPO_4 0.1M	1 litro
NaCl	9 g
BSA	1 g
Azida de sodio	1 g

Ajustar el pH de la solución con KH_2PO_4 0.1M (aproximadamente 77 ml).

Buffer de acetatos 0.1 M pH 7.0 (adicionado de calcio, magnesio y sodio)

Acido acético	2.855 ml
Aforar a 500 ml con agua destilada	
Acetato trisódico	6.8 g
Cloruro de calcio	0.0735 g
Cloruro de magnesio	0.0560 g
Cloruro de sodio	4.500 g

Aforar a 500 ml con agua destilada. A esta solución ajustarle el pH con la solución de ácido acético 0.1M hasta el valor deseado. Agregar merthiolate al 0.01% (0.05 g. por cada 500 ml de buffer).

Solución de hidróxido de amonio 1M

NH₄OH

139.60 ml

Aforar a un litro con agua destilada.

3. Material Clínico

Se seleccionaron un total de 37 mujeres para la realización del presente trabajo. Ocho de ellas fueron mujeres normales, con ciclos menstruales regulares ovulatorios, cuyas edades fluctuaban entre los 24-36 años y que tenían una concentración normal de prolactina (<20 ng/ml). A todas ellas se les tomaron muestras de sangre venosa después de 12 horas de ayuno, a las 8.0 horas y con 15 minutos de reposo previo a la toma de la muestra (condiciones basales), en los días 12-14 del ciclo menstrual (Tabla I). Otras 5 mujeres fueron pacientes con embarazo normal, a las que se les tomaron muestras de sangre cada 15 días durante los dos últimos trimestres de embarazo y durante el periodo de lactancia, además, en algunas de estas mujeres se tomaron muestras de líquido amniótico via transabdominal en las semanas 37 a 39 por prescripción ginecológica específica. Estas muestras también se cromatografiaron en gel para conocer las formas moleculares de PRL presentes en el L.A. y comparar con las encontradas en suero.

Finalmente, se estudió un grupo de mujeres con alteraciones en la secreción de prolactina comprendiendo: 8 mujeres normoprolactinémicas que presentaban galactorrea (Tabla II); 16 mujeres con hiperprolactinemia y manifestaciones clínicas de sólo galactorrea (n = 4), amenorrea-galactorrea (n = 4) y mujeres portadoras de un prolactinoma (n = 8) (Tablas III y IV). A este grupo se le tomaron muestras de sangre en condiciones basales. Una vez obtenidos los sueros, se separo una alícuota de cada una de las muestras, para determinar la concentración basal de PRL por RIA y el resto del suero se refrigeró de inmediato a 4-8°C hasta realizar el análisis cromatográfico que se llevó a cabo en todos los casos, dentro de los primeros 5 días a partir de la

toma de la muestra. Esto con el fin de evitar la congelación y el almacenamiento prolongado de los sueros y de esta manera eliminar el riesgo de un posible efecto de estos factores, sobre la composición molecular de la PRL.

4. Procedimiento

Filtración en gel

Para la cromatografía se utilizó una columna de vidrio de 60 x 1 cm empacada con Sephadex G-100 (Pharmacia Fine Chemicals) y, acoplada a un colector de fracciones LKB. La columna fue equilibrada durante 24-48 horas a 4°C con un amortiguador de fosfatos 0.1 M pH 7.4, adicionado de NaCl 0.15 M y azida de sodio 0.1% (PBS). El mismo amortiguador fue utilizado para llevar a cabo la elución de la columna a una velocidad de 7.5 ml/h. La calibración de la columna se efectuó con los marcadores de peso molecular de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo; U.S.A.), incluyendo azul dextran ("Vo" del sistema), albúmina bovina, ovoalbúmina, anhidrasa carbónica, citocromo C, además ¹²⁵I-PRL, PRL pura y ¹²⁵I-INA ("Vt" del sistema), con el fin de obtener la curva de calibración de peso molecular. Muestras de 4 ml de cada uno de los sueros de las mujeres no embarazadas, se concentraron en filtros Amicon B-15 (W.R. Grace Co. Danvers MA, U.S.A.) hasta obtener un volumen de 1 ml, y este se aplicó a la columna. Los sueros de las mujeres embarazadas se aplicaron directamente (1 ml de la muestra no concentrada). La elución de las muestras se hizo con el amortiguador de fosfatos y se colectaron 60 fracciones de 1.0 ml, de las cuales se tomaron alícuotas de 200 μ l para el radioinmunoanálisis de PRL que se realizó posteriormente de acuerdo a la metodología establecida en el laboratorio, la cual ha sido validada previamente (42). La recuperación de ¹²⁵I-PRL en la cromatografía varió entre 94-98% en relación a la actividad total que se aplicó a la columna.

Curva de Calibración de Peso Molecular

Una vez estabilizada la columna a usar en la cromatografía, se procede a calibrarla con los marcadores de peso molecular. Para ésto se aplica una muestra de 1 ml de cada uno de ellos (25-50 ng), individualmente primero y en una mezcla después, eluyendo con PBS y colectándose en cada ocasión un total de 60 tubos con 1 ml de eluado cada uno.

El primer marcador que se aplica es el azul dextran, ya que por su alto peso molecular nos sirve para determinar el volumen de exclusión de la columna ("Vo"). Este marcador se aplica individualmente y se determina su volumen de elución (Ve).

Una vez obtenido el "Vo" del sistema, se procede a determinar el Ve para cada una de las proteínas elegidas (albúmina, ovoalbúmina, etc.) midiendo por espectrofotometria (en el caso de las proteínas y marcadores no radioactivos) el volumen colectado desde el punto de aplicación de la muestra, hasta el tubo donde aparece el pico de absorción. Esto se realiza leyendo la absorbancia de cada uno de los tubos colectados a 280 nm, ya que las proteínas absorben fuertemente en la región UV del espectro, a esa longitud de onda, por su contenido de los aminoácidos tirosina y triptofano, lo que permite un método de ensayo sensible y no destructivo (43). El pico de la proteína se encontrará en el tubo en que se presente la máxima D.O.

El Ve para los marcadores radioactivos ^{125}I -PRL y ^{125}I Na se determina midiendo la radioactividad de los tubos eluidos en un contador de radiaciones gama, y el Ve estará dado por el tubo donde se presente la máxima radioactividad.

Una vez obtenido el Ve de los diferentes marcadores se procede a calcular el volumen relativo de elución, que está dado por la relación V_e/V_o . Para obtener la curva estándar de pesos

moleculares se utiliza papel semilog, graficando el logaritmo del peso molecular de cada uno de los marcadores en el eje de las "y" contra su respectivo volumen relativo de elución en el eje de las "x", obteniéndose así una relación lineal. En esta curva se pueden interpolar los datos de V_e/V_o de las diferentes formas moleculares de la PRL para conocer su PM aproximado.

El volumen total de elución del sistema (" V_t ") está dado por el V_e del ^{125}I Na. A partir del V_o y del V_t del sistema y conociendo el V_e de cada una de las moléculas aisladas en la cromatografía, se calcula el coeficiente de partición de cada una de ellas empleando la siguiente fórmula:

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

Este valor (K_{av}) es una constante que se utiliza para caracterizar las moléculas en la filtración en gel.

Radioinmunoanálisis de Prolactina

El principio del ensayo ya se mencionó anteriormente. Se realizó por duplicado en alícuotas de 100 μl de cada uno de los sueros, así como en 200 μl de cada una de las fracciones eluidas de la columna, utilizando estuches diagnósticos de International CIS-Sorin (Francia). Antes de realizar el análisis, tanto ^{125}I -PRL como el antisuero fueron diluidos 1:2 para incrementar la sensibilidad del método, que en estas condiciones fue de 0.05 ng/tubo con un coeficiente de variación (CV) intraensayo de 5-8% e interensayo de 6-10%.

Los tubos para el ensayo se numeran progresivamente colocando en los dos primeros (tubos 1 y 2) las llamadas "cuentas totales" (CT), que corresponden a la cantidad de ^{125}I -PRL que se añade a los tubos del sistema; luego en los tubos 3 y 4 se pone ^{125}I -PRL

más el anticuerpo (Ac) lo que nos permite conocer la cantidad de hormona marcada que puede ser unida por la cantidad de anticuerpo puesta en el sistema, cuando no existe competencia; este control se conoce como Bo o porcentaje de unión de la hormona marcada (%U) y corresponde al estándar de concentración "0" de PRL.

En los tubos 5 y 6 no se agrega Ac y por lo tanto corresponde al blanco de reactivos del sistema (Bk) y nos da la unión inespecífica de la hormona marcada; enseguida se colocan los tubos conteniendo los puntos de la curva de calibración (por duplicado o triplicado) y después los sueros control y finalmente las muestras problema de acuerdo al siguiente esquema:

RADIODIINMUNOANALISIS

Tubos Nº	Estándares	Muestras	¹²⁵ I-PRL	Antisuero	
CT (1 y 2)	-----	-----	200	-----	Mezclar e incubar 18 horas a 18-25°C todos los tubos
Bo (3 y 4)	-----	-----	200	200	
Bk (5 y 6)	-----	-----	200	-----	
Estándares (7-20)	200	-----	200	200	
Controles y problemas 21,22 etc.	-----	200	200	200	

Los volúmenes están expresados en microlitros. Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente para la realización del ensayo.

En la distribución de los reactivos se recomienda siempre seguir la misma secuencia: primero los estándares o los sueros problema (P), segundo la hormona marcada, se agita suavemente, y después

el anticuerpo. Esto con el fin de que se mezclen perfectamente los dos antígenos (frío y radioactivo) antes de reaccionar con el anticuerpo.

Después de la incubación de 18 hs. a 18-25°C, se adiciona 1 ml del reactivo inmunoprecipitante a todos los tubos excepto a los marcados como CT. (previa homogeneización de la suspensión). Después se agitan manualmente los tubos y se incuban nuevamente por un período de 15 minutos a temperatura ambiente y enseguida se centrifugan (excluyendo los de CT), a 1,500 0 2,000 g durante 15 minutos. Se descarta el sobrenadante y se invierten los tubos sobre un papel absorbente con objeto de quitar el exceso de reactivo que pudiera quedar en las paredes del tubo. Finalmente, se mide la radioactividad del precipitado (fracción unida) con un detector de partículas gama (cpm).

Cálculo de Resultados

Para cada pareja de tubos se calculan las cpm promedio, después de restarles las cuentas del blanco de reactivos (Bk) y se evalúa la capacidad de unión del sistema mediante la siguiente fórmula:

$$\% U = \frac{\text{cpm } B_0 \text{ (st "D")}}{\text{cpm CT}} \times 100$$

Después las cpm netas de cada estándar o problema se expresan como un porcentaje del B₀ (st "D") para calcular el por ciento de unión de la hormona marcada a cada uno de ellos;

$$\% U \text{ (st o P)} = \frac{\text{cpm st o P}}{\text{cpm } B_0} \times 100$$

La curva de calibración se obtiene graficando el porcentaje de unión (B/B₀) de cada uno de los estándares, contra su concentración de PRL, en papel doble logarítmico (logit-log). Después en esta curva se interpola el % de unión de los problemas

para conocer su concentración de PRL, la cual se expresa en ng de PRL/ml de suero.

CROMATOGRAFIA POR AFINIDAD CON SEPHAROSA-CONCANAVALLINA-A

Se utilizó un sistema de elución no competitivo para cromatografía por afinidad para disociar la prolactina glucosilada de la columna de Sepharosa-Concanavalina-A, basado en el método de Matsuura y Chen (44) empleando NH_4OH 1M. Una columna con un lecho 2 x 0.5 cm, empacada con Sepharosa 4B-Concanavalina-A (Pharmacia Fine Chemical, Uppsala, Sweden), fue equilibrada con buffer de acetatos 0.1M pH 7.0, adicionado de NaCl , MgCl_2 y CaCl_2 . A esta columna se le aplicó una alícuota de las fracciones 35-43 obtenidas en la cromatografía por filtración en gel, en las cuales se esperaba encontrar la fracción glucosilada de la PRL. La muestra se aplicó de la siguiente manera: se agregaron a la columna 0.8 ml de las fracciones mencionadas, permitiendo que el solvente escurriera completamente, cerrando la llave de paso una vez logrado esto. La columna se incubó por 24 horas a 4°C y después de este periodo de incubación se lavó 6 veces con alícuotas de 0.8 ml del buffer de acetatos ya mencionados, recibiendo las alícuotas en tubos marcados del 1 al 6.

Una vez terminados los lavados se agregan 0.8 ml de solución de NH_4OH 1M colectándose este volumen en el tubo N° 7; se incuba de nuevo la columna a 4°C por 4 horas para permitir que actúe la solución alcalina y desprege la fracción unida a la columna a fin de que pueda ser eluida; al término de la incubación, se agregan otros 0.8 ml de la solución de NH_4OH 1M, dejando pasar dicho volumen a través de la columna y colectándolo en el tubo N° 8. Esta alícuota se utiliza para la cuantificación de G-PRL neutralizando de inmediato con buffer de acetatos 0.1M; todas las fracciones se someten a la cuantificación de PRL por el método de

radioinmunoanálisis.

Para evaluar la capacidad de afinidad de la Sepharosa-Con-A, así como para confirmar la efectividad de la técnica empleada, se corrió una columna control con ^{125}I -TSH (hormona de naturaleza glucoprotéica) a la par que la columna con la muestra problema, de la siguiente manera: se aplicaron 0.6 ml del buffer de acetatos 0.1M y 0.2 ml de TSH marcada a la columna control, y se continuó con todo el procedimiento empleado para la muestra problema hasta la obtención del tubo N° 8 y su neutralización con el buffer de acetatos 0.1M. Esta alícuota se llevó a un detector de radiaciones gama para cuantificar la radioactividad recuperada en la cromatografía y que es equivalente a la cantidad de proteína glucosilada unida por la Sepharosa-Con-A y eluida por el NH_4OH 1M.

TABLA I

**DATOS CLINICOS Y HORMONALES DE 4 PACIENTES NORMALES
CON CICLOS OVULATORIOS**

CASO	CICLOS	EDAD (años)	PRL (ng/ml)	P ₄ (ng/ml)	FFT
1	28 x 3	28	10.5	7.6	NORMALES
2	30 x 4	24	9.7	6.8	NORMALES
3	29 x 3	32	6.2	8.4	NORMALES
4	30 x 3	26	7.2	6.6	NORMALES

TABLA II

DATOS CLINICOS DE PACIENTES NORMOPROLACTINEMICAS CON GALACTORREA.

PACIENTE	EDAD	RITMO		EVALUACION (años)	Rx:	PRL ng/ml
1	28	30 x 4	GALACTORREA	0.5	NORMAL	10.5
2	23	36 x 3	GALACTORREA-ANOVULACION	2	NORMAL	19.2
3	33	26 x 4	GALACTORREA BILATERAL ESTERILIDAD 2a.	3	-	12.0
4	30	30-40 x 3	GALACTORREA ESTERILIDAD 1a.	1.5	NORMAL	17.2
5	19	30 x 4	GALACTORREA-DISMENORREA MASTOPATIA FIBROQUISTICA	2	NORMAL	19.6
6	26	28 x 3	GALACTORREA-ESTERILIDAD 2a.	1	-	7.5
7	22	28 x 3	GALACTORREA-ESTERILIDAD 1a.	3	NORMAL	20.2
8	21	30 x 4	GALACTORREA-HIRSUTISMO	1.5	-	18

TABLA III

CLASIFICACION DE LAS PACIENTES CON PATOLOGIA EN FUNCION DE SU CONCENTRACION DE PRL Y SUS DATOS CLINICOS.

NORMOPROLACTINEMICAS		GALACTORREA	8
MUJERES HIPERPROLACTINEMICAS (n=16)			
ADENOMAS HIPOFISARIOS	8	AMENORREA	3
		AMENORREA-GALACTORREA	3
		GALACTORREA	2
HIPERPROLACTINEMIA (NO TUMORAL)	8	AMENORREA GALACTORREA	4
		GALACTORREA	4

TABLA IV

HALLAZGOS CLINICOS EN LAS PACIENTES CON HIPERPROLACTINEMIA

PACIENTE	EDAD	SINTOMAS	RADIOLOGICO (TAC)	S. QUIASMATICO	PRL ng/ml
1	38	GALACTORREA	NORMAL	-	65
2	34	GALACTORREA	NORMAL	-	56
3	32	GALACTORREA- OPSONORREA	NORMAL	-	46
4	36	GALACTORREA	NORMAL	-	41
5	26	SAG	NORMAL	-	94
6	28	SAG	NORMAL	-	42
7	37	SAG	NORMAL	-	36
8	35	SAG	NORMAL	-	100
9	34	AMENORREA	TUMOR HIPOFISARIO	POSITIVO	166
10	36	AMENORREA	MACROADENOMA	POSITIVO	446
11	33	AMENORREA	TUMOR HIPOFISARIO	NEGATIVO	134
12	25	SAG-HIPERTIROIDISMO	TUMOR HIPOFISARIO	NEGATIVO	80
13	22	SAG	ADENOMA INTRACELAR	NEGATIVO	77
14	38	SAG	TUMOR HIPOFISARIO	NEGATIVO	116
15	31	GALACTORREA	TUMOR HIPOFISARIO	NEGATIVO	118
16	23	GALACTORREA	MACROADENOMA	POSITIVO	350

SAG: Síndrome de amenorrea - galactorrea; FAC: tomografía axial computada.

C A P I T U L O I V
R E S U L T A D O S

1. CICLO MENSTRUAL NORMAL

Los resultados del estudio realizado muestran que el perfil cromatográfico de la PRL fue semejante en los sueros de las 4 mujeres normales con ciclos regulares ovulatorios que se analizaron individualmente. La figura 11 representa los perfiles obtenidos en los casos 1 y 2; en ellos se pueden observar las tres principales formas moleculares que se han descrito para la PRL: "big-big" (Pico I) eluyendo con el V_0 del sistema y "big" PRL (Pico II) entre la BSA y la ovalbúmina, en una proporción relativamente elevada. Sin embargo "little" PRL fue, cuantitativamente, la más importante (Pico IV) coincidiendo con el estándar de ^{125}I PRL. Se detectaron además dos moléculas más pequeñas, una aproximadamente de 16 kd (Pico V) que eluyó después del estándar de ^{125}I PRL y antes del citocromo C y la otra antes del V_t del sistema (Pico VI). Cabe resaltar que en la zona anterior a "little" PRL se obtuvo una forma molecular no descrita en estudios cromatográficos previos, la cual eluyó antes del estándar de ^{125}I PRL y poco después del sitio de elución de la anhidrasa carbónica (Pico III), correspondiendo a una molécula de un peso molecular de 26 kd aproximadamente.

En la figura 12 se ilustra el perfil cromatográfico de los sueros de otras dos mujeres normales (casos 3 y 4), aparecen las mismas seis variedades moleculares señaladas en la figura 11 aunque en una proporción diferente; los dos picos en el área de "little" PRL (III y IV) son los más importantes cuantitativamente, uno corresponde a la tradicional "little" PRL, molécula de 22 kd que eluye con el estándar de ^{125}I PRL, en las fracciones 39-42 aproximadamente (Pico IV) y la otra, la molécula de 26 kd, que en estos dos casos, fue la predominante (Pico III). Por otra parte, el análisis cromatográfico del "pool" de los sueros de otras 4 mujeres normales (Fig. 13), resultó prácticamente idéntico al de los casos 3 y 4 observándose claramente las seis áreas de inmunoreactividad a PRL correspondientes a las formas moleculares

ya mencionadas.

Dado que el pico adicional en el área de "little" PRL (Pico III) se encontró en todos los perfiles cromatográficos de los sueros de las mujeres estudiadas y además fue cuantitativamente muy importante, se decidió recromatografiarlo para descartar la posibilidad de que se tratara de la misma "little" PRL. Para esto se hizo un "pool" con las fracciones 34-38 de las cromatografías anteriores y se recibió la cromatografía en Sephadex G-100; de esta manera se pudo obtener un solo pico (Fig. 14) que eluyó antes del estándar de ¹²⁵I-PRL correspondiendo a una molécula de 26 Kd. siendo así diferente de la "little" PRL, que tiene un PM aproximado de 22 Kd.

En la Tabla V se proporcionan los datos fisicoquímicos que permitieron identificar y clasificar a cada una de las formas moleculares de la PRL en los perfiles cromatográficos realizados y son; 1) el volumen de elución (Ve), 2) su coeficiente de partición, que es específico para cada una de las moléculas (Kav) y, 3) el peso molecular obtenido para cada una de ellas (PM). Por otra parte, la proporción de cada molécula en las pacientes estudiadas se muestran en la tabla VI y se expresa como un porcentaje de la actividad total de PRL, para así determinar su relación cuantitativa. Como puede apreciarse, el área central correspondiente a la llamada PRL monomérica es la de mayor importancia, ya que comprende la suma de los porcentajes de las moléculas de 26 y 22 Kd. Recientemente se ha reportado en estudios de electroforesis, la presencia de una molécula glucosilada de la "little" PRL (34, 45) tal molécula tiene un peso molecular aproximado de 25 Kd (G-PRL); esto nos inclinó a pensar que la molécula del pico III pudiera corresponder a este tipo de PRL, por lo que se decidió pasar los sueros por una columna de afinidad con Sepharosa-Concavalina-A a fin de probar si la molécula de 26 Kd está glucosilada, en tal caso quedaría unida a la columna; los resultados obtenidos se muestran en la

tabla VII.

II. EMBARAZO

En lo que respecta a los resultados del análisis cromatográfico de las muestras correspondientes al periodo de embarazo, se obtuvieron perfiles cromatográficos tanto de líquido amniótico (LA) como de suero materno a diferentes edades gestacionales.

a) Estudio en líquido amniótico

Los resultados representativos de los perfiles de LA se muestran en las figuras 15, 16 y 17. En la figura 15 se observa el análisis del LA en un embarazo normal de 37 semanas y muestra el predominio de "big" PRL, la forma dimérica de la hormona con un peso molecular aproximado de 45 Kd, que eluyó en un volumen similar al de la ovoalbúmina (Ovo) y además la fracción correspondiente a la probable G-PRL que eluyó poco después de AC y antes del estándar de 125 I-PRL. Al avanzar el embarazo, en la semana 38 (Fig. 16), se encuentra también "big" PRL pero la zona correspondiente a G-PRL es más evidente y además se observa el pico de "little" PRL que no era visible en el perfil anterior. Casi al final del embarazo, en la semana 39, el perfil cromatográfico cambia completamente (Fig. 17) con predominio de las moléculas pequeñas de 16 y 8 Kd con marcada disminución de las moléculas grandes y ausencia de la zona correspondiente a "little" PRL incluyendo la G-PRL.

b) Estudio cromatográfico de los sueros

En cuanto al perfil cromatográfico de los sueros de las mujeres embarazadas, se muestran algunos de los resultados representativos del grupo en las figuras 18, 19 y 20. En la figura 18 se aprecia que en la semana 38 de la gestación se

encuentran tres formas moleculares big PRL de aproximadamente 45 Kd, la G-PRL de 26 Kd y además un pico cuantitativamente importante correspondiente a "little" PRL. Al progresar el embarazo se observan algunos cambios importantes del perfil cromatográfico, así en la semana 34 se registra un incremento en la actividad de la "big" PRL que eluye con la BSA y aumenta la inmureactividad en la zona correspondiente a G-PRL mientras que la proporción de "little" PRL disminuye (Fig. 19), también se encuentra un pico de la molécula de 16 Kd que no se observaba en la figura anterior. Al final del embarazo, en la semana 39 (Fig. 20) hay un recambio de las formas moleculares; disminuyen notablemente las formas grandes predominando la G-PRL y la "little" PRL, a la vez que desaparece la molécula de 16 Kd. Esto es diferente de lo que ocurre en el perfil cromatográfico del LA a la misma semana de la gestación en el que sólo se observan moléculas muy pequeñas (Fig. 17). En el embarazo asociado a patología, puede haber cambios de las formas moléculares de la PRL, así la figura 21 muestra el perfil cromatográfico de una paciente diabética, con 39 semanas de embarazo y como se observa los resultados son diferentes a las de la figura 20 correspondientes al suero de una mujer embarazada sana. En este caso particular de la paciente con Diabetes mellitus, la mayor parte de la inmunoreactividad se encontró en la G-PRL, no se pudo observar el pico de la "little" PRL (22 Kd) y sólo tuvo muy ligera inmunoreactividad en los picos correspondientes a "big-big" y a "big" PRL, así como en las moléculas pequeñas de 16 y 8 Kd.

III. POSTPARTO Y LACTANCIA

En las figuras 23 y 24 se muestra una secuencia de los cambios que ocurren en el perfil cromatográfico del suero de la misma paciente de la figura 22 (40 semanas de embarazo) como consecuencias del parto y la lactancia. En el suero tomado a las 24 horas del puerperio fisiológico (Fig. 23) son evidentes

algunos cambios: el área predominante sigue siendo la de "little" PRL (22 Kd) pero el pico es más definido y sólo se aprecian pequeños picos en el área de "big-big" y "big" PRL, y la molécula de 16 Kd se encuentra reducida a un hombro que se localiza en la zona de los pequeños péptidos. Al iniciarse la lactancia (Fig. 24) el perfil experimenta un nuevo cambio: en la zona de "little" PRL aparece la G-PRL en una proporción similar a la "little" PRL de tal manera que predominan ambos monómeros, pero llama la atención la aparición de un pico muy marcado de "big" PRL eluido en las fracciones 30-32 entre la BSA y la Ovo.

En la figura 25 se representan los perfiles cromatográficos de los sueros de 3 mujeres en diferentes estadios o etapas de la lactancia; los tres son muy semejantes entre sí y similares al perfil de la figura 24 (primer día de lactancia) que muestra tanto la forma de "little" PRL como su variedad glucosilada (26 Kd), en cambio las moléculas grandes se encuentran muy disminuidas. Finalmente en la tabla VIII se resumen los resultados de los cambios cuantitativos que sufren las moléculas de PRL, analizadas en el total de las mujeres estudiadas, a través del ciclo menstrual, el embarazo y la lactancia.

En la figura 26 se representa el comportamiento de las principales formas moleculares de la PRL durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, así como en el postparto y la lactancia. Como puede apreciarse las formas moleculares grandes aumentan hasta alcanzar su máxima concentración alrededor de la semana 36-38 del embarazo, para luego descender paulatinamente hasta el final de la gestación y el postparto y lactancia. En cambio la G-PRL y la "little" PRL presentan una tendencia diferente a la anterior; la G-PRL tiende a subir durante todo el embarazo y se mantiene elevada durante el postparto y la lactancia, mientras que "little" PRL (incluyendo los péptidos pequeños) desciende durante el embarazo para luego aumentar su concentración en el postparto y sobre todo en la lactancia,

manteniéndose elevada durante todo el período.

IV. PATOLOGIAS ASOCIADAS A LA SECRECIÓN DE PROLACTINA

a) Normoprolactinemia con Galactorrea

El perfil cromatográfico de las pacientes que presentaban galactorrea no obstante tener una concentración normal de PRL se caracterizó por un gran polimorfismo de la hormona, es especial de las formas moleculares grandes, de las cuales se detectaron dos o tres diferentes variedades moleculares tanto de "big-big" como de "big" PRL. Las figuras 27 y 28, ilustran los perfiles representativos correspondientes a dos de estas pacientes. Así en la figura 27 llama la atención la presencia de tres picos de inmunoreactividad a PRL en el área de "big-big" PRL; uno de ellos muy importante cuantitativamente, eluyó con el V_0 del sistema con un peso aproximado de 100 kd, los otros dos de menor cuantía, con un PM aparente superior a los 100 kd ya que eluyeron antes del V_0 . En el área de "big" PRL se encuentra un pico eluido en las fracciones 32-33, correspondiendo a la "big" PRL de 45 kd, después el pico de la G-PRL y enseguida el de "little" PRL (22 kd). En el área de moléculas pequeñas se observan los picos de inmunoreactividad correspondientes a los péptidos de 16 y 8 kd. En cambio en la figura 28 se observa un solo pico de "big-big" PRL también cuantitativamente importante, mientras en la zona de "big" PRL se presentan tres picos: uno que eluye con BSA (66 kd), después otro que eluyó en la zona intermedia entre BSA y Ovo con un peso aproximado de 56 kd y uno más que eluyó con el V_e de la ovalbúmina (45 kd). Se observan además los de la G-PRL y de "little" PRL que aunque está bien definido sólo contiene el 20% de la inmunoreactividad de PRL. En el área de moléculas pequeñas, se encuentra un pico relativamente importante del péptido de 16 kd.

b) Hiperprolactinemia con Galactorrea

La figura 29 representa el perfil cromatográfico del suero de las mujeres con galactorrea que a diferencia de las anteriores tenían cifras elevadas de prolactina. Los perfiles seleccionados (Figs. 27 y 28) son representativos de los encontrados en este grupo de mujeres, mostrando ligera inmunoreactividad en el área de "big-big" PRL; se encuentran dos moléculas de "big" PRL correspondientes a las de 66 y 45 kd y sólo un pequeño hombro correspondiente a la "big" PRL de 56 kd. La forma molecular predominante fue la G-PRL, "little" PRL se encontró notablemente disminuida en el perfil superior de la figura y no se observa en el perfil de la parte inferior. En cambio están presentes los picos correspondientes a los péptidos de 16 y 8 kd.

La proporción cuantitativa de las formas moleculares de PRL en los dos subgrupos de pacientes con galactorrea (normo e hiperprolactinémicas) se encuentra en la figura 30 representada por barras, en comparación con los porcentajes de inmunoreactividad encontrados en mujeres con ciclos ovulatorios regulares y sin patología. Como se puede apreciar en ambos grupos con galactorrea, las moléculas grandes de PRL se encuentran significativamente aumentadas al igual que la G-PRL; "big" PRL está en proporción similar en ambos grupos, mientras que "big-big" PRL se encuentra más elevada en las normoprolactinémicas con galactorrea, en cambio G-PRL está más elevada en las hiperprolactinémicas. La forma molecular de 22 kd se encontró disminuida en las mujeres normoprolactinémicas con galactorrea. En cuanto a los pequeños péptidos se refiere, la forma de 16 kd también se encontró disminuida en relación a los valores del grupo control.

c) Síndrome de Amenorrea-Galactorrea (SAG)

La figura 31 muestra el perfil de dos pacientes hiperprolactinémicas que presentaban no sólo galactorrea, sino también amenorrea (SAG). El perfil del suero de estas dos mujeres (representativas del grupo) es muy diferente, no tiene el polimorfismo de los perfiles anteriores (Figs. 27,28 y 29) y muestra que la forma molecular predominante en estos casos es la "little" PRL (22 Kd) aunque se encuentra otro pico relativamente importante de "big" PRL.

d) Hiperprolactinemia con Amenorrea

El análisis de los resultados de dos pacientes con hiperprolactinemia severa debida a la presencia de un prolactinoma pero que sólo tenían amenorrea como manifestación clínica, indican un predominio casi completo de la forma monomérica de PRL (22 Kd), en cambio las formas moleculares grandes están francamente disminuidas, al igual que los péptidos pequeños. Para comparar los casos anteriores que sólo tenían amenorrea, la figura 33 ilustra el perfil de los sueros de dos pacientes con sólo galactorrea, una de origen tumoral debida a un prolactinoma, y el otro de origen no tumoral. Se observa en ambos perfiles el predominio de las formas grandes aunque en el de la parte superior de la figura el único pico corresponde a "big" PRL de 66 Kd, mientras que en el caso del perfil inferior (no tumoral) se encuentra un pico de "big" PRL de 45 Kd y un pico menor de "little" PRL. Los niveles hormonales encontrados en el grupo de pacientes hiperprolactinémicas con galactorrea, así como en el de mujeres con amenorrea-galactorrea, se comparan con los del grupo control en la figura 34. Puede verse que los valores de LH y E_2 están disminuidos en ambos grupos en relación a los valores del grupo control y que FSH y PRL se encuentran elevadas sobre todo en el grupo de mujeres con amenorrea galactorrea

(SAG). La GH se encontró elevada sólo en el grupo que presentaba galactorrea, mientras que la progesterona (P_4) se encontró disminuida en el grupo de las pacientes con SAG.

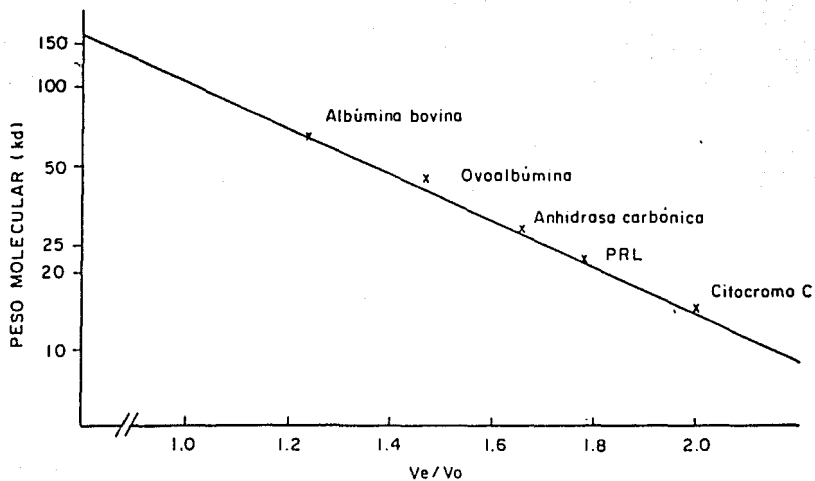


Figura 10.- Curva de marcadores de peso molecular

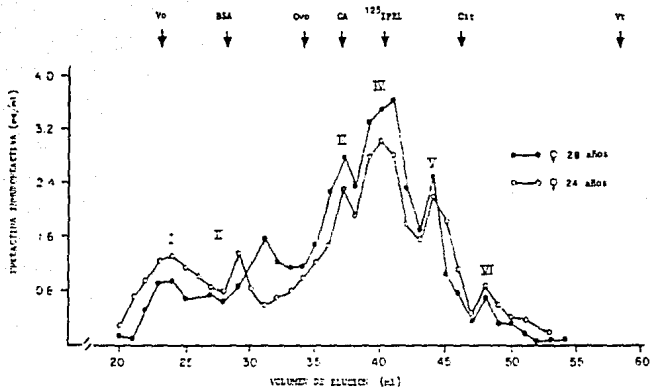


Figura 11.- Perfil cromatográfico de la PRL en dos mujeres normales ovulatorias

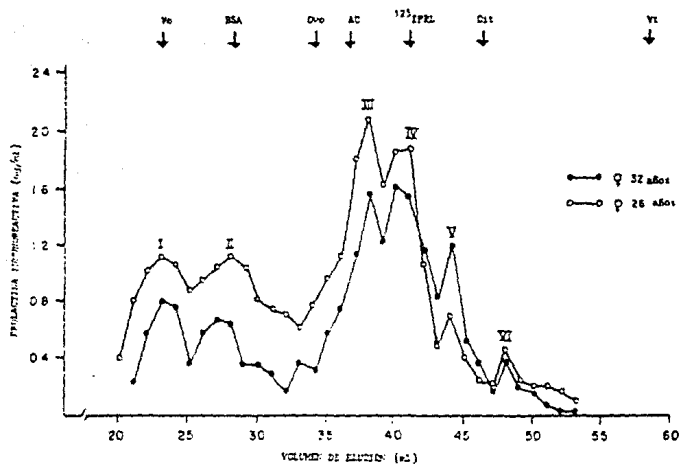


Figura 12.- Perfil cromatográfico de otras dos mujeres normales para su comparación.

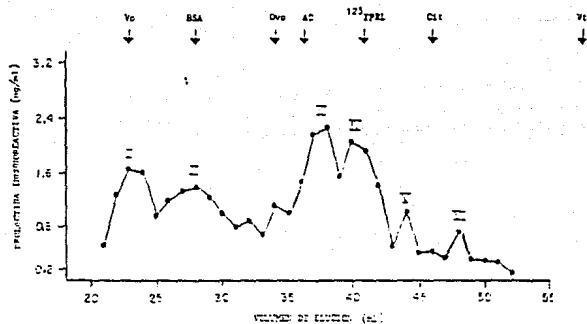


Figura 13.- Formas moleculares de PRL presentes en el "pool" de sueros de 4 mujeres normales con ciclos ovulatorios regulares.

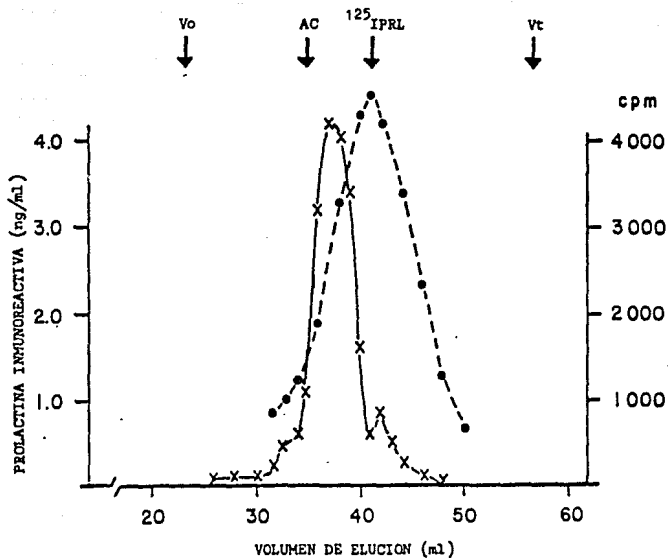


Figura 14.- Recromatografía del "pool" de las fracciones 34-35 de la filtración en gel: se observa que el pico vuelve a eluir en las fracciones mencionadas y es diferente a las fracciones donde eluye el estándar de prolactina (fracciones 39-44).

TABLA V

COEFICIENTE DE PARTICION Y PESO MOLECULAR DE LAS DIFERENTES FORMAS MOLECULARES DE PROLACTINA EN MUJERES NORMALES.

	"big-big"	"big"	"little"		MOLECULAS MAS PEQUEÑAS	
Ve (ml)	22-25	26-33	35-38	39-42	43-46	47-50
Kav	0.02	0.15-0.32	0.40	0.45	0.60	0.75
PM (kd)	100	65-40	26-25	23-22	18-16	8-12

Ve: Volumen de elución
 Kav: Coeficiente de partición
 PM: Peso molecular en kilodaltones.
 little PRL compuesta por dos moléculas

TABLA VI

PORCENTAJE DE INMUNORREACTIVIDAD A LA PROLACTINA DE LAS MOLECULAS DETECTADAS EN EL ANALISIS CROMATOGRAFICO EN EL SUERO DE MUJERES NORMALES OVULATORIAS.

CASO NO.	"big-big"	"big"	"little"		MOLECULAS MAS PEQUEÑAS	
			(26 k.d)	(22 k.d)	(16 k.d)	(8 k.d)
1	20.4	11.3	22.3	27.1	15.2	3.5
2	12.0	16.0	19.4	26.0	10.3	7.4
3	18.8	11.0	24.4	26.5	14.6	4.3
4	23.0	17.8	27.8	20.7	6.9	4.2
"pool"	24.0	18.0	25.4	20.2	8.0	5.6

MEDIA	19.6	15.2	23.8	25.6	12.6	5.0
DE	4.7	3.5	3.2	2.9	4.9	1.5

* Los resultados se expresan como un porcentaje de la inmunoreactividad total de PRL aplicada a la columna.

TABLA VII

RESULTADO DE LA CROMATOGRAFIA POR AFINIDAD EN SEFHAROSA-
CONCAVALINA-A.

FORMA MOLECULAR	PESO	SEFHAROSA-CONCAVALINA-A	
		ELUIDA %	UNIDA %
G-PRL	26 kd	39	61
"little" PRL	22 kd	60	40

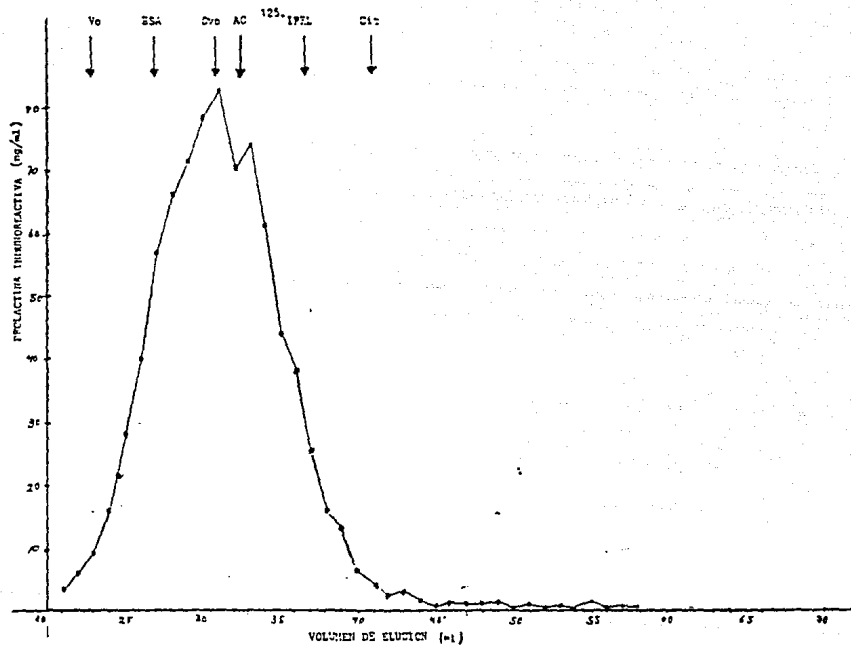


Figura 15.- Perfil cromatográfico de la PRL en LA de una mujer con 37 semanas de embarazo.

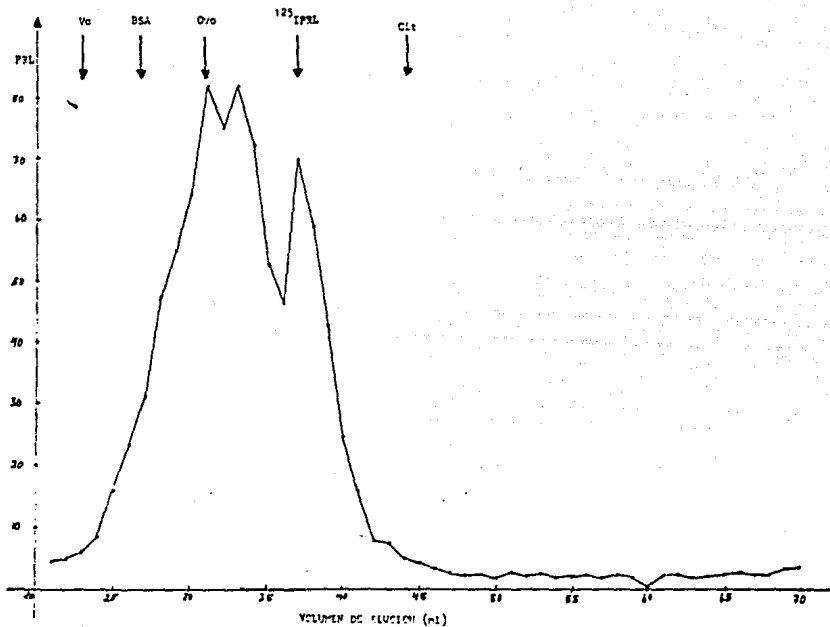


Figura 16.- Perfil cromatográfico de LA de una mujer normal con 38 semanas de embarazo.

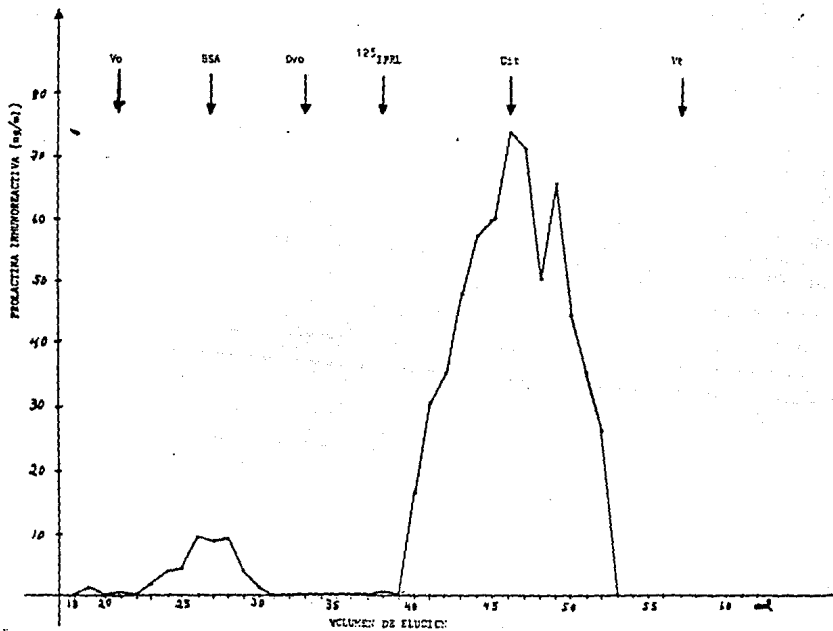


Figura 17.- Perfil cromatográfico de LA de una mujer normal con 39 semanas de embarazo.

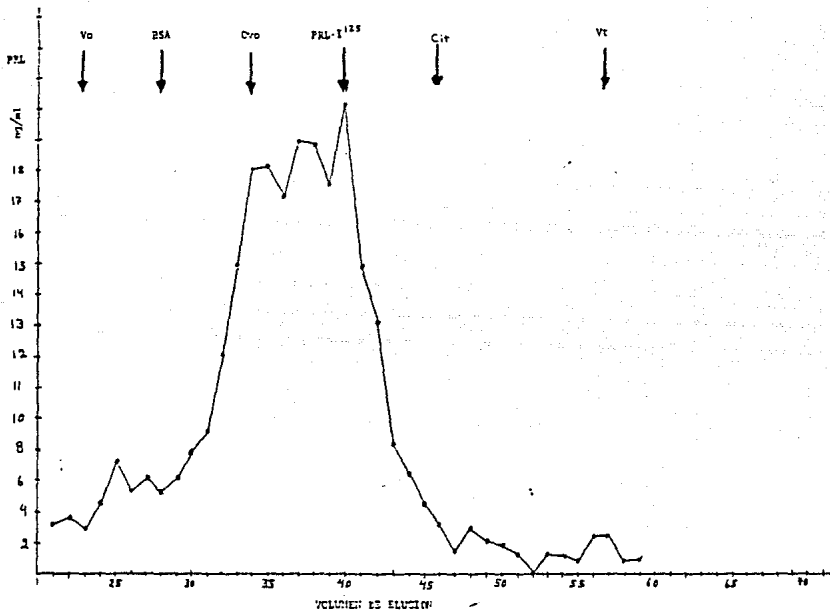


Figura 18.- Perfil cromatográfico del suero de una mujer normal con 30 semanas de gestación.

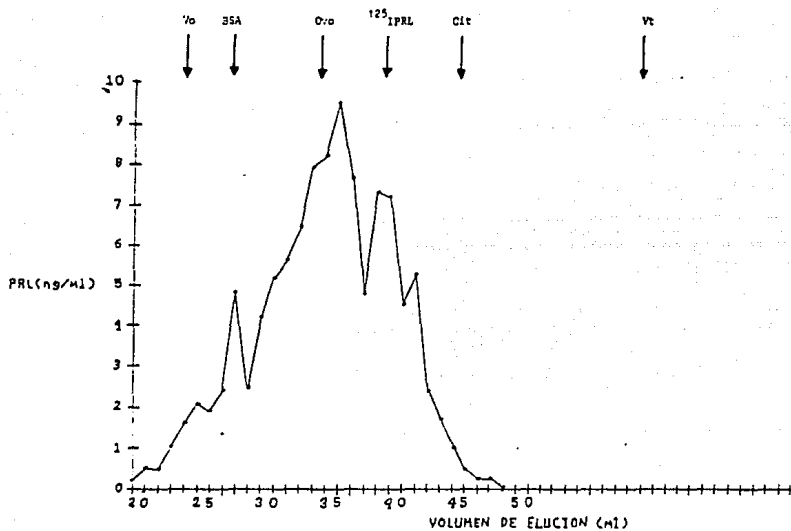


Figura 19.- Se muestra el perfil cromatográfico del suero de la semana 34 del embarazo.

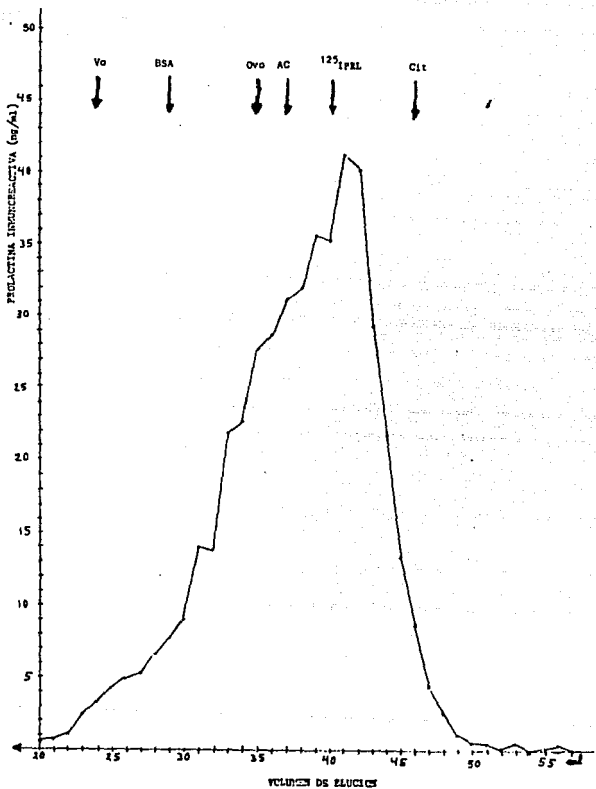


Figura 20.- Perfil cromatográfico del suero de una mujer normal en la semana 39 de la gestación.

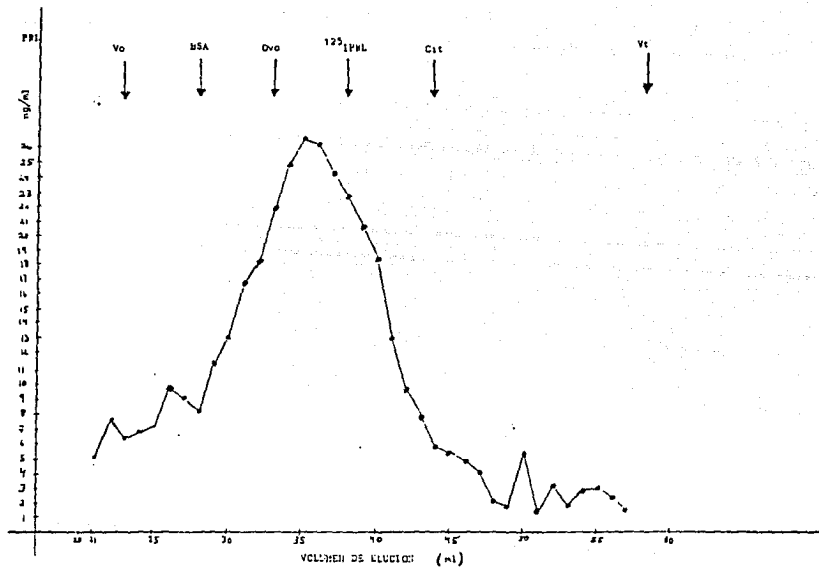


Figura 21.- Se muestra el perfil cromatográfico del suero de una mujer diabética embarazada, en la semana 39 de la gestación.

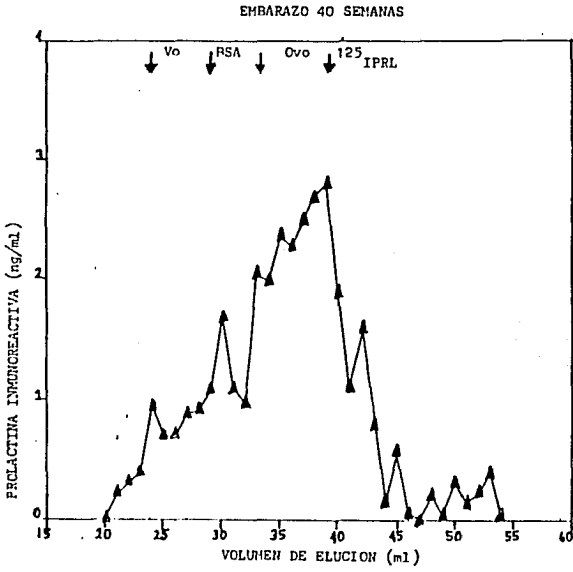


Figura 22.- Perfil cromatográfico del suero de una mujer normal con 40 semanas de embarazo.

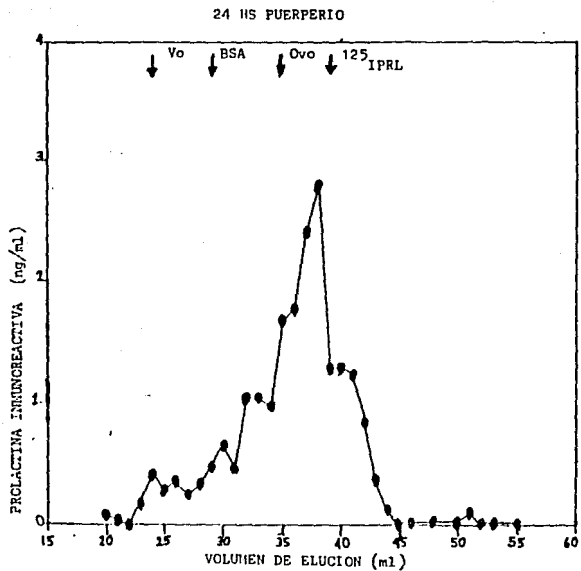


Figura 23. - Perfil cromatográfico del suero de la misma mujer, a las 24 horas del puerperio fisiológico.

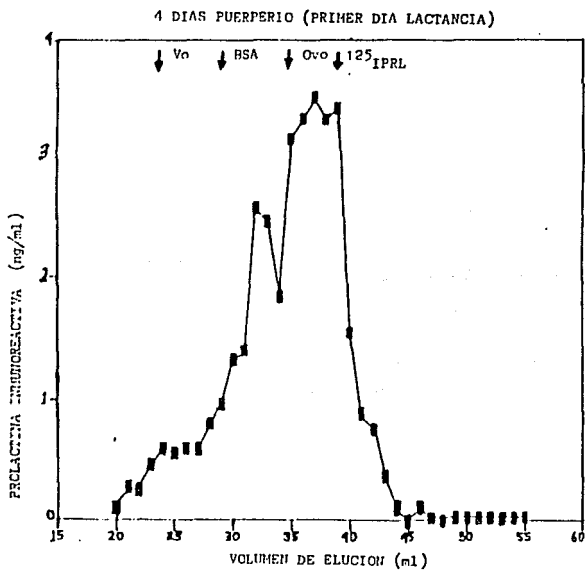


Figura 24. Formas moleculares de PRL presentes en el suero de la paciente (Figs. 22 y 23), 4 días después del parto (correspondiendo al primer día de lactancia).

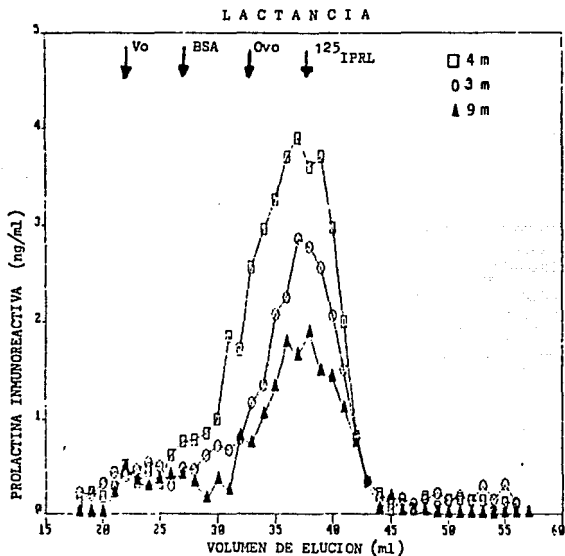


Figura 25.- Análisis comparativo del perfil cromatográfico del suero de 3 mujeres normales con 3, 4, y 9 meses de lactancia.

TABLA VIII

PORCENTAJE DE INMUNOREACTIVIDAD DE PROLACTINA DE DIFERENTES VARIANTES MOLECULARES A TRAVÉS DEL CICLO MENSTRUAL, EL EMBARAZO Y LA LACTANCIA.

	VARIANTES ISOMORFICAS DE PROLACTINA				
	Big-big (180 kd)	Big	Glicosilada (26 kd)	PRL (22 kd)	FORMAS PEQUEÑAS (16 y 9 kd)
PREOVULATORIO	19.4 ± 2.3	16.3 ± 1.9	24.8 ± 3.4	23.7 ± 2.9	14.8 ± 1.8
EMBARAZO					
2do. TRIMESTRE	11.7 ± 2.0	20.1 ± 2.3	38.3 ± 5.2	27.2 ± 2.3	18.4 ± 1.3
3er. TRIMESTRE	10.6 ± 1.9	23.1 ± 4.9	26.2 ± 3.7	38.5 ± 5.4	11.4 ± 4.2
POSPARTO	8.4 ± 2.0	21.5 ± 2.4	25.7 ± 1.7	33.4 ± 2.5	12.9 ± 2.1
LACTANCIA	7.8 ± 1.6	14.6 ± 2.5	22.5 ± 4.9	36.8 ± 1.2	14.1 ± 1.9
SIGNIFICADO* ESTADISTICO	NS	$\alpha < 0.02$	$\alpha < 0.02$	$\alpha < 0.005$	NS

* Comparanco el resultado del 2do. trimestre con aquellos obtenidos en la lactancia.

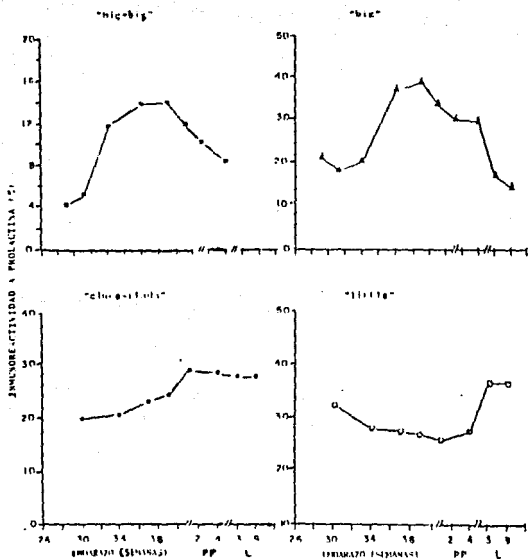


Figura 26.- Comportamiento de las diversas formas moleculares de la PRL a través del embarazo, el postparto y la lactancia. En la parte superior de la gráfica se ve la distribución de las formas grandes y en la parte inferior la de los monómeros, incluyendo las moléculas de bajo peso molecular. Las cifras representan el promedio (\bar{x}) de los valores de todos los casos estudiados.

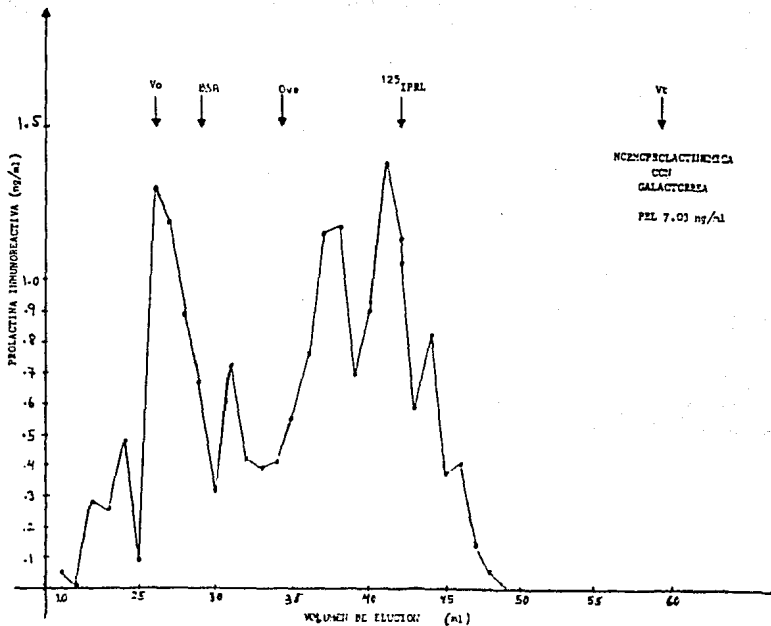


Figura 27.- Perfil cromatográfico del suero de una paciente normoprolactinémica con galactorrea. Nótese la elevada proporción de "big-big" PRL.

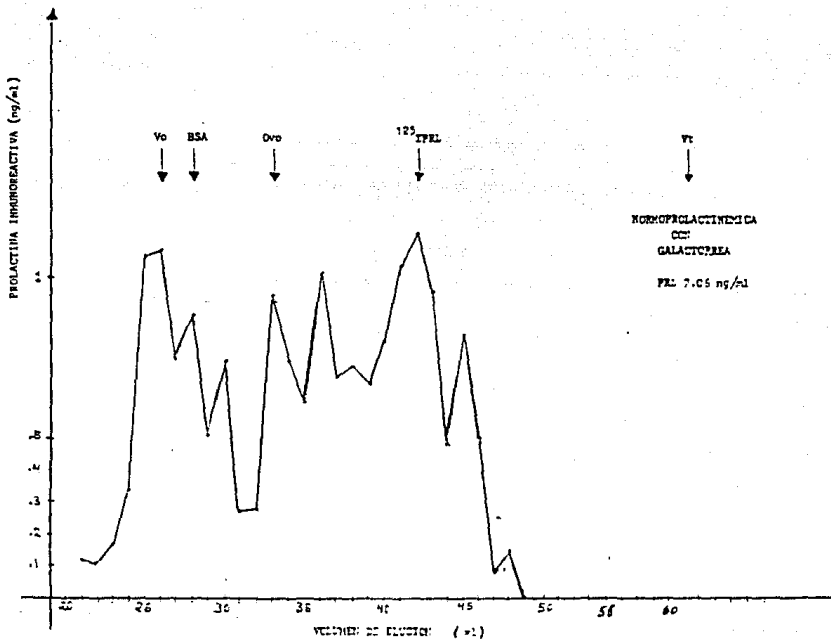


Figura 25.- Perfil cromatográfico del suero de otra paciente con prolactina normal y galactorrea. Resalta la presencia de "big-big" y varias formas moleculares de "big" PRL.

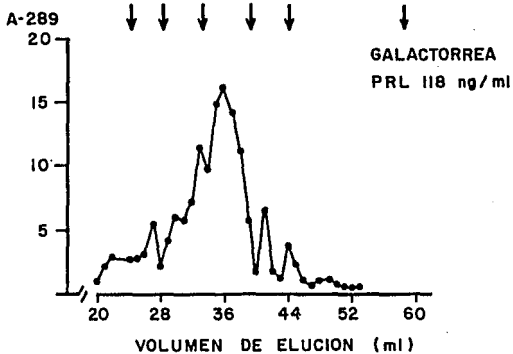
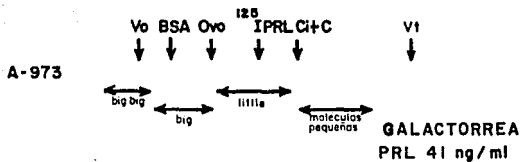


Figura 29.- Perfil cromatográfico de dos mujeres con hiperprolactinemia y galactorrea.

FORMAS MOLECULARES DE PROLACTINA EN MUJERES CON CICLO MENSTRUAL NORMAL
Y ALTERACIONES EN LA SECRECIÓN DE LA PROLACTINA

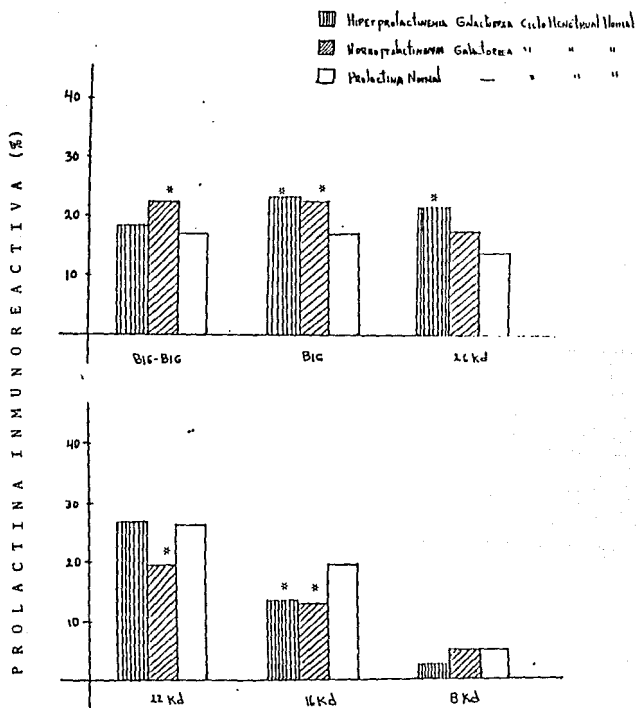


Figura 30.- Comparación gráfica de la proporción cuantitativa de las diferentes formas moleculares de PRL en pacientes normo e hiperprolactinémicas con galactorrea, en relación a las mujeres normales.

* Diferencia estadísticamente significativa en relación a los valores en las mujeres normales.

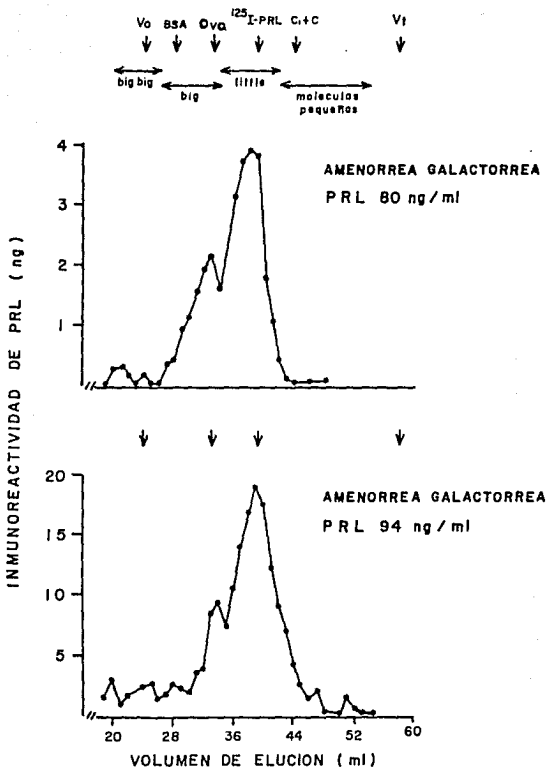


Figura 31.- Perfil cromatográfico de dos casos con hiperprolactinemia presentando amenorrea-galactorrea. Obsérvese el predominio de "little" PRL.

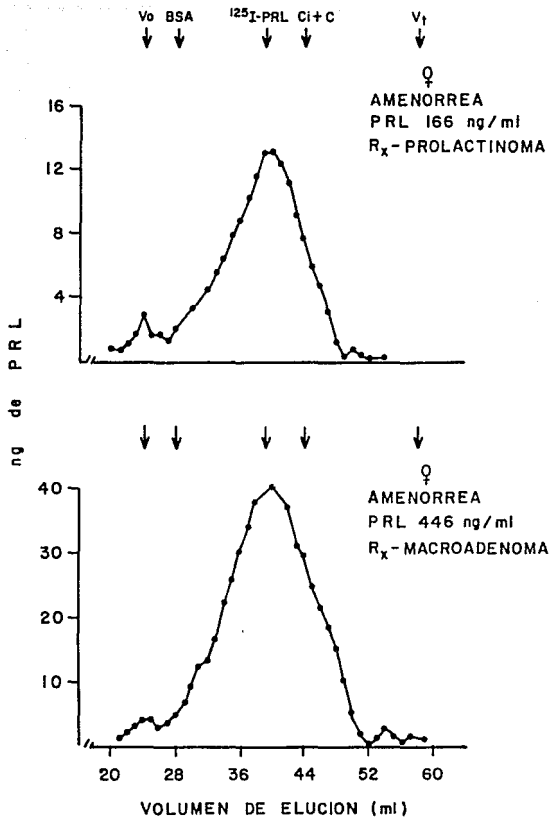


figura 32.- Perfil cromatográfico de dos pacientes con hiperprolactinemia y amenorrea por la presencia de un tumor hipofisario..

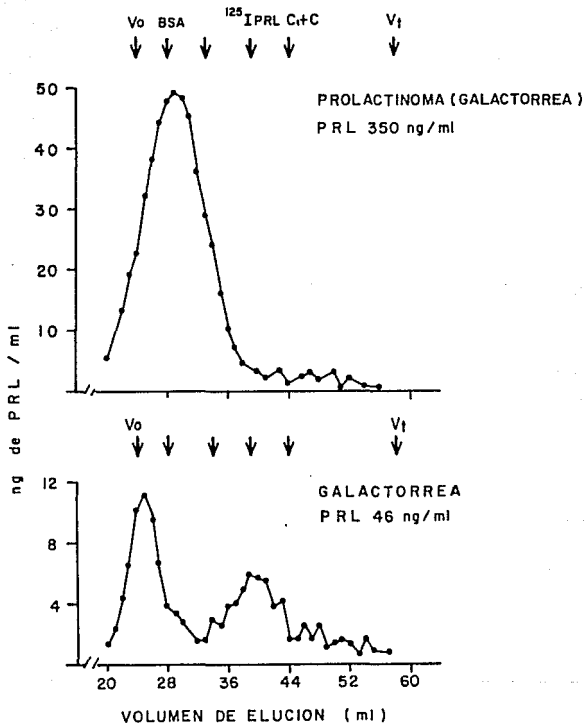


Figura 33.- Perfiles cromatográficos del suero de dos pacientes hiperprolactinémicas con galactorrea, una presentando un tumor (parte superior de la figura) y la otra sin alteración tumoral (parte inferior). En ambos se observa el predominio de formas grandes.

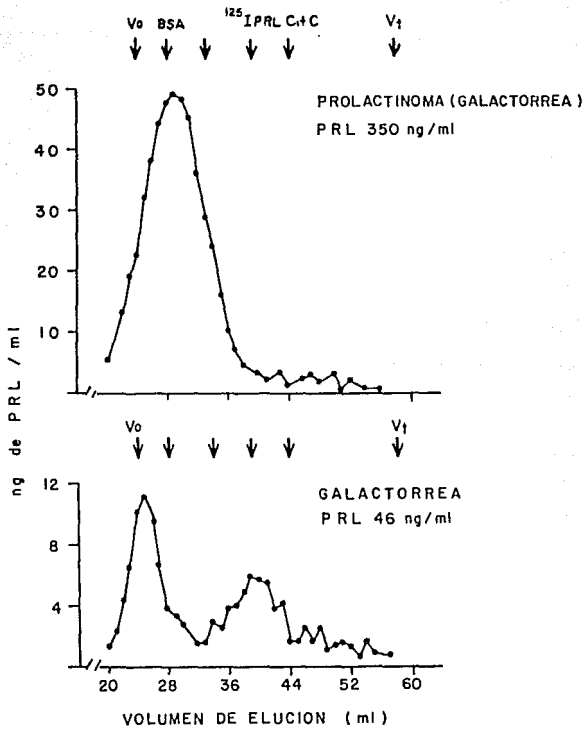


Figura 33.- Perfiles cromatográficos del suero de dos pacientes hiperprolactinémicas con galactorrea, una presentando un tumor (parte superior de la figura) y la otra sin alteración tumoral (parte inferior). En ambos se observa el predominio de formas grandes.

NIVELES HORMONALES

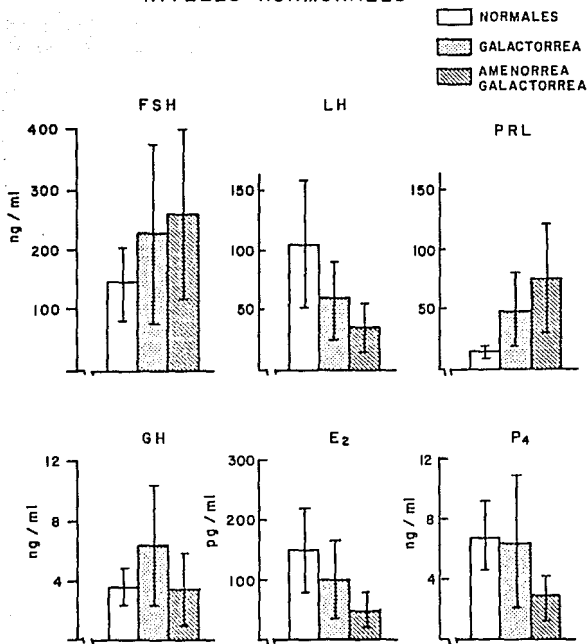


Figura 34.- Comparación de los niveles hormonales encontrados en las pacientes con galactorrea y amenorrea-galactorrea en comparación con los valores en mujeres normales.

C A P I T U L O V

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En este trabajo se ha estudiado el comportamiento cromatográfico de las diferentes formas moleculares de la prolactina, a través del ciclo menstrual, el embarazo y la lactancia, así como en ciertas condiciones en las que existen alteraciones en la secreción de esta hormona. El objetivo fundamental fue encontrar cual es el significado fisiológico de la heterogeneidad molecular, y averiguar si los cambios en la proporción de las diferentes formas moleculares tiene trascendencia clínica y se relaciona a la secreción anormal de leche que se presenta en algunas pacientes. Como se sabe, la galactorrea en ocasiones es inexplicable por cursar con una concentración normal de PRL, pero la mayoría de las veces se asocia a hiperprolactinemia, importante de estudiar y controlar por la repercusión adversa que tiene sobre el ciclo menstrual y la fertilidad, originando disminución de los esteroides gonadales, anovulación, insuficiencia lútea y desórdenes menstruales que pueden ir desde opsomenorrea hasta amenorrea y en consecuencia esterilidad. Por otra parte su frecuente asociación con la presencia de un tumor hipofisario hace prioritario el estudio de la hiperprolactinemia, debido a las alteraciones visuales y neurológicas que se presentan.

De los resultados de los estudios realizados en mujeres con ciclos ovulatorios regulares, un hecho importante fue encontrar que en condiciones normales existen no sólo las tres variedades tradicionales: "big-big", "big" y "little" PRL, sino seis formas diferentes considerando la G-PRL y los dos péptidos pequeños, que se detectaron en todos los casos estudiados.

De ellas, la G-PRL parece desempeñar un papel importante regulando la acción biológica de la "little" PRL (22 Kd) ya que de acuerdo a recientes reportes (46, 32), la G-PRL tiene solo la mitad de la acción biológica que se atribuye a la variedad no glucosilada de la hormona. En este estudio "little" PRL constituyó solo un 25-30% de la inmunoreactividad total del suero

y no un 55-80% como se ha reportado en algunos estudios previos (18,19). La diferencia estriba en que en ellos no se separó "little" PRL de la G-PRL, ni de los péptidos de 16 y 8 Kd que eluyen poco después de esta isohormona, de ahí que se le atribuyera un porcentaje tan elevado. Las formas pequeñas de 16 y 8 Kd consideradas como producto de la degradación de la hormona se encuentran en 10 y 5% respectivamente, y las moléculas grandes ("big-big" y "big" PRL) en conjunto en un 35%, lo que sumado al 25% de la G-PRL indica que el 75% de la inmunoreactividad de PRL reside en formas moleculares diferentes a la "little" PRL que había sido considerada la más abundante (18,22). Debe explicarse, enfatizando el hecho de que el área que se había considerado como "little" PRL es amplia y asimétrica, y esta constituida por formas moleculares de difícil separación en la cromatografía con Sephadex G-100 y que no es posible separarlas si se recolectan fracciones grandes de 3-4 ml como se hizo en los estudios previos. En el presente trabajo se recolectaron fracciones de 1.0 ml y esto sin duda, ayudó a la separación de las moléculas que eluyen en solo 1 y 2 ml. Además es posible aislar y separar estas formas moleculares por recromatografía de las fracciones correspondientes. En lo que se refiere a la variedad de PRL de 26 Kd, se pudo demostrar su naturaleza glucoprotéica mediante la cromatografía por afinidad que se realizó en Sepharosa-Concanavalina-A, la cual permitió separar la fracción glucosilada de la no glucosilada. Para ello, antes de realizar el estudio se probó la eficiencia de la columna de afinidad y la elución con NH_4OH 1M con TSH marcada (hormona de naturaleza protéica) demostrando que el 96% de la radioactividad unida a la Con-A fue eluida con el NH_4OH (datos no mostrados). Debe mencionarse que este reactivo por su carácter fuertemente básico, desnaturalizó la fracción de la G-PRL durante el proceso de elución y por lo tanto esta fracción no pudo ser cuantificada directamente por RIA, sin embargo, se hizo el cálculo indirecto de la fracción unida por diferencia entre la inmunoreactividad total aplicada a la columna, considerada como 100%, y la obtenida

en la fracción no unida a la concanavalina, la cual si pudo cuantificarse. Así la fracción de la G-PRL pudo expresarse como un porcentaje de la inmunoreactividad total. Los resultados que se obtuvieron (Tabla VII) indican que no hubo una separación total de las dos moléculas (G-PRL Y NG-PRL), sin embargo, nos permiten afirmar que la molécula de 26 Kd efectivamente está glucosilada y que debe corresponder a la forma glucosilada de "little" PRL reportada por Markoff y colaboradores (46,47), quienes indicaron que esta variedad glucosilada es la forma predominante en condiciones normales. En este estudio ambas formas monoméricas (G-PRL y NG-PRL), se encontraron en proporciones normales. En cuanto a los pequeños péptidos se refiere, en un estudio reciente realizado en ratas se encontró que tienen más actividad mitogénica que lactogénica y su función pudiera ser diferente (48,49).

Los resultados cromatográficos de los sueros durante el embarazo y la lactancia son interesantes, porque no solo confirman la presencia de las diferentes variedades moleculares de la PRL encontradas durante el ciclo menstrual, sino además ponen de manifiesto una elevada capacidad de recambio de las formas moleculares, dependiendo del ambiente hormonal y bioquímico. Así, durante el segundo y tercer trimestre de la gestación predomina la "big" PRL (45 Kd) y la G-PRL tanto en líquido amniótico (LA) como en el suero de las pacientes (Figs. 15,16,18 y 19) mostrando ambas isohormonas una tendencia ascendente a lo largo de la gestación; igual tendencia muestra "big-big" PRL, sin embargo, fue cuantitativamente menos importante (Fig. 26). En el caso particular del líquido amniótico, la "little" PRL se encontró muy disminuida y en algunos casos no pudo detectarse, al igual que la "big-big", siendo obvio el predominio de "big" PRL 45-46 Kd y de la variedad glucosilada, llamando la atención que estas isohormonas desaparecen bruscamente del LA al final de la gestación, encontrándose en la semana 39 solamente las moléculas pequeñas y ligera inmunoreactividad de "big" PRL de 66 Kd. El

recambio molecular es evidente y esto puede ser de importancia fisiológica si se considera, por una parte, la elevada actividad mitogénica que se ha atribuido a las moléculas pequeñas y por otra, el crecimiento tan acelerado que tiene el feto en las dos últimas semanas del embarazo. Así, la PRL fetal podría participar junto con la hormona de crecimiento (GH), el lactógeno placentario (HPL) y la insulina a promover el crecimiento del feto al final de la gestación, teniendo probablemente una actividad somatotrópica.

Por otra parte, los resultados de los sueros indican cambios importantes de la proporción de las isoformas a través de la gestación y la lactancia. Como ya se indicó, las formas moleculares grandes y la G-PRL tienden a subir durante el tercer trimestre hasta la semana 38 para después comenzar a disminuir paulatinamente permaneciendo bajas durante el postparto y la lactancia. Por el contrario, la little PRL que se había mantenido más o menos constante, al ocurrir el parto sufre un aumento considerable, llegando a ser la especie predominante durante la lactancia junto con la G-PRL. De esta manera puede decirse que durante la lactancia predominan las formas monoméricas de la PRL. No obstante debe hacerse notar que en todas las pacientes en el día en que se presentó la lactancia (Fig. 24), además de la prolactina monomérica (G-PRL y little PRL), se detectó un pico bien definido de inmunoreactividad en la zona intermedia entre BSA y Ovo correspondiente a una molécula de "big" PRL de aproximadamente 52-56 Kd que no había sido detectada en otras condiciones y que se observó (aunque disminuida) en todos los sueros obtenidos en la etapa de la lactancia. Desconocemos si este hecho tiene alguna importancia fisiológica o si pudiera tener un efecto sinérgico con la "little" PRL para desencadenar la lactancia. Lo mismo podría pensarse de la variedad glucosilada que aunque parece tener menor actividad biológica, es cuantitativamente muy importante en el postparto y la lactancia. Estos datos se apoyan y parecen cobrar sentido al analizar los

resultados de las pacientes con galactorrea, en especial de las normoprolactinémicas, mujeres que a pesar de tener una concentración normal de PRL presentan secreción láctea; en todas ellas se encontró un perfil muy heterogéneo en la zona de "big-big" PRL y "biq" PRL, moléculas que se encontraron aumentadas significativamente ($p < 0.05$) en relación a los valores en las mujeres normales, además en todas ellas se detectó el pico de "big" PRL 52-55 Kd que se encontró en la lactancia, mientras que la molécula de 22 Kd se encontró disminuida. Cabe mencionar que ninguna de estas mujeres presentó alteraciones del ciclo menstrual ni amenorrea, siendo la galactorrea la única alteración clínica de importancia. Lo mismo puede decirse de las pacientes que tuvieron prolactinomas secretores de "big" PRL, que solo presentaron galactorrea.

En cambio en el grupo de pacientes hiperprolactinémicas que tenían amenorrea, la distribución de las formas moleculares fue diferente con un claro predominio de la molécula de "little" PRL y una notable disminución de las formas grandes: esto se hizo más notable en el perfil cromatográfico de las pacientes con adenoma hipofisario que sólo secretaba "little" PRL en cantidades muy importantes. Estas mujeres no tuvieron galactorrea, solo amenorrea y por lo tanto puede pensarse que es esta forma molecular la que afecta negativamente el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. En cambio en las mujeres que tenían amenorrea acompañada de galactorrea se observa por lo menos una forma de "big" PRL acompañando al pico de la "little" PRL.

Finalmente como dato adicional para recalcar la importancia que puede tener el ambiente hormonal y bioquímico de las pacientes, se hace notar que en una paciente diabética con embarazo de 39 semanas cuyo suero fue cromatografiado (para comparar con los resultados de mujeres normales embarazadas), solo pudo detectarse en el perfil cromatográfico la variedad glucosilada (G-PRL 26 Kd); esto indudablemente debe estar condicionado por las

concentraciones elevadas de glucosa.

Con base a los resultados presentados se podría concluir que las diferentes variedades moleculares de la PRL constituyen un sistema hormonal complejo que modula y autorregula el grado de acción biológica de la hormona en las diferentes condiciones fisiológicas y patológicas. Esto se logra probablemente, mediante cambios en la proporción de las isohormonas que se modifican en respuesta al ambiente hormonal y bioquímico, el cual es diferente en el ciclo menstrual, el embarazo y la lactancia, así como en las diferentes patologías estudiadas, sobre todo en lo que se refiere a la concentración de esteroides gonadales. La producción anormal cualitativa o cuantitativa de las isohormonas parece alterar la actividad de la prolactina circulante, como ocurrió en las pacientes con galactorrea y amenorrea-galactorrea y en aquellas con un adenoma hipofisario, las cuales tuvieron diferentes manifestaciones clínicas dependiendo de las isohormonas presentes. Esto podría estar condicionado por las características de los receptores de los diferentes tejidos (glándula mamaria, útero, ovario, etc.) y su afinidad por las diferentes moléculas de PRL. Pensamos que los conocimientos que se tienen en esta área son aún limitados y por ello consideramos que al estudiar las alteraciones en la secreción de la PRL no basta la simple determinación cuantitativa de la concentración de la hormona, es necesario ampliar los estudios al análisis cromatográfico de las isohormonas o de la composición cualitativa de la PRL circulante, a fin de poder dar una explicación satisfactoria a la amplia gama de situaciones clínicas que comprende la hiperprolactinemia.

A P E N D I C E

Descripción de Figuras y Tablas

Figura 1. Representación de la estructura de hormona de crecimiento y de prolactina para su comparación. Ambas moléculas contienen puentes disulfuro dados por las moléculas de cisteína y cuentan con número aproximadamente igual de aminoácidos (191 para hormona del crecimiento y 198 para prolactina).

Figura 2. Se representan los cambios experimentados por la mama humana por acción de la PRL. Durante la gestación se producen cantidades crecientes de PRL que actúan sobre la glándula mamaria y la preparan para la lactancia, después del alumbramiento la concentración sérica de PRL permanece elevada mientras que los niveles de progesterona y estrógenos disminuyen, y actuando bajo el efecto inductor de insulina y cortisol desencadena la lactancia.

Figura 3. Esquema que representa la elevación de los niveles de PRL después de cada succión en las mujeres lactando, la mayor respuesta se encuentra diez a cuarenta días después del parto.

Figura 4. Representa el mecanismo por el que la hiperprolactinemia interfiere con la función ovárica, ya sea debido al embarazo o por hiperprolactinemia patológica.

Figura 5. Se muestran los niveles de la PRL sérica en diversas patologías en comparación con los valores encontrados en el suero de mujeres normales. La

concentración más alta corresponde a los prolactinomas.

Figura 6. Se ilustra el principio de la filtración gel; las moléculas grandes son excluidas del gel, mientras las moléculas pequeñas penetran en la matriz del gel, retardando su paso por la columna, así emergen de ella después que las moléculas grandes.

Figura 7. Esquema que representa una resina de afinidad. El soporte o matriz es generalmente una agarosa (Sepharosa) y el espaciador representa la molécula introducida en la matriz para favorecer la unión y la estabilidad del ligando en la resina, evitando los efectos estéricos entre ellas. El ligando (Concanavalina-A), es la molécula afin a la sustancia que se desea separar.

Figura 8. Esquematización del principio de la cromatografía por afinidad. En la parte superior de la figura, se representa la formación de la resina de afinidad con la inmovilización del ligando al soporte, en la parte media, la retención de la muestra por el ligando, con eliminación de las impurezas y en la parte inferior, el rompimiento del complejo formado entre la muestra y la resina y la obtención de la muestra ya purificada.

Figura 9. Representa varias estructuras de carbohidratos que se encuentran frecuentemente en hormonas glucoprotéicas, como un ejemplo de los residuos de azúcares que son unidos por la Sepharosa-Concanavalina-A debido a su contenido de dos residuos de manosa en posición alfa.

Figura 10. Representa la curva de calibración de peso molecular. Se obtuvo mediante una cromatografía en Sephadex G-100 de varias proteínas de peso molecular conocido que se utilizaron como marcadores, graficando el volumen relativo de elución (V_e/V_0) de cada una de ellas, contra el logaritmo de su peso molecular (PM) expresado en kilodaltones (Kd).

Figura 11. Cromatografía en Sephadex G-100 del suero de dos mujeres normales eumenorréicas. Las flechas en la parte superior de esta figura, así como en todos los cromatogramas de este trabajo, representan el volumen de elución de los diferentes marcadores de PM y se utilizan como referencia para localizar a las diferentes moléculas de PRL.

Figura 12. Cromatografía de los sueros de otras dos mujeres normales ovulatorias, mostrando la presencia de las seis variedades moleculares de PRL que se observaron en la figura 11. Se indican los sitios de elución de las proteínas usadas en la calibración de la columna como la gráfica anterior.

Figura 13. Cromatografía de la mezcla a partes iguales de los sueros de cuatro pacientes eumenorréicas ("pool" normal). El perfil es semejante a los cromatogramas de los sueros individuales. Se resuelven las seis diferentes formas moleculares de la prolactina que se identifican con números romanos del I al VI, con predominio del pico III que eluye cerca del V_e de la anhidrasa carbónica y antes del estándar de ^{125}I -PRL con un peso molecular aparente de 26 Kd.

Figura 14. Análisis cromatográfico en Sephadex G-100 de un "pool" de las fracciones 34-38 que se obtuvieron en una primera cromatografía (pico III). Se aprecia la elución de una molécula que precede a la del estándar de 125 I-PRL, con un peso mayor.

Figura 15. Cromatografía en Sephadex G-100 del LA de una mujer con embarazo de 37 semanas; se aprecian dos picos principales de inmunoreactividad: uno que eluye en el Ve de la ovoalbúmina (Ovo) y otro que eluye poco después de la AC.

Figura 16. Perfil cromatográfico del líquido amniótico de una mujer normal con un embarazo de 38 semanas. Muestra tres picos de elución, el primero en el área de "big" PRL eluyendo con la Ovo (PM aproximado de 45000) y otros dos que corresponden a G-PRL y "little" PRL respectivamente, nótese la ausencia de las moléculas de peso molecular bajo.

Figura 17. La cromatografía del LA en la semana 39 de la gestación, muestra un cambio notable al acercarse el parto: solo se observan dos picos en la región de las moléculas pequeñas, una que eluye cerca del citocromo C (Cit PM 12,500) y otro un poco después del marcador. Se observa también un pico pequeño en la zona de "big" PRL.

Figura 18. Cromatografía en Sephadex G-100 del suero de una embarazada con 30 semanas de gestación. Se aprecia un pico muy pequeño en el área de "big-big" PRL, en cambio los picos que corresponden a "big" PRL, G-PRL y "little" PRL, presentan inmunoreactividad muy importante, y dominan el perfil.

Figura 19. Perfil cromatográfico correspondiente a la semana 34 del embarazo normal, muestra cuatro picos de inmunoreactividad de PRL. uno corresponde a la zona de "big" PRL, otros dos a G-PRL y "little" PRL (26 y 22 Kd) y el cuarto a la molécula de 16 Kd. El área de "big-big" PRL es apenas perceptible.

Figura 20. Se muestra la cromatografía de un suero tomado en la semana 39 de la gestación; resalta el aumento de "little" PRL (22 Kd), que es la forma predominante y que eluye con la ¹²⁵I-PRL. El área de "big" PRL se encuentra disminuida en relación a las dos figuras anteriores.

Figura 21. Representa la cromatografía del suero de una paciente con Diabetes mellitus y embarazo de 37 semanas. El área de inmunoreactividad principal corresponde a G-PRL. Este perfil es diferente al de la mujer normal, en el que predomina la variedad no glucosilada ("little" PRL).

Figura 22, 23 y 24. Se presenta una serie de 3 perfiles cromatográficos de una mujer normal al final de embarazo, en el postparto y la lactancia. En la semana 40 de embarazo se encuentran cuatro picos: uno en la zona de "big-big" PRL y dos más de "big" PRL, eluyendo con BSA y Ovo respectivamente, sin embargo, predomina el pico que corresponde a "little" PRL 22 Kd. Se observan además dos picos menores en la zona de las moléculas pequeñas. En comparación, en la figura 23 (postparto), el predominio de la "little" PRL 22 Kd es franco, y las formas moleculares grandes se encuentran disminuidas; después al iniciarse la lactancia se

observa además de lo anterior, la aparición de un nuevo pico muy marcado que eluye entre el Ve de BSA y el de la Ovo y que se encuentra ausente o es apenas perceptible en las figuras 22 y 23.

Figura 25. Cromatografía en Sephadex G-100 de 3 sueros tomados a los 3, 4 y 9 meses de lactancia, se observa que el patrón es similar al de la figura 24, cuando se inicia la lactancia.

Figura 26. Representa el comportamiento de las principales formas moleculares de la PRL durante el segundo y tercer trimestre del embarazo, el postparto y la lactancia. En la parte superior de la figura se ve la distribución porcentual de las formas moleculares grandes de la PRL y en la parte inferior la distribución de los monómeros, incluyendo con "little" PRL, las moléculas de bajo peso molecular (pequeños péptidos). Cada punto de la gráfica representa el promedio de los valores del grupo de mujeres estudiadas en cada etapa.

Figura 27. Perfil cromatográfico del suero de una paciente normoprolactinémica con galactorrea. Nótese la elevada proporción de "big-big" PRL.

Figura 28. Perfil cromatográfico del suero de otra mujer con prolactina normal y galactorrea. Resalta la presencia de "big-big" PRL y varias formas de "big" PRL, en ambos perfiles (Figs. 27 y 28) se observa un pico que eluye entre la BSA y la Ovo.

Figura 29. Representa los resultados de dos mujeres hiperprolactinémicas con galactorrea. En ambos casos es notorio el polimorfismo de las formas

grandes de la PRL, aunque la forma molecular predominante es la G-PRL. Nótese que en estos perfiles también está presente la molécula de "big" PRL que eluye entre la ESA y la Ovo, aunque solo se le observa como un pequeño hombro.

Figura 30. Comparación gráfica de la proporción cuantitativa de las diferentes formas moleculares de la PRL en pacientes normo e hiperprolactinémicas con galactorrea, en relación a mujeres normales. Es de notar el aumento de las formas moleculares grandes, con predominio cuantitativo de la "big" PRL.

Figura 31. Perfil cromatográfico de dos casos de hiperprolactinemia presentando amenorrea-galactorrea. Obsérvese el predominio de "little" PRL.

Figura 32. Perfil cromatográfico de dos pacientes con hiperprolactinemia y amenorrea, debidas a la presencia de un tumor hipofisario productor de "little" PRL. El predominio de esta forma molecular es evidente.

Figura 33. Comparación del perfil cromatográfico del suero de dos pacientes hiperprolactinémicas que solo tenían galactorrea; una debido a la presencia de un tumor hipofisario productor de "big" PRL (parte superior de la figura), y la otra de origen no tumoral (perfil inferior). Predomina también "big" PRL, aunque existe inmunoreactividad en el área de "little" PRL, y de las moléculas pequeñas.

Figura 34. Comparación de los niveles hormonales en las

pacientes con amenorrea y amenorrea-galactorrea en relación a los valores en mujeres normales. En ambos grupos se observan alteraciones hormonales, resaltando la alteración de los esteroides ováricos.

Cuadro 1. Se indican los principales causas que determinan hiperprolactinemia.

Cuadro 2. Se señalan las causas más frecuentes que pueden producir galactorrea.

Tabla I. Datos Clínicos y hormonales que indican que las mujeres normales seleccionadas tenían ciclos ovulatorios regulares según lo indican los valores de progesterona (P₄) obtenidos en la fase lútea.

Tabla II. Se muestran los datos clínicos de las pacientes normoprolactinémicas con galactorrea. El estudio radiológico mostró que ninguna presentaba alteración tumoral.

Tabla III. Se clasifican las pacientes que presentaban alteraciones en la secreción de PRL, de acuerdo a la concentración de la hormona. Como puede verse, la mitad de las pacientes hiperprolactinémicas tenía un tumor hipofisario productor de PRL.

Tabla IV. Hallazgos clínicos en las pacientes hiperprolactinémicas estudiadas. Los valores más altos de PRL se encontraron en las pacientes con prolactinoma, que fue detectado por una tomografía axial computerizada (TAC).

Tabla V. Se muestra la clasificación de las diferentes

formas moleculares de la PRL encontradas en mujeres normales en base a su volumen de elución (Ve) expresado en ml, su coeficiente de partición (Kav) y peso molecular (PM) obtenido en la curva de peso molecular (Fig 10).

Tabla VI.

Se muestra la proporción de las diferentes formas moleculares de la PRL en los sueros de las mujeres con ciclo menstrual ovulatorio, expresada como porcentaje de la inmunoreactividad total de PRL. Los valores promedio fueron iguales para las dos moléculas de la PRL monomérica que se localiza en el area de "little" PRL.

Tabla VII.

Resultados de la cromatografía por afinidad en Sepharosa-Concanavalina-A, del "pool", de las fracciones 34-38 y 39-45 obtenidas de la filtración en Sephadex G-100, con el objeto de averiguar si la molécula de 26 kD corresponde a la variedad glucosilada.

Tabla VIII.

Cambios cuantitativos que sufren las moléculas de PRL, analizando los resultados del total de las mujeres estudiadas a través del ciclo menstrual, el embarazo y la lactancia.

B I B L I O G R A F I A

1. Chambach A, Bridson W, Turkigtan W (1971) Human prolactin: identification and the physical characterization on the biologically active hormone by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochem Biophys Res Comm* 43:1276
2. Shome B, Parlow AF (1977) Human pituitary prolactin: The entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol Metab* 45: 112
3. Nicoll C, Mayer G, and Russell S M. (1986) Structural features of prolactins and growth hormones that can be related to their biological properties. *Endocrine Reviews*. Vol. 7: 2 (169-203).
4. Wallis M (1981) The molecular evolution of pituitary growth hormone, prolactin and placental lactogen: a protein family showing variable rates of evolution. *J Mol Evol* 17:10
5. Wallis M (1976) The chemistry of pituitary growth hormone, prolactin and related hormones and its relationship to biological activity. In: peptides and proteins, a survey of recent developments. Weinstein B (ed) New York 5:213
6. Archer D J. (1980) *Fisiologia de prolactina*. Clin Ginec Obst Vol. 2 (321-333).
7. Frantz AG (1972) In: Lactogenic hormones. Wolstenholme G.E.W. Knight J (Ed) Churchill livingstone, Edinburgh and London. Pag 186.
8. Rosenberg SM, Maslar IA, Riddick D H (1980) Decidual production of prolactin in late gestation: Furthe evidence for a decidual source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 138:681
9. Hauth JC, Parker CP Jr, Mac Donald PC, Porter JC and Johnston JM (1976) A role of fetal prolactin in lung maturation. *Obs. Gynec* 51:81
10. Shiu RPC and Friesen HG (1980) Mechanism of action of prolactin in the control of mammary gland function. *Ann Rev Physiol* 42:83-96.
11. Aono T, Shioji T, Shoda T. (1977) Initiation of human lactation and prolactin response to suckling. *J Clin Endocrinol Metab* 44:1 101- 1 106.
12. Zarate A. (1983) Repercusión clinica de la

- hiperprolactinemia. Conceptos actuales. Folleto Sandoz de México, S.A. de C.V
13. Kleinberg DL Noel GL, and Frantz AG (1977) Galactorrhea: a study of 235 cases including 48 with pituitary tumors. N. Engl J Med 296:589
 14. Zárate A, Canales ES, Forbach G. (1984) Galactorrea. Un signo de patología diversa. Folleto Sandoz de México, S.A. de C.V.
 15. Johnston DG, Haigh RW, Watson M (1985) Prolactin secretion and biological activity in females with galactorrhea and normal prolactin concentrations at rest. J Clin Endocrinol Metab 22:661
 16. Kleinberg DL, Todd J (1980) Evidence that growth hormone is a potent lactogen in primates. J Clin Endocrinol Metab 51:1007
 17. Lewis UJ, Singh PPN, Sinha YN, Vander Laan Wp. (1971) Electrophoretic evidence for human prolactin. J Clin Endocrinol Metab 33:153-157.
 18. Kieffer AH, Malarkey WB. (1978) Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum. Experimental conditions that alter gel filtration patterns. J Clin Endocrinol Metab 46:119-124.
 19. Suh HK, Frantz AG (1974) Size heterogeneity of human prolactin plasma and pituitary extracts. J Clin Endocrinol Metab 39:928-935.
 20. Andino NA, Bidot C, Valdes M. and Machado A (1985) Chromatographic pattern of circulating prolactin in ovulatory hyperprolactinemia. Fertility and Sterility 44:600-605.
 21. Soong YK, Ferguson KM, Mc Garrick G, Jeffcoate SL. (1982) Size heterogeneity of immunoreactive prolactin in hyperprolactinemic serum. Clin Endocrinol. 16:256-265.
 22. Fang VS, Refetoff S. (1978) Heterogeneous human prolactin from a giant pituitary tumor in a patient with panhypopituitarism. J Clin Endocrinol Metab. 47: 780-787.
 23. Fang VS, Kim MH (1975) Study of maternal, fetal and amniotic human prolactin at term. J Clin Endocrinol Metab. 41: 1033-1034.
 24. Jordan RM, Tresp NM and Kohler PD. (1985) Human prolactin

- heterogeneity in pituitary effluent blood. Horm Metabol Res. 17:598-601.
25. Whitaker MD, Klee GG, Wao PC, Randall RV, Hesser DW. (1984) Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. J Clin Endocrinol Metab. 58:826-830.
 26. Guayda HJ. (1975) Heterogeneity of human growth hormone and prolactin secretion in vitro: immunoassay and radioreceptor assay correlations. J Clin Endocrinol Metab. 41: 954-967.
 27. Benveniste R, Helman JD, Orth DN, McLenna TJ, Nocholson WE and Rabinowitz D. (1979) Circulating big human prolactin: Conversion to small human prolactin by reduction of disulfide bonds. J Clin Endocrinol Metab. 48:883-886.
 28. Garnier PE, Aubert ML, Kaplan SL and Grumbach MM. (1978) Heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in man: Decreased affinity of "big" prolactin in a radioreceptor assay and evidence for its secretion. J Clin Endocrinol Metab. 47: 1 273- 1 281.
 29. Pellegrini I, Gunz G, Ronin C, Fenouillet E, Peyrat JP, Delori P and Jaquet P. (1986) Polymorphism of prolactin secreted by human prolactinoma cells: Immunological, receptor binding, and biological properties of the glycosylated and nonglycosylated forms. Endocrinology 122: 2667-2674.
 30. Champier J, Claustrat B, Sassolas G, Berger M. (1987) Detection and enzymatic deglycosylation of a glycosylated variant of prolactin in human plasma. FEBS Lett. 212:220-224.
 31. Larrea F, Villanueva C, Cravioto MC, Escorza A and Del Real (1985) Further evidence that "big-big" prolactin is preferentially secreted in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. Fertility and Sterility. 44: 25-30.
 32. Andersen AN, Pedersen H, Djursing H, Andersen EN and Friesen HG. (1982) Bioactivity of prolactin in a woman with an excess of large molecular size prolactin, persistent hyperprolactinemia and spontaneous conception. Communications-in-brief. 38: 625-626.
 33. Whitteaker PG, Wilcox T and Lind T. (1981) Maintained fertility in a patient with hyperprolactinemia due to big, big prolactin. J Clin Endocrinol Metab 53: 863-866.

34. Lee DW, and Markoff E. (1986) Synthesis and release of glycosylated prolactin by human decidua in vitro. *J. Clin Endocrinol Metab* 62: 990-994.
35. Richterich R y Colomo J P (1983) *Química Clínica. Teoría práctica e interpretación*. 4a. Ed. Salvat Editores, S.A. Barcelona (España) Pags. 116-117.
36. Porath J and Flodin P (1959) Gel filtration. *Nature* 163:1657
37. Fischer L (1975) *Introducción a la cromatografía en gel*. Editorial El Manual Moderno, S.A. Pags. 1-16
38. Chard T (1985) *Laboratory Techniques in Biochemistry and molecular Biology. An introduction to radioimmunoassay and related techniques*. 1th. Ed. 4th. Prints.
39. Aven P, Porath S and Ernbeck S (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides. *Nature* 214:1302-1304
40. Cutrcacas P and Anfinsen CB. (1971) Affinity chromatography. *Annu Rev Biochem* 41:259-278
41. Pharmacia Fine Chemicals. (1978) *Affinity chromatography. Principles and methods*. Handbook of Pharmacia Fine Chemicals. Pag. 6
42. Robinson O, García IC, Carballo O, Ruiz JE, Solís J and Zárate A. (1981) Data process in radioimmunoassay. *Results Rev Inv Clin*. 33:143-147.
43. Plummer DT. (1978) *An introduction to Practical Biochemistry*. 2nd. Ed. Mc Graw-Hill Bookcompany (UK) limited, Great Britain. Pag. 107.
44. Matsuzawa S and Chen HC (1980) a simple and effective solvent system for elution of gonadotropins from Concanavalin A affinity chromatography. *Analytical Biochemistry* 106:402-410
45. Lewis UJ, Sing RNP, Lewis LJ, Seavey BR and Sinha YN. (1984) Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:383-389
46. Markoff E, Sigel MB, Lacour N, Seavey BR, Friesen HG and Lewis UJ. (1983) Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 123:1303-1306
47. Markoff E and Lee DW (1987) Glycosylated prolactin is a major circulating variant in human serum. *J Clin Endocrinol Metab* 65:1102-1106

Metab 65:1102-1106

48. Sinha YN, Gilligan TA, Lee DW, Hollingsworth D and Markoff E. (1985) Cleaved prolactin: evidence for its occurrence in human pituitary gland and plasma. J Clin Endocrine Metab 60:239-243
49. Mitra I (1980) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part II in vivo mammary mitogenic activity of its N-terminal 16 k moiety. Biochem Biophys Res Commun 95: 1750-1754.