

3
20

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO**

**COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS**

**CARACTERIZACION DE LA SECRECION DE
LA PROLACTINA CORTADA Y LA
PROLACTINA 16 KD POR CELULAS
ADENOHIPOFISIARIAS DE RATA**

T E S I S
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
LICENCIADO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA
P R E S E N T A**

LUIS ANTONIO MENDOZA SIERRA

ASESOR
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera

MEXICO, D.F.

Junio de 1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

INDICE

1 ANTECEDENTES.....	1
1.1 EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS.....	2
1.1.1 EL HIPOTALAMO.....	2
1.1.2 LA HIPOFISIS.....	3
a) La neurohipófisis	
b) La hipófisis intermedia	
c) La adenohipófisis	
1.2 LOS LACTOTROPOS.....	5
1.2.1 CONTROL SUPERIOR DE LA SECRECION DE PROLACTINA.....	5
1.3 FUNCIONES DE LA PROLACTINA.....	8
1.3.1 SECRECION DE PRL EN DISTINTOS ESTADOS FUNCIONALES... 9	
a) Durante el ciclo estral	
b) En la gestación	
c) En la lactancia	
1.4 MECANISMOS DE ACCION DE LA PRL.....	11
1.4.1 RECEPTORES DE PROLACTINA.....	11
1.5 SINTESIS, ALMACENAMIENTO Y SECRECION DE LA PRL.....	12
1.5.1 ESTRUCTURA Y REGULACION DEL GEN DE PROLACTINA.....	12
a) Estructura	
b) Regulación	
1.5.2 TRANSCRIPCION.....	15
1.5.3 ALMACENAMIENTO Y SECRECION DE PRL.....	15
1.6 ESTRUCTURA DE LA PROLACTINA.....	15
1.6.1 VARIANTES DE PROLACTINA.....	16
2 OBJETIVO.....	24
3 METODOLOGIA.....	27
4 RESULTADOS.....	30
4.1 RATAS MACHO.....	31
4.2 RATAS HEMBRA CICLANTES.....	33
4.3 HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS Y ESTROGENIZADAS.....	34
5 DISCUSION.....	53
6 BIBLIOGRAFIA.....	58
APENDICE A (METODOLOGIA in extenso).....	66
APENDICE B (RESULTADOS INDIVIDUALES).....	72

1 ANTECEDENTES

El presente trabajo intenta hacer una aportación al conocimiento en el campo de la endocrinología, específicamente en lo referente a la secreción de dos variantes de la prolactina, las llamadas prolactina cortada y prolactina 16k; sobre las cuales se conoce muy poco.

El objetivo del trabajo realizado para esta tesis, es el de cuantificar las cantidades de cPRL y PRL 16K secretadas a los medios de cultivo por células adenohipofisarias obtenidas de ratas en diferentes estados fisiológicos y patológicos. Y además, analizar el efecto de diversos fármacos sobre la secreción de estas formas de prolactina.

Así pues, es importante dar información general para poder entender el marco teórico en el cual se inserta este trabajo. El primer punto a tratar será entonces, el llamado eje hipotálamo-hipófisis, que es la unidad funcional encargada de regular muchas de las funciones endocrinas del organismo. Dicho sistema consta de varios componentes, los cuales se explicarán a grandes rasgos; sin embargo se hará mayor énfasis (por razones obvias) en la regulación de la secreción de la prolactina. Este tema se tocará en la segunda parte de este capítulo, iniciando con una descripción de los lactotropos, los cuales son las células que producen la mayor cantidad de prolactina en el organismo. Ahí se discutirán algunos de los principales reguladores de la secreción de la prolactina.

Posteriormente, se hará un rápido recuento de la pleiotropía funcional que se ha atribuido a la prolactina, haciendo un énfasis especial en las funciones relacionadas con la reproducción en los mamíferos. Con esto se terminan las generalidades de los antecedentes.

El siguiente apartado será el de los mecanismos de acción de la prolactina; y después se tratará sobre su síntesis y secreción. La intención aquí es la de mostrar los diferentes pasos en los cuales es posible modificar la estructura de la prolactina. Modificaciones que son responsables de mantener una heterogeneidad molecular de la hormona, esto es, formar una familia de proteínas muy relacionadas entre sí por su estructura y su función.

Por lo anterior, debe tenerse en mente que "la prolactina", no es el nombre de una proteína, sino de una *familia* de ellas; por lo tanto, cuando me refiera a una en particular, se designará como "prolactina cortada", "prolactina nativa", etcétera.

1.1 EJE HIPOTALAMO-HIPOFISIS

Los sistemas biológicos deben contender con una gran variedad de fluctuaciones en el medio ambiente, y sin embargo, mantenerse ellos mismos en relativa constancia de diversos parámetros internos. Para mantener esa homeostasis [ver Valverde-R et al 1988], en la naturaleza se han diseñado diversos mecanismos de regulación a distintos niveles. Al nivel de organismo, los principales sistemas de regulación son el nervioso, el endocrino y el inmune.

El sistema endocrino actúa sintetizando y secretando moléculas denominadas hormonas, las cuales viajan por la sangre para llegar a todo el organismo, y modificar en alguna forma la función de algunos tipos celulares. Los órganos y tejidos que componen al sistema endocrino son muchos y están distribuidos en todo el organismo; de entre ellos, el hipotálamo junto con la hipófisis se encargan de orquestar una gran cantidad de las funciones endocrinas. A esta unidad funcional se le denomina el eje hipotálamo-hipófisis [ver Reichlin 1985].

1.1.1 EL HIPOTALAMO

El hipotálamo es una región del cerebro medio o diencefalo, y de entre las varias funciones que tiene se encuentra la de sintetizar, almacenar y liberar factores de regulación hipofisarios, es decir moléculas que van a modificar la secreción de la hipófisis; de tal manera que el hipotálamo funge como un gran sitio de comunicación (no el único) entre el sistema nervioso y el endocrino.

Los factores de secreción sintetizados por el hipotálamo más conocidos son de naturaleza aminérgica o peptidérgica, y bajo diversos estímulos que actúan sobre las neuronas que los sintetizan, se secretan a un sistema circulatorio llamado sistema porta hipofisario [ver Page 1988]. Este comienza como una red de capilares en la base del hipotálamo formados a partir de la carótida interna, y forman las venas porta que posteriormente se capilarizan para irrigar a la adenohipófisis. Una de las funciones del sistema porta hipofisario (además de llevar sangre a la hipófisis) es la de ser un

canal por el cual viajan factores de secreción para regular la secreción de las células hipofisarias. Por esta vía las células hipofisarias reciben señales tanto hipotalámicas como de órganos distantes; la integración de todas esas señales determina la función de secreción que han de tener estas células adenohipofisarias [Reichlin 1985].

1.1.2 LA HIPOFISIS

La hipófisis es una glándula que se encuentra en la base del cráneo, debajo del hipotálamo y sobre el hueso esfenoidal (en la llamada silla turca). Una de las maneras en la que se le describe anatómicamente, es por su división en tres partes o lóbulos: el posterior (o neurohipófisis), el intermedio, y el anterior (o adenohipófisis). En tanto que las células de los últimos dos se derivan de una evaginación ectodérmica (de la bolsa de Rathke), la neurohipófisis es principalmente un conjunto de botones terminales provenientes del hipotálamo y vasos capilares [ver Findling y Tyrrel 1988].

a) La neurohipófisis

Los cuerpos neuronales de cuyos axones se forma la neurohipófisis se encuentran en los núcleos supraópticos y paraventriculares del hipotálamo; ahí se sintetizan la vasopresina (hormona antidiurética) y la oxitocina, las dos principales hormonas neurohipofisarias, las cuales son almacenadas en las terminales axónicas (en la neurohipófisis) y posteriormente secretadas bajo ciertos estímulos; *v. gr.* amamantación.

Este órgano es encargado del balance hídrico, pues la vasopresina provoca un aumento en la retención de sodio y potasio por el riñón; además, es un vasoconstrictor potente. Por otro lado, la oxitocina interviene en la contracción del mioepitelio de la glándula mamaria en el proceso de evacuación láctea durante la lactancia, además de que desencadena las contracciones uterinas durante el parto [ver Ramsay 1988].

b) La hipófisis intermedia

La hipófisis intermedia constituye sólo una pequeña parte de toda la hipófisis, y aunque se encuentra bien desarrollada en la

mayoría de los vertebrados; una gran parte del estudio de su función se ha realizado en anfibios.

El principal producto de la hipófisis intermedia es la hormona estimuladora de los melanocitos (MSH); esta hormona regula la pigmentación de los animales, actuando en la dispersión de gránulos de melanina en los melanocitos [Reichlin 1985, Page 1988]. La MSH proviene de el precursor llamado pro-opimelanocortina (POMC), del cual se obtienen la corticotropina (ACTH), β -lipotropina, β -endorfina y otros péptidos.

c) La adenohipófisis

La adenohipófisis (AH) controla una gran variedad de funciones por medio de la secreción de diversas hormonas. Los principales tipos celulares secretores constituyentes de la AH son: los somatotropos, secretores de la hormona de crecimiento (GH); tirotropos, secretores de la hormona estimuladora de la tiroides (TSH); gonadotropos que secretan tanto a la hormona estimulante del folículo (FSH) como a la hormona luteinizante (LH); corticotropos que secretan la corticotropina (ACTH) y otros derivados del POMC; y los lactotropos, secretores de prolactina (PRL) [ver Pérez-Enríquez y Valverde-R 1982].

Todas estas hormonas secretadas por hormonas adenohipofisarias tienen diversos efectos que varían dependiendo del tipo celular sobre el que actúen, el estado fisiológico del animal y la especie. Pero a manera de resumen se puede decir que los efectos de estas hormonas son: la GH modifica el metabolismo de proteínas, lípidos y carbohidratos en general, y estimula la secreción de las somatomedinas (también conocidas como factores de crecimiento insulinoides) por parte de los hepatocitos. La TSH actúa sobre las células de los folículos de las tiroides (tirocitos) aumentando la secreción de las hormonas tiroideas. La LH y la FSH regulan la función gonadal al estimular la producción de esteroides sexuales, y la gametogénesis. La ACTH actúa sobre las células de la corteza suprarrenal, haciendo que aumente la secreción de glucocorticoides, mineralocorticoides y andrógenos. En tanto que la PRL es parte del complejo galactopoyético, el cual promueve y mantiene la producción de la leche [Greenspan y Forsham 1988]. Pero, de nuevo, estas son sólo una pequeña parte de las funciones que realizan estas hormonas.

Para poder apreciar esquemáticamente a grandes rasgos los componentes funcionales que conforman al eje hipotálamo-hipófisis-órganos blanco, véase la figura 1.1.

1.2 LOS LACTOTROPOS

Los lactotropos son las células del organismo que producen y secretan la mayor cantidad de prolactina, éstas se encuentran distribuidas en toda la adenohipófisis en la rata. El número total de células adenohipofisiarias se ha calculado que es para el caso de la rata adulta, entre 4.5-6 millones [Leavitt 1973], de las cuales el 40-50% son lactotropos, tanto en las hembras como en los machos.

Estas células son heterogéneas tanto morfológica [ver Neill 1988] como funcionalmente. Se ha observado la existencia de lactotropos con diferentes capacidades de secreción, existiendo poblaciones que secretan gran cantidad de PRL y otras una cantidad pequeña, lo cual pudiera reflejar una distinción fisiológica, en donde algunos lactotropos responderían diferencialmente a diversos estímulos [ver Lamberts y Macleod 1990].

1.2.1 CONTROL SUPERIOR DE LA SECRECIÓN DE PROLACTINA

La secreción de los lactotropos, como la de todas las otras células adenohipofisiarias, está controlada por factores hipotalámicos, algunos con efectos estimulantes y otros inhibitorios. Se conocen muchas moléculas provenientes del hipotálamo capaces de alterar la secreción de prolactina, sin embargo es muy debatido cuales de ellos tienen un papel fisiológico. Por lo tanto, la descripción que sigue se centrará en los secretagogos más estudiados y cuya importancia fisiológica es más clara: la dopamina, un inhibidor de la secreción de PRL, la TRH y el VIP (péptido intestinal vasoactivo) que activan su secreción.

Se reconoce que la dopamina (DA) es el principal regulador de la secreción de PRL, actuando como un inhibidor de su secreción. El hipotálamo mantiene un tono dopaminérgico continuo sobre la adenohipófisis, pero con estímulos de secreción de PRL, como la succión, este tono se suspende transitoriamente dando lugar a la secreción de la hormona [de Greef 1981].

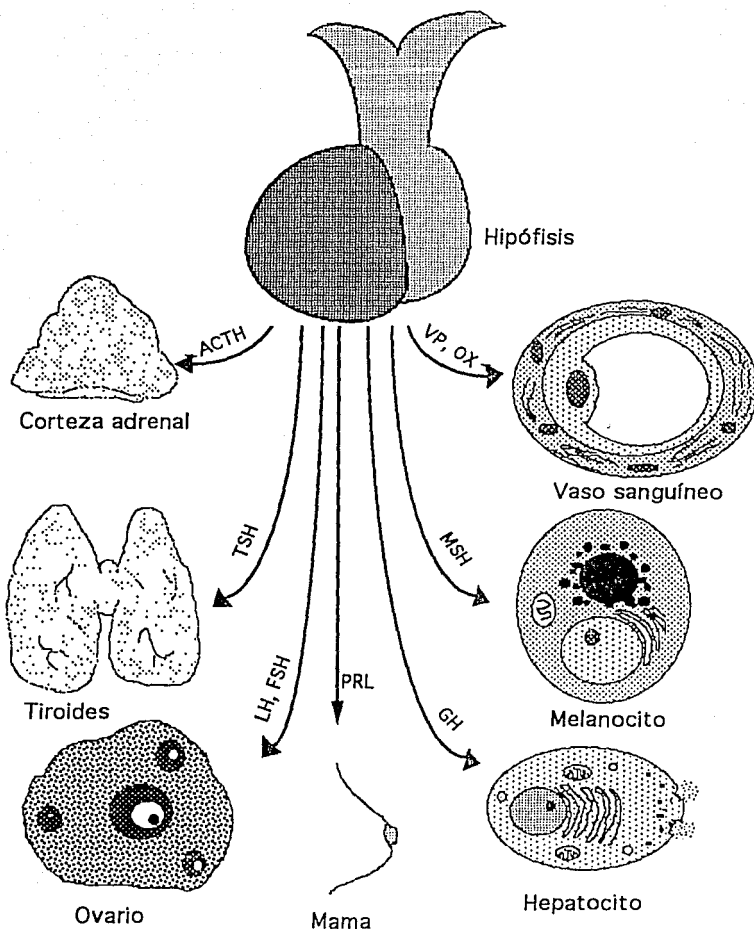


FIGURA 1.1 Esquema del eje funcional hipotálamo-hipófisis-órganos blanco. Aquí se representan algunos de los órganos o funciones que son modificadas de alguna manera por las diferentes hormonas hipofisarias. Debe quedar claro que las funciones de estas hormonas abarcan mucho más de lo que aquí se muestra.

La dopamina es secretada al sistema porta hipofisiario por un grupo neuronal conocido como "neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares". La DA viaja por la sangre portal y se une a los lactotropos en receptores membranales caracterizados como D₂, los cuales están acoplados a diversos sistemas de transducción intracelular de señales, siendo el más estudiado de ellos el sistema de la adenilato ciclasa, a la cual se encuentran acoplados negativamente [ver Vallar y Meldolesi 1989]. Otro de los efectores importantes en este sistema es el de la fosfolipasa C (PLC), el cual se activa con la eliminación del estímulo dopaminérgico [ver Martínez de la Escalera y Weiner 1992].

Por otro lado, el secretagogo de la PRL más estudiado es la TRH, este péptido es sintetizado por neuronas localizadas en los núcleos periventriculares, y secretada bajo ciertos estímulos, como la succión, o en el ciclo reproductor durante la tarde del proestro. Este factor de liberación actúa sobre receptores membranales, los cuales están acoplados a la PLC, provocando la hidrólisis del fosfatidilinositol bisfosfato a (1,4,5)IP₃ y diacilglicerol (DG), los cuales actúan los dos como segundos mensajeros. Estas dos moléculas activan a su vez otras señales, el (1,4,5)IP₃ libera calcio de pozas intracelulares y el DG activa a la cinasa C (PKC). Toda esta compleja cascada de señales, lleva al final a la secreción de la PRL [ver Bjørø et al 1990, ver Benker et al 1990].

Otro factor importante que actúa sobre la secreción de los lactotropos es el VIP, este péptido es un factor hipotalámico estimulante de la secreción de PRL, pero además es un factor autocrino de secreción, ya que es sintetizado y liberado por los mismos lactotropos [Nagy et al 1988], autoestimulando la secreción de PRL via receptores membranales específicos. Estos receptores se encuentran acoplados a la adenilato ciclasa, así que probablemente la estimulación autocrina de VIP sea la encargada de elevar los niveles intracelulares del cAMP en ausencia de factores hipotalámicos, con la consecuente liberación de PRL [ver Weiner et al 1988].

Aparte de los factores que tienen un papel fisiológico relativamente claro, existen muchas otras moléculas hipotalámicas que pudieran tener algún papel como secretagogos, ejemplo de ellos son la CCK (colecistokinina), PHI-27 (peptide histidine isoleucine), neurotensina, substancia P, angiotensina II, somatostatina [Reichlin

1985], GABA [Bilinski y Framezzani 1990, Neill 1988], glicina, taurina, histamina, serotonina y otros [Weiner et al 1988].

Además de la regulación del hipotálamo por medio de factores que viajan por el sistema porta hipofisiario, existe la posibilidad de que moléculas sintetizadas en la neurohipófisis alteren la secreción de prolactina. Por ejemplo, al menos *in vitro*, la oxitocina es capaz de aumentar la secreción de PRL [Lumpkin et al 1983], en tanto que la vasopresina y las neurofisinas (otros productos neurohipofisarios) no parecen afectarla en lo absoluto. Por otra parte, se ha postulado la existencia de un factor de secreción de la prolactina en la hipófisis intermedia [Corcia et al 1993].

Ahora bien, cabe aclarar que los factores hipotalámicos no actúan de manera independiente sobre los lactotopos, sino que sus efectos dependen del estado general de las células. La TRH, por ejemplo, activa de manera diferente la secreción de PRL si se encuentra presente o no la DA, o si ésta tuvo un descenso previo en su concentración [Martínez de la Escalera y Weiner 1992]. Todo esto hace ver la complejidad del sistema de secreción de la PRL.

1.3 FUNCIONES DE LA PROLACTINA

La prolactina es la hormona a la cual se ha atribuido la mayor cantidad y diversidad de efectos, así que aquí se pretende dar sólo una panorámica general de sus funciones, dando realce a las involucradas con la reproducción en los mamíferos, que es donde existe mayor cantidad de estudios.

Los lactotopos se han podido encontrar en todos los grupos de los vertebrados; así pues, es de esperar una gran cantidad de efectos debidos a la prolactina, los cuales suman más de 100 ahora. Es entonces conveniente agruparlos siguiendo el esquema propuesto por Nicoll [ver Nicoll 1974], a saber, efectos somatotrópicos, acciones osmorregulatorias, efectos conductuales, inmunorreguladores, y los relacionados con la reproducción.

Dentro de los efectos conductuales atribuidos a la PRL se encuentran los relacionados con la "maternidad" en teloosteos, aves y mamíferos. Por ejemplo, se puede inducir a las gallinas a incubar huevos y cuidar a los pollos recién nacidos inyectándolas con PRL; en los mamíferos se ha visto que la PRL junto con estrógenos, induce a ratas macho jóvenes y hembras vírgenes, a cuidar las crías. En los

conejos esta hormona por sí misma causa que la hembra construya nidos. Otro efecto conductual lo constituye la migración tanto en aves como en anfibios.

Para el caso de los efectos sobre el crecimiento causados por la PRL, se ha observado que interviene en procesos de crecimiento y regeneración en anfibios y reptiles; en las aves provoca hiperplasia epidermal, crecimiento de plumas y desarrollo del tracto reproductor femenino; en los mamíferos se da el desarrollo mamario, crecimiento de las glándulas cebáceas y prepucial, crecimiento del cabello, efectos eritropoyéticos, renotróficos, espermatogénicos, desarrollo de los órganos sexuales accesorios en machos y efectos luteotróficos, entre otros.

En los efectos osmorregulatorios tenemos que en los teleosteos, la PRL controla los niveles plasmáticos de sodio y calcio, controlando la permeabilidad a estos iones y al agua. En los anfibios interviene en los cambios de piel y electrolíticos relacionados con el cambio al agua, en el transporte de sodio y agua. En los reptiles es capaz de recuperar el nivel sanguíneo de Na^+ . En las aves estimula la secreción por la glándula nasal salina, y en los mamíferos interviene en la regulación de la composición y secreción de la fase acuosa de la leche, incrementa la retención de Na^+ a nivel renal y tiene efectos corticotrópicos.

Dentro de los muchos efectos relacionados con la reproducción se puede ver que en los peces óseos, la prolactina interviene en el crecimiento y secreción de las vesículas seminales, y tiene acción gonadotrófica. En los anfibios, por otro lado, se ha visto que posee en general efectos espermatogénicos; mientras que en los reptiles y aves se han reportado efectos antigonadotrópicos. En los mamíferos, esta hormona se encuentra involucrada en el desarrollo mamario y la lactancia, tamaño y actividad de la glándula prepucial, existe un sinergismo con andrógenos en las glándulas sexuales accesorias, tiene efectos luteotróficos, y acciones luteolíticas (en ratas y ratones).

1.3.1 SECRECIÓN DE PRL EN DISTINTOS ESTADOS FUNCIONALES

Las funciones que realiza una hormona dada, claramente son dependientes del estado fisiológico particular en el que se encuentra su órgano blanco. Por eso, se verá rápidamente el papel que juega la

PRL en diferentes estados funcionales de un mamífero, tomando como punto de partida los ritmos de secreción.

a) Durante el ciclo estral

Durante el ciclo reproductor de los mamíferos (llamado ciclo estral) existe una variación de la concentración sérica de diversas hormonas de naturaleza peptídica (LH, FSH, PRL) y esteroide (estradiol y progesterona).

La duración del ciclo estral en la rata es cuatro días; durante la primera mitad del ciclo, las concentraciones séricas de las gonadotropinas, principalmente la FSH, van aumentando paulatinamente, provocando la maduración de los folículos ováricos. Estas estructuras son secretoras de estrógenos, de tal manera que la cantidad de estos se incrementan en la sangre también. Uno de estos estrógenos, el 17 β -estradiol es un modulador positivo de la síntesis de PRL (ver adelante), así que esta última tiene un perfil de concentración sérica muy parecido el del estrógeno; aumentando según avanza el ciclo. En la mitad del ciclo estral durante la ovulación, con la consecuente ruptura del folículo, se disminuye la secreción de estrógenos, con lo cual la PRL a su vez disminuye sus valores en la sangre.

Una función propuesta para la prolactina durante el ciclo estral, específicamente durante el pico de secreción preovulatorio, es la de causar la regresión de los corpora lutea de los ciclos previos. También se ha propuesto que causa un aumento en la secreción de progesterona por la corteza adrenal [ver Feder 1981].

b) En la gestación

En el caso de la gestación, los patrones de secreción y función de la PRL cambian. Sus valores séricos en este periodo han sido bien estudiados para el caso de la rata, durante los primeros 11 días, se da un pico de secreción diurno y otro nocturno [Feder 1981]. La función fisiológica aquí parece ser la del mantenimiento de secreción de la progesterona por el cuerpo luteo, en conjunto con la LH [Nicoll 1974]. Después de estos días, la PRL se mantiene en niveles bajos, hasta que un día antes del parto (en el día 22) los niveles se elevan significativamente [Amenomori et al 1970], debido al aumento de estrógenos y por la caída de la progesterona.

c) En la lactancia

La última fase del ciclo reproductor de los mamíferos es la alimentación de las crías por medio de la leche, en este periodo la PRL tiene un papel muy importante. La PRL es una de las hormonas que conforman el complejo galactopoyético; el cual participa en la inducción de la diferenciación del epitelio alveolar en secretor, y en la modulación y mantenimiento de su funcionamiento [ver Clapp 1984].

Un paso indispensable para que se dé la lactancia, es el desarrollo de la glándula mamaria, o mamogénesis, y se sabe que participan diversas hormonas. En el caso de la rata, se conoce que intervienen el estradiol, la corticosterona, la aldosterona, la GH, la progesterona, la insulina y la prolactina [ver Aceves et al 1991].

El siguiente estado es la lactogénesis, en donde las células mamarias se convierten en secretoras, para lo cual deben sufrir cambios ultraestructurales y bioquímicos. El complejo hormonal que hasta ahora se conoce que actúa en esta etapa son el estradiol, la PRL, GH, glucocorticoides y hormonas tiroideas. El papel que juega aquí la PRL es la del establecimiento de la síntesis de la leche [Falconer y Rowe 1977].

En el periodo en el que la glándula mamaria sintetiza y evacúa la leche, se conoce que el estímulo de la succión desencadena la descarga de un complejo que incluyen a la oxitocina, la PRL [Mena et al 1982], la GH y la ACTH [Aceves et al 1991].

1.4 MECANISMOS DE ACCION DE LA PRL

Habiéndose tratado el *qué* hace la prolactina, ahora el problema es saber *cómo* lo hace. Una vez secretada a la circulación, se une a todas las células que tengan receptores a la PRL, desencadenando una serie de mensajes no del todo comprendidos. La intención de este apartado es mostrar algunas explicaciones que se han dado para explicar la variedad de funciones de la PRL.

1.4.1 RECEPTORES DE PROLACTINA

Para llevar a cabo sus efectos, la PRL se une a receptores membranales en sus células blanco. Se han reportado receptores a la prolactina en diversos tejidos del organismo; en los mamíferos

existen receptores [ver Kelly et al 1991] en: glándula mamaria, ovario, útero, placenta testículos, vesícula seminal, próstata, hígado, páncreas, intestino, riñón, glándula adrenal, células del sistema inmune, cerebro y retina.

Ahora bien, además de encontrarse en diversos lugares, existe una heterogeneidad de los receptores a PRL, lo cual pudiera explicar en parte su multiplicidad de efectos. El primer receptor reportado consta de 291 aminoácidos, 210 en la región extracelular, 24 en la región transmembranal y 57 en la región intracelular; teniendo además dos sitios en los cuales se encuentran residuos de carbohidratos; este receptor es conocido como la forma "corta". La forma "larga" del receptor consta de 592 aminoácidos (en la rata); sus dominios extracelular y transmembranal son idénticos a los de la forma corta, pero el dominio intracelular tiene 358 aminoácidos. Aunque esas son las dos formas principales, se han reportado otras variantes de tamaño para el ratón [Davis et al 1989] y en una línea celular de rata (Nb2) [Shiu et al 1983]. Ver figura 1.2.

A pesar de la gran cantidad de estudios sobre la estructura de los receptores a prolactina, no se conoce muy bien cual o cuales son los mecanismos de transducción a los cuales están acoplados estos receptores; sin embargo, comienzan a haber algunos candidatos, como por ejemplo, se ha visto la existencia de una cinasa acoplada a la activación del receptor a PRL [Rui et al 1992].

1.5 SINTESIS, ALMACENAMIENTO Y SECRECION DE LA PRL

Los mecanismos de síntesis, almacenamiento y secreción de la prolactina no difieren de los reportados para las proteínas en general. Sin embargo, las particularidades de cada uno de los pasos permiten comprender una variedad de mecanismos que darán lugar a la variabilidad estructural presente en esta hormona.

1.5.1 ESTRUCTURA Y REGULACION DEL GEN DE PROLACTINA

a) Estructura

La importancia de comprender la estructura del gen de la PRL, radica en que proporciona información acerca de cuales son los sitios de reconocimiento a los cuales se unen factores de expresión.

RECEPTORES DE PROLACTINA

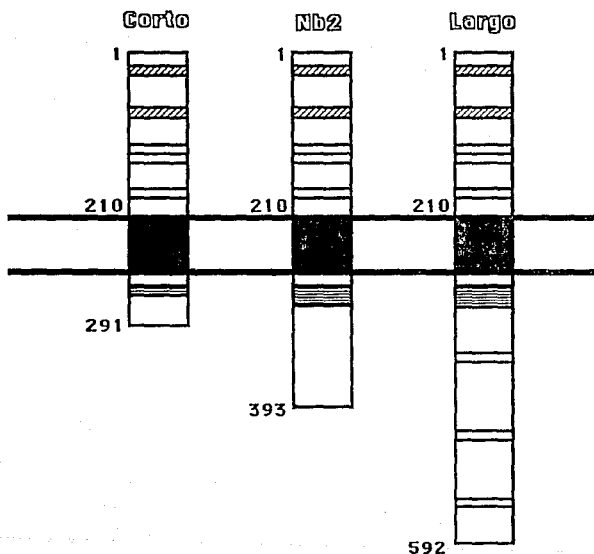


FIGURA 1.2 Receptores a la prolactina. Se presentan los tres tipos de receptores a la prolactina caracterizados en ratona, los números representan el número de aminoácidos.

El gen de la prolactina se encuentra en el cromosoma 6 en el humano [Oweibach et al 1981] y se considera que evolucionó de un antecesor común a la prolactina, hormona de crecimiento y lactógeno placentario [ver Miller y Eberhardt 1983]. La longitud de este gen de prolactina es de 10 kb, desde el sitio de iniciación de la transcripción, y su transcrito consiste de cinco exones y cuatro intrones [Chien y Thompson 1980]. En la dirección 5' se encuentran una región promotora (de -422 a +33) y un enhancer (de -1596 a -1530), el cual permite a los lactotopos tener un alto nivel de transcripción; además posiblemente existen elementos de represión dentro de la región -422 a -296 [Jones y Catanzaro 1991].

b) Regulación

Dentro del gen de PRL se encuentran diversas regiones que son reconocidas por factores de transcripción, uno de ellos es el Pit-1, un factor crítico para la diferenciación de células pluripotenciales hacia somatotopos, lactotopos y tirotopos; el Pit-1 activa tanto a los promotores de prolactina y GH como a la secuencia amplificadora ("enhancer") de PRL. Los sitios de unión a Pit-1 se encuentran en las regiones -45/-65, -148/-170, y -190/-210 [Harvey et al 1991] del gen de PRL. Ahora bien, estos mismos sitios muestran afinidad por el factor LSF-1 (factor específico del lactotopo) el cual muy probablemente sea el encargado de la expresión diferencial del gen de PRL en los lactotopos [Harvey et al 1991].

Por otro lado, se conocen diversas hormonas capaces de afectar la expresión del gen de PRL; un regulador importante de su transcripción es el 17 β -estradiol [ver Shull y Gorski 1986], que se sabe se une en una región entre 1.2-2kb en un sitio 5' del gen. Existen además, muchas hormonas que tienen efectos regulando de alguna manera a este gen: andrógenos [Ruh y Ruh 1975], progesterona [MacLeod et al 1969], glucocorticoides, hormonas tiroideas [Maurer 1982] y otras [Shull y Gorski 1986].

Además de todas las hormonas que cuentan con receptores nucleares, la activación de ciertas moléculas pueden provocar cambios en la expresión del gen de PRL; se ha reportado por ejemplo, que la calmodulina está involucrada en la velocidad transcripcional de dicho gen [Murdoch et al 1985]. Cabe recordar que la calmodulina está involucrada en una gran cantidad de procesos y mecanismo de transducción de señales, muchas de las cuales tienen

repercusión directa en la síntesis y secreción de PRL, como la TRH. Además, se ha visto que antagonistas altamente específicos de la calmodulina reducen la transcripción del gen de PRL, y este efecto parece involucrar a la región enhancer del mismo [Davis et al 1991]. Por otro lado, se sabe que el gen de PRL tiene un nivel de expresión alto en ausencia de señales externas, y se sabe que esta expresión es altamente dependiente, y en gran medida específica, de un mecanismo en el cual el calcio se halla involucrado [White et al 1981].

1.5.2 TRANSCRIPCIÓN

Durante la transcripción del gen de PRL, comienzan a darse los procesos que generan la variabilidad estructural de la PRL, pues aunque sólo se ha reportado la existencia de un gen de esta hormona, se ha reportado la existencia de diferentes transcritos (mRNAs).

Durante mucho tiempo se conocía sólo un mRNA para la PRL, que al traducirse genera a la prolactina de 23KD (prolactina nativa, prolactina intacta); sin embargo, en 1992 se reportaron otros dos mensajeros diferentes, uno de ellos que de ser traducido daría lugar a una prolactina de 45kD de peso molecular [Shah y Hymer 1989], este mRNA fue obtenido de células adenohipofisarias y, de hecho, estos autores reportan la presencia de esta variante de PRL en medios de cultivo. Después se reportó el hallazgo de un mRNA en cerebro que codificaría para una PRL de 16kD [Emanuele et al 1992]; un aspecto relevante de dicho trabajo, es que se analizó el mRNA, y este se obtiene por la transcripción de los exones 2, 3 y 5 del gen de PRL, en vez de los exones 2, 3, 4 y 5 del mRNA "típico".

1.5.3 ALMACENAMIENTO Y SECRECIÓN DE PRL

Después de haber sido sintetizada en el retículo endoplásmico rugoso y modificada (en algunos casos) en el Golgi, la PRL es almacenada en vesículas para su posterior secreción. Se ha visto que la PRL se almacena en un estado no soluble, ya que si a estas vesículas de almacenamiento se les disuelve la membrana con un detergente, mantienen su estructura [Giannattasio et al 1975]. Sin embargo, el proceso de secreción implica cambios químicos en el gránulo de PRL para hacer a la hormona disponible, se ha visto que ocurre una caída brusca en la inmunodetectabilidad de la PRL intracelular antes de su secreción [ver Martínez de la Escalera 1984]. Este cambio parece ser debido a varias reacciones de oxidoreducción, que conllevan a la formación de distintas formas

monoméricas y poliméricas de la prolactina [ver Martínez de la Escalera et al 1991].

1.6 ESTRUCTURA DE LA PROLACTINA

Ahora se reconoce que el término prolactina designa a una familia de isoformas o variantes de lo que anteriormente se consideró era una sola hormona. La variante que se encuentra en mayor cantidad es una proteína cuyo peso molecular es de 23 000 daltones (PRL 23k) y está formada por 197 aminoácidos (en la rata), tiene tres puentes disulfuro y es de naturaleza globular. Durante mucho tiempo se consideró que era la única forma existente; sin embargo, desde la introducción de las técnicas cromatográficas en el estudio de las hormonas, se ha podido constatar que en general, para el caso de las hormonas proteicas, existen isohormonas, esto es, variantes moleculares de una misma hormona con inmunoreactividad y bioactividad variable. En el caso de la prolactina se han reportado la existencia de moléculas con variación de peso, carga, fosforiladas, glicosiladas, deamidadas, polímeros y monómeros [var Sinha 1992]. Las modificaciones a la proteína se pueden dar en el aparato de Golgi, los gránulos de secreción, o incluso después de haber sido secretada la hormona.

1.6.1 VARIANTES DE PROLACTINA

La heterogeneidad de la prolactina se conoce desde la introducción de las técnicas electroforéticas en el estudio de la hipófisis, sin embargo la heterogeneidad *funcional* se comenzó a reconocer cuando se estudió la bioactividad de estas variantes con el desarrollo de diversos bioensayos con células o tejidos responsivos a prolactina. En esta sección intentaré dar un panorama de la diversidad molecular de la prolactina, acompañada en algunos casos con los datos obtenidos de su bioactividad.

Se han hecho muchos esfuerzos para comprender la naturaleza molecular de las variantes de la prolactina; existen varios tipos de modificaciones de la "prolactina nativa", las primeras variantes estudiadas fueron aquellas en las cuales se encuentra a la PRL en agregados (moléculas unidas no covalentemente) o polímeros (moléculas unidas por puentes disulfuro). También existen formas en las que a la molécula nativa se le agregan grupos fosfato, sulfato o azúcares; por último está el grupo de moléculas que han sido

modificadas en su estructura por medio de deamidación o por diversos tipos de proteólisis. Todos los ejemplos anteriores son resultado de modificaciones postraduccionales y/o postsecretorias, sin embargo existen unos pocos datos de la posibilidad de cambios postranscripcionales.

La mayor cantidad de estudios sobre los agregados se han hecho en sueros de humano, desde 1974 se reconoce la existencia de PRL "grande" (big PRL o BPRL, que corresponde a un dímero de ≈ 46 KD), y la PRL "grande grande" (big big PRL o BBPRL, formada por heteropolímeros de naturaleza aún no bien caracterizada, con peso >100 KD). Estas formas de alto peso molecular tiene una menor actividad comparada con la PRL 23K en ensayos de radioreceptor [Fraser and Zhuang 1990, Farkouh et al 1979], y en el bioensayo de las células Nb2 [Whitaker et al 1984], obteniéndose una relación de actividad de PRL $>$ BPRL $>$ BBPRL. Además, estos polímeros responden de diversa manera a los estímulos farmacológicos, en tanto que la BPRL es poco responsiva al efecto de la TRH, la BBPRL responde poco a la dopamina [Fraser y Zhuang 1990]. Además de los ensayos *in vitro*, los análisis de pacientes con hiperprolactinemia han sido muy valiosos; se han reportado algunos casos en que estas personas presentan una ovulación normal, a pesar de que el ciclo reproductor es fácilmente alterado por la prolactina, en estos casos se ha notado que la forma principal de la hormona presente es la BBPRL [Fraser and Zhuang 1990] por lo que se ha propuesto que los agregados de PRL tienen menor actividad biológica.

En 1980 se reportó la existencia de esos mismos agregados en ratón, llamandolos PRL grande, intermedia y pequeña [Sinha 1980]. En este estudio se notó que las concentraciones de estas formas varían según el estado fisiopatológico de los animales, habiendo ocasiones en que las formas poliméricas eran las principales y, a veces, las únicas detectables, como en el caso de los animales de 15 días de nacidos, y en machos adultos; por otro lado, las formas intermedias aparecían solamente en las ratas post-lactantes y en machos castrados tratados con etilbestrol. Un resultado importante fue la observación de que en una cepa de ratón con altos índices de aparición de tumores mamarios tiene como forma circulante principal a la BBPRL, en tanto que otra cepa con baja incidencia tiene principalmente PRL 23K; sin embargo, en los machos de estas cepas (donde rara vez se desarrolla un tumor mamario) no se encontró ninguna diferencia en las formas circulantes de la hormona.

El primer reporte de la variabilidad molecular de la prolactina en rata corresponde al grupo de Nicoll [Asawaroengchai et al 1978]. Analizando homogenados adenohipofisarios y medios de cultivo de hipófisis con la técnica de geles de poliacrilamida no desnaturalizantes en columna, se caracterizó la inmunorreactividad a prolactina en diversos sitios del gel, no pudiendose obtener, sin embargo, los pesos moleculares de las variantes, por lo cual se tenían que reportar como "PRL de la banda correspondiente a GH" o "correspondiente a la albúmina". Un aspecto importante es el de que se probó la bioactividad de las diversas formas inmunorreactivas de la prolactina con el bioensayo de glándula mamaria, pudiendose comprobar que la PRL no sólo varía en estructura sino también en su potencia para llevar a cabo una función. Con los resultados obtenidos se hizo el análisis de cocientes de bioactividad/inmunoactividad (BA/IA) de la PRL, y se encontró que éste era muy variable. La referencia utilizada fue la de un standard de PRL del NIH con un valor de 1, y en las muestras obtenidas, había formas que variaban de 2.7 a 11.9, siendo las variantes obtenidas de machos las de menor cociente y de ratas múltíparas las de mayor. Esta manera de caracterizar a las diferentes variantes de la prolactina por su efectividad en diversos bioensayos se ha mantenido hasta ahora para poder tratar de asignar la importancia funcional a las variantes de la prolactina.

En una caracterización extensa de los pesos moleculares de las prolactinas en medios de cultivo de AH de rata, se han reportado bandas inmunorreactivas de >100, 72, 42, 37, 32 y 25KD que varían en concentración según los tratamientos utilizados, y los autores que lo reportan. En un trabajo [Shah y Hymer 1989] se caracterizaron todas las bandas inmunorreactivas a PRL en homogenados de AH de rata Fisher 344, se encontraron en condiciones no reductoras diversos grupos con pesos moleculares de 97k a 17k, siendo en total 13 bandas; en la región de los agregados se encontraron 8 bandas con pesos de 97k a 34k, todas estas bandas desaparecieron cuando se analizaron en condiciones reductoras lo cual indica que están unidas por puentes disulfuro. En otro trabajo sin embargo [Mena et al 1992], el tratamiento de medios de cultivo con agentes reductores no hace desaparecer algunas bandas inmunorreactivas a prolactina con un peso de 41-45KD.

Por último, dentro de las variantes "grandes", existe una PRL 25K (en murinos) cuya estructura es muy similar a la de la PRL 23K,

el origen de esta variante pudiera deberse a que no se removiera total o parcialmente el último intrón; tanto la inmunoreactividad de esta variable como su actividad en el ensayo de buche de pichón son muy bajos [Sinha y Gilligan 1985, ver Sinha 1992].

Cambiando hacia otro tipo de variantes, se han reportado formas glicosiladas (G-PRL). La primera caracterización [Lewis et al 1984] fue la de una G-PRL ovina en la que se encontró un azúcar con la estructura (glucosamina)₂(manosa)₁(fucosa)₁ unida al grupo β-amido de la Asn 31. La N-glicosilación se da en las proteínas en la secuencia Asn-X-Ser(Thr), y ésta se encuentra en las prolactinas de humano, cerdo, caballo, guajolote y ballena. Sin embargo, a pesar de que en la prolactina de murinos no se encuentra esa secuencia, sí existe una G-PRL en estos animales, cuyos residuos de carbohidratos posiblemente se encuentren unidos al grupo N de la secuencia Asn-X-Cys, o bien son O-glicosilaciones en las serinas o treoninas. La actividad de la G-PRL en diversos bioensayos es menor (a veces igual) a la de la PRL 23K, en tanto que su inmutividad y su unión a receptores son claramente menores [Smith and Norman 1990, Sinha 1992].

Por otro lado, se ha reportado la existencia de una PRL fosforilada [Oetting et al 1986] en rata. Con la técnica de electroforesis de dos dimensiones, se encontraron tres variantes de PRL idénticas en peso, pero con diferente punto isoeléctrico, siendo ácidas las tres. En la rPRL existen 24 aminoácidos fosforilables, pero existen sólo tres secuencias con altas posibilidades de ser fosforiladas por cinasas conocidas: Asn-Glu-Ser(161)-Gln por la caseína cinasa, Arg-Arg-Asp-Ser(178)-His por la cinasa A, y Lys-Ile-Ile-Ser(134)-Glu por la cinasa I dependiente de proteasa. En el estudio, la variante "1" no se encontraba fosforilada, y las "2" y "3" sí lo estaban, siendo la 3 la más ácida, lo que parece indicar una posible fosforilación secuencial.

En otro tipo de variantes se encuentran las isoformas que presentan modificaciones en la estructura primaria. En 1983 se reporta una prolactina bovina sin un puente disulfuro [ver Lewis 1984] que normalmente se establece entre las cisteínas 58 y 173; la bioactividad de esta variante no se ha estudiado. Por otra parte, se ha encontrado que la PRL puede sufrir deamidación, la cual se da por al eliminar el grupo amido de las asparaginas y glutaminas; se ha reportado su existencia en varias especies, y se sabe que las formas

deamidadas tienen menor efecto en los bioensayos comparadas con la PRL 23K [Sinha 1992].

En el caso de los monómeros más pequeños que 23KD (que algunos denominan "submonómeros"), se han reportado la existencia de varios de ellos. En un trabajo hecho con homogenados de AH [Shah y Haymer 1989] se reportaron tres bandas inmunorreactivas a PRL en condiciones no reductoras, con pesos de 22, 20 y 17KD, aunque también parece haber pequeñas bandas en la región de 15 a 4KD. En el estudio de las mismas muestras, pero en condiciones reductoras, se mostró un aumento en la banda correspondiente a la 23k, pero también aumentaron en intensidad las bandas de 20 y 22k, y aparecieron unas en las zonas de 15 y 13k. Con otros enfoques experimentales se ha corroborado la secreción de diversas formas submonoméricas de la PRL bajo distintas condiciones fisiológicas [Mena et al 1992].

En otro trabajo [Sinha y Jacobsen 1988], se reporta la existencia de una PRL 21k en homogenados de AH de rata y ratones, esta misma banda se pudo separar en 3 componentes del mismo peso pero con pI diferentes y ácidos, aunque se observó que esta molécula se secreta bajo los mismos estímulos que la PRL 23K, no se analizó su actividad biológica; se propone además que esta forma se obtiene por un procesamiento alternativo del mRNA de PRL.

Otro tipo de variante es la llamada prolactina cortada (cPRL) [Mittra 1980a, Sinha y Gilligan 1984] (ver figura 1.3), la cual se encontró primero en homogenados de AH de rata; esta hormona presenta un corte proteolítico en el asa mayor, de tal manera que está formada por dos fragmentos unidos por un puente disulfuro. Se ha mostrado que además de la AH, la glándula mamaria y próstata de la rata contienen enzimas capaces de convertir a la PRL 23K en cPRL [Compton y Witorsch 1984]. Así pues, se generaron grandes cantidades de cPRL con homogenados de glándula mamaria y próstata, con la intención de caracterizarla inmunológica y bioquímicamente. Con respecto a su estructura, se encontró que el segundo fragmento de la cPRL comienza con la serina 149. En cuanto a su actividad, la cPRL tiene una potencia en los bioensayos similar a la de la PRL 23K, tanto en el ensayo de células Nb2 [Vick et al 1987] como en ensayos mitogénicos y lactogénicos [Clapp et al 1988], sin embargo su inmunoreactividad es menor. Como una indicación indirecta de la importancia biológica de la cPRL, se estudió la

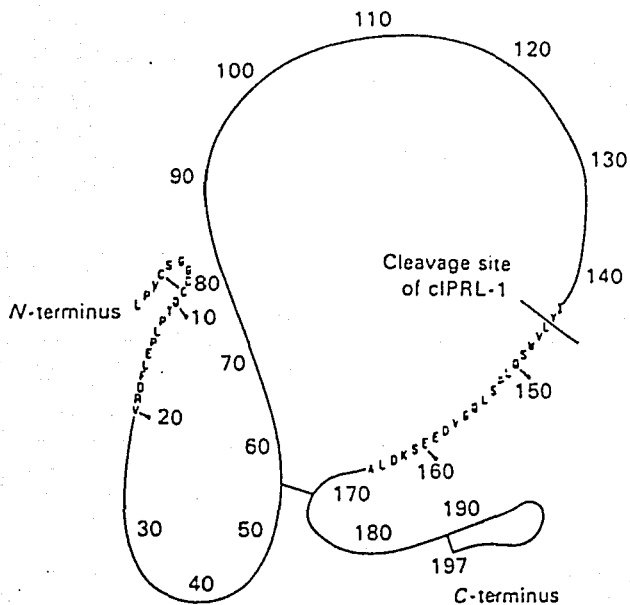


FIGURA 1.3 Representación esquemática de la prolactina, en donde se muestra el sitio de corte para dar lugar a la cPRL. Tomado de Andries et al 1992.

actividad de la(s) enzima(s) cortadora(s) de la PRL, y se encontró que es mayor en la glándula mamaria de los animales lactantes que gestantes [Clapp 1987], por lo que la cPRL pudiera tener una función específica en este periodo fisiológico.

Recientemente se ha obtenido un resultado muy importante para la dilucidación del papel de la cPRL. Con agregados de células adenohipofisarias, se demostró que la cPRL tiene actividad mitogénica sobre los gonadotropos y tirotropos *in vitro* [Andries et al 1992], actividad que **no** posee la PRL 23K, así que el corte proteolítico puede ser tomado como una vía de activación.

Ahora bien, la reducción química de la cPRL da lugar a dos fragmentos [Mittra 1980a], uno de 16KD (PRL 16K) correspondiente a la parte amino terminal de la PRL, y el fragmento carboxilo con un peso de 7KD. Si bien es clara la existencia de estos fragmentos obtenidos en condiciones reductoras, son pocos los trabajos que reportan su existencia en condiciones no reductoras. El análisis parcial de la secuencia de los productos de reducción de la cPRL, dio como resultado que el corte proteolítico se da entre los aminoácidos 145 y 146 [Andries et al 1992], aunque en el mismo trabajo reportan que se encontró una forma un poco más pequeña, lo cual abie dos posibilidades a) la cPRL puede tener el corte en dos sitios muy cercanos uno de otro, o b) después de la reducción, se remueven unos pocos aminoácidos del fragmento carboxilo. Es así que la reducción de la cPRL genera por lo menos tres fragmentos: uno de 17K, otro de 16K y uno de 8K.

De estos fragmentos, el más estudiado es la PRL 16K; esta variante tiene una inmunorreactividad cruzada muy pobre (1.8%) con respecto a la PRL 23K, analizada con los anticuerpos anti PRL 23K [Clapp et al 1988]. Ahora bien, el primer estudio de la bioactividad fue *in vivo* [Mittra 1980b], mostrandose que tenía un efecto mitogénico sobre la glándula mamaria de rata, efecto no compartido con la PRL 23K. Sin embargo, con estudios *in vitro* se ha observado que su potencia tanto mitogénica como lactogénica es menor comparada con la PRL 23K [Clapp et al 1988].

Sin embargo, se ha mostrado que la PRL 16K es capaz de inhibir *in vitro* la proliferación de células endoteliales [Ferrara et al 1991] efecto **no** compartido con la PRL 23K, este efecto es mediado por sitios de unión específicos para la PRL 16K en las células endoteliales

[Clapp y Weiner 1992]. De nuevo, el corte protelítico y la posterior reducción de la PRL puede ser una vía de activación. Esta manera de obtener productos activos no es novedosa (existe con la GH) [Mittra 1984], sin embargo no había sido mostrada para la prolactina.

Así pues, la existencia de variantes moleculares de la prolactina podría explicar parcialmente la gran cantidad de efectos atribuidos a esta hormona, pero es aún más importante el hecho de que la PRL 23K puede ser considerada también una prohormona, pues su procesamiento da lugar por lo menos a dos formas (cPRL y PRL 16K) que tienen bioactividad propia.

2 OBJETIVO

De todas las variantes moleculares que se han descrito de la prolactina, nuestro grupo de investigación está especialmente interesado en el estudio de la PRL cortada (cPRL) y de la PRL 16K. Como se recordará, la cPRL es la PRL nativa a la que se realizó un corte en el asa mayor, quedando dos fragmentos unidos por un puente disulfuro: el carboxilo terminal de 7KD y amino terminal de 16KD. Al fragmento amino terminal que se obtiene al reducir químicamente esta molécula, se llama PRL 16K.

Estas formas de prolactina son interesantes de estudiar, entre otras cosas, por el hecho de que ambas poseen efectos específicos (por lo menos *in vitro*) a cada una de ellas, los cuales no son compartidos con los otros miembros de la familia de la prolactina.

Hasta ahora existen pocos grupos enfocados en el estudio tanto de la cPRL como de la PRL 16K, por lo cual existe escasa información sobre la fisiología de estas moléculas. Entonces, como primer paso hacia su caracterización biológica, se decidió estudiar la secreción de estas proteínas por las células adenohipofisarias. Se trataron de analizar diferentes aspectos a la vez; primero, saber si estas moléculas son secretadas diferencialmente por animales en diversos estados fisiológicos; y segundo, cómo es regulada su secreción por secretagogos conocidos de la PRL 23K.

Para cumplir con estos objetivos, se realizaron cultivos primarios de células adenohipofisarias de rata, y se incubaron en un medio definido conteniendo alguno, o ninguno de los siguientes fármacos: bromocriptina (BRCY), hormona liberadora de tirotropina (TRH), tetradecanoil forbol acetato (TPA), ionomicina (A23187) y forskolina (FKL). La razón de utilizar dichos secretagogos, es que ya se ha estudiado bien su efecto sobre la secreción de la prolactina "típica", en tanto que la bromocriptina inhibe su secreción, los otros fármacos la estimulan.

En la figura 2.1 se muestra un esquema con algunas de las vías de señalamiento intracelular que, entre otras cosas, tienen un efecto sobre la secreción de prolactina. La acción de los diferentes fármacos utilizados se da en distintos componentes de la célula, pudiendose apreciar todos ellos en la figura 2.1. La TRH se une a sus receptores membranales, la BRCY también se une a receptores membranales,

pero de dopamina (receptores D₂); el TPA activa a la cinasa C (PKC), la FKL activa a la adenilato ciclasa; y por último, el A23187 es un ionóforo que permite el paso del calcio al interior de la célula.

Los distintos grupos experimentales de animales fueron:

- a) machos
- b) hembras en diferentes periodos de su ciclo estral
 - i) diestro
 - ii) proestro
 - iii) estro
- c) hembras ovariectomizadas y estrogenizadas por
 - i) 1 semana
 - ii) 9 semanas

La intención de utilizar todos estos grupos, es la de tener un amplio panorama de estados fisiológicos y patológicos en los cuales se ha estudiado la secreción de la prolactina. Es bien conocido que los niveles de la PRL 23K varían durante el ciclo estral, pero ¿lo hacen también las variantes cPRL y PRL 16K? Los animales estrogenizados desarrollan prolactinomas ¿éstos son capaces de secretar las variantes de prolactina que nos interesan? Y si lo hacen ¿en mayor o menor cantidad relativa que los animales intactos? ¿Cambian la responsabilidad de las células a algún secretagogo en diferentes estados fisiopatológicos? Estas y otras preguntas pretenden ser respondidas (al menos parcialmente) con los experimentos realizados para esta tesis.

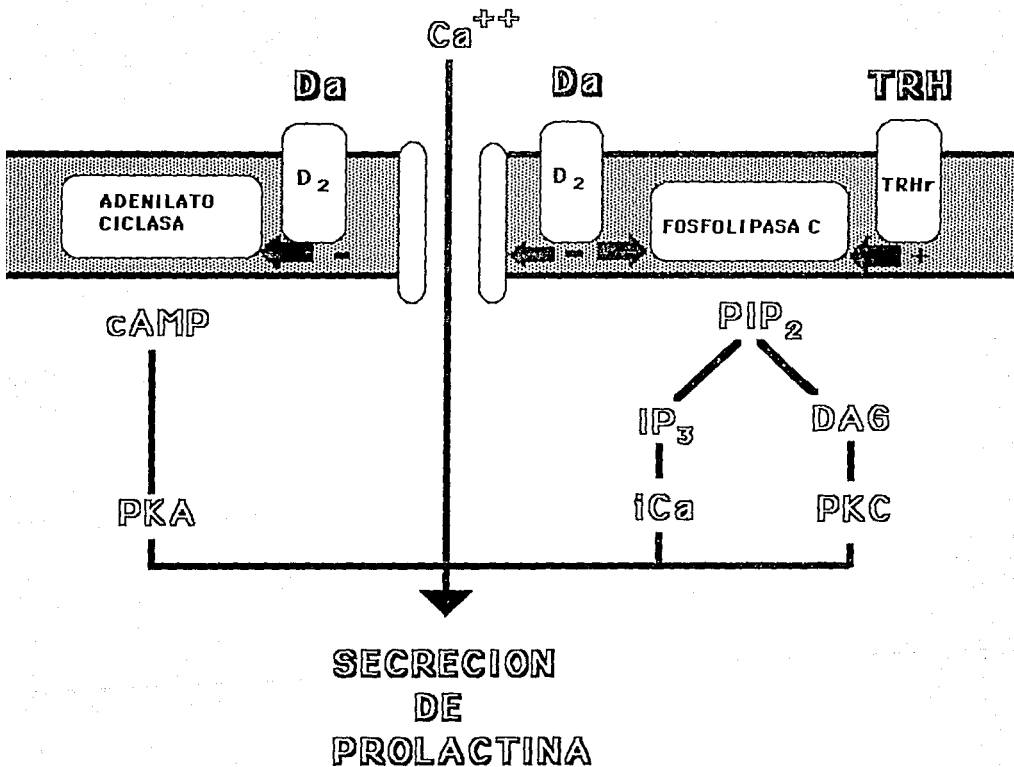


FIGURA 2.1 Mensajeros intracelulares. Aquí se representan algunas de las vías de señalización intracelular que se llevan a cabo para secretar a la prolactina. En el texto principal se mencionan los sitios en los que actúan los fármacos utilizados.

3 METODOLOGIA

Con la intención de no interrumpir la ilación de ideas, en esta sección explicaré rápidamente la metodología utilizada para hacer el presente trabajo, pero para una explicación detallada véase el apéndice A.

Animales. Para este estudio se utilizararon ratas Wistar; se usaron ratas hembras en los diferentes periodos de su ciclo estral (diestro, proestro y estro), ratas hembra ovariectomizadas y estrogenizadas, y ratas macho; todos los animales fueron adultos jóvenes (ca. 200 g de peso corporal). Los animales fueron mantenidos con alimento preparado para roedores y agua *ad libitum* en un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Ciclo estral. Al grupo de ratas hembra intactas se les monitoreó su ciclo estral por medio de citología vaginal, hasta que las ratas hubieran completado al menos tres ciclos. Otro grupo experimental fue el de ratas hembra ovariectomizadas a las cuales se les indujo un prolactinoma con la implantaron subcutánea de cápsulas conteniendo 17 β -estradiol. Se utilizaron dos grupos de animales estrogenizados, uno con un corto periodo (1 semana) y otro con uno largo (9 semanas). A los machos, por su parte, no se les hizo ningún seguimiento.

Obtención del órgano. A los animales de todos los grupos se les extrajo la adenohipófisis, para cada experimento se utilizaron tres o cuatro animales, debido a la pequeña cantidad de PRL 16K secretada. A esta poza de tejido se le dispersó enzimáticamente con colagenasa tipo I, y las células así obtenidas se sembraron en DMEM con suero por 24 horas, a 37 °C y 5% CO₂.

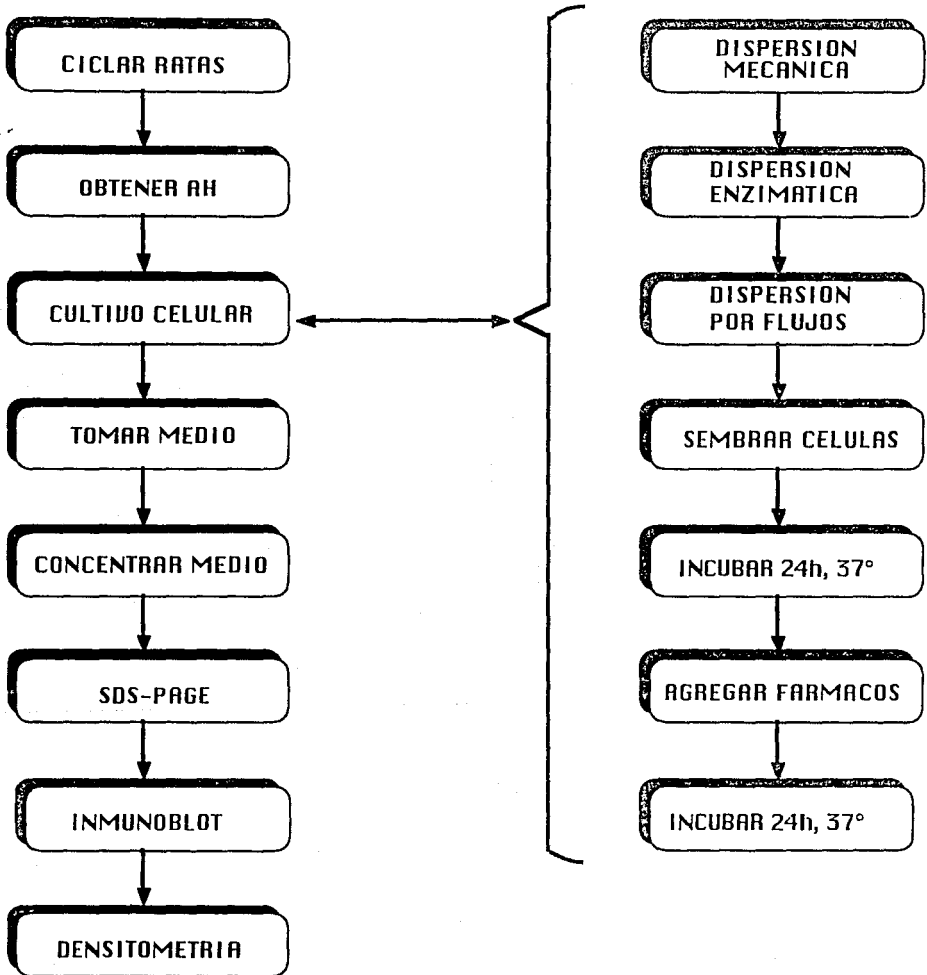
Posteriormente se cambia el medio por DMEM (sin suero) con los diferentes fármacos: bromocriptina 1 μ M (BRCY), hormona liberadora de tiotropina 1 μ M (TRH), 12 *O*-tetradecanoil forbol 13-acetato 1 μ M (TPA), forskolina 10 μ M (FKL); y ionomicina 20 μ M (A23187). Cada plato contenía uno de los secretagogos ya mencionados, y el cultivo control sólo tenía DMEM sin ningún fármaco. El tiempo de incubación con los secretagogos fue de 24 h.

Métodos analíticos. Los medios de cultivo se concentraron, y se corrieron en SDS-PAGE tanto en condiciones no reductoras como en condiciones reductoras. Terminando la corrida, los geles se

electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa. Posteriormente los papeles se incubaron con suero hiperinmune anti PRL 16K de rata levantado en conejo, y se revelaron con el método de la fosfatasa alcalina.

Por último, se cuantificaron por medio de densitometría las bandas inmunorreactivas a prolactina encontradas en las zonas correspondientes a los 23, 19, 16 y 15 kD de peso molecular.

Metodologia



4 RESULTADOS

Como ya se mencionó, el método utilizado para la detección y cuantificación de las diferentes variantes de prolactina fue el de la inmunotransferencia; éste es un método semicuantitativo que no permite comparaciones precisas entre diferentes inmunotransferencias, sin embargo sí es confiable la comparación dentro de una misma transferencia. Esta limitante causa que las cuantificaciones de las diferentes bandas inmunorreactivas tengan una dispersión muy grande, por lo cual tomé la decisión de presentar los resultados principalmente como el porcentaje de prolactina secretada al medio con respecto a su grupo control (teniendo éste por lo tanto el valor de 100%). El medio de cultivo del grupo control se colocó **siempre** en la misma transferencia que los cultivos experimentales (ver figura 4.1).

Esta forma de presentar los resultados tiene la peculiaridad de resaltar el efecto de un fármaco al compararlo contra su grupo control. Pero, como es importante presentar los valores individuales de todas las determinaciones para su discusión, he colocado en el cuerpo principal de los resultados algunos de esos datos, a los cuales me refiero directamente. Las cuantificaciones se muestran en su totalidad en un apéndice (Apéndice B), de tal manera que el lector pueda referirse a ellas.

Otro aspecto importante a tomar en cuenta para analizar los resultados, es que las inmunotransferencias se estandarizaron para observar la presencia y la variación de la PRL 16K, la cual se encuentra en muy poca cantidad en los medios de cultivo. Desgraciadamente dicha estandarización implicó aumentar mucho la cantidad de muestra para cada determinación; esto provocó una sobrecarga de la PRL 23K, disminuyendo con esto la sensibilidad a los cambios provocados por los fármacos en la secreción de esta variante en particular, ya que casi siempre se obtuvieron resultados fuera de la región lineal de la relación concentración/densidad óptica.

En general los resultados obtenidos muestran que tanto la cPRL como la PRL 16K son secretadas por las células adenohipofisarias de rata. De estas variantes, los resultados más importantes se obtuvieron con la cPRL; a saber, esta variante se secreta diferencialmente según el estado fisiológico de los animales. En las ratas ciclientes el pico de secreción de esta forma de prolactina se da

durante el diestro; y para el caso de hembras ovariectomizadas y estrogenizadas, los valores más bajos de secreción se dieron cuando los animales tuvieron un periodo largo de estrogenización. Todo esto parece indicar una regulación negativa de los estrógenos en la actividad de corte sobre la prolactina. Por otra parte, el sitio específico de corte parece estar estrechamente regulado: en las hembras ciclantes se corta la prolactina hacia la forma que da lugar a la PRL 16K; mientras que en los machos, y las hembras con un tratamiento estrogénico se corta la prolactina hacia la forma precursora de la PRL 15K.

Todos estos resultados, además del efecto de los diferentes secretagogos sobre la secreción de las diferentes formas de prolactina analizadas, se explican ampliamente en los siguientes apartados.

4.1 RATAS MACHO

A pesar del problema de cuantificación ya discutido, se puede hacer una comparación gruesa de las cantidades encontradas en los diversos grupos experimentales. En los cultivos obtenidos de adenohipófisis de machos, todas las formas de prolactina analizadas se encontraron en menor cantidad en comparación con los otros grupos; a excepción de la PRL 15K, cuya secreción medida en condiciones reductoras (CR) fue máxima en ratas macho y estrogenizadas, sugiriendo entonces una alta proporción de la correspondiente PRL cortada.

Analizando los patrones de secreción de la PRL 23K, se puede notar que los efectos estimulantes obtenidos por los secretagogos son consistentes cualitativamente con lo reportado anteriormente para el TRH, TPA y FKL (fig 4.3) [Benker et al 1990, Osborne y Tashjian 1981]; por su parte, la BRCY tuvo un efecto inhibitorio muy pobre.

El A23187 por ser un ionóforo de calcio, actúa como un estimulador de la secreción de PRL en periodos cortos; sin embargo, en los cultivos que se trataron con este fármaco se encontraron menores cantidades de las variantes de prolactina que en sus cultivos control. Esto puede ser debido a que la entrada masiva de calcio a la célula por un periodo tan prolongado (24 h), pudiera resultar tóxico. De hecho es posible observar un cambio morfológico en las células tratadas con este ionóforo (fig 4.4).

La banda correspondiente a la PRL 16K no fue detectada bajo condiciones no reductoras en este grupo experimental (fig 4.7), sin poderse saber si fue debido a que su cantidad está por debajo de la sensibilidad del método de detección, o simplemente no se produce. Sin embargo, en condiciones reductoras se obtuvieron las bandas correspondientes a la PRL 16K y a la PRL 15K (fig 4.8); cabe recordar que estas variantes se obtienen como producto de la reducción de la prolactina cortada, como lo demostró el grupo de Deneff [Andries et al 1992]. Se puede observar que la cantidad secretada de PRL 16K es aproximadamente 100 veces menor que la de PRL 23K. Debe notarse que si bien la cantidad de cPRL que da lugar a la PRL 16K es menor en este grupo que en las ratas hembra, la cPRL precursora de la PRL 15K tiene un nivel de secreción comparativamente alto.

Observando el efecto de los secretagogos sobre la secreción de estas dos variantes (fig 4.9), salta a la vista primero que la BRCY sí es efectiva para inhibir la secreción de la cPRL (PRL 16K y 15K en CR), a diferencia de lo que pasa con las PRLs 23K y 19K (ver adelante). El resto de los fármacos, por su parte, aumentan su secreción de manera eficaz. A pesar de la gran diferencia en cantidad, los perfiles de respuesta de secreción de la PRL 16K y la PRL 15K en CR son iguales, como es de esperar en el caso de provenir ambos del mismo precursor (cPRL).

Como ya se mencionó, se pudo detectar en las inmunotransferencias una banda inmunorreactiva a prolactina en el área correspondiente a 19.5 KD (PRL 19K), por la naturaleza de los métodos experimentales usados no se puede saber si esta banda corresponde a la PRL 21K ya reportada pero con algunos aminoácidos menos, o bien es una isoforma no reportada previamente. De cualquier manera aunque no es parte del objetivo de esta tesis, presento los datos obtenidos para que sirvan como una caracterización preliminar de esta proteína.

La concentración de PRL 19K en el medio de cultivo en este protocolo experimental se encuentra en una proporción 100 veces menor que la PRL 23K (fig 4.5); y se encontró que la cantidad de PRL 19K secretada aumenta con los tratamientos de TRH, TPA, FKL y A23187, pero la BRCY es ineficaz para inhibir su secreción (fig 4.6).

4.2 RATAS HEMBRAS CICLANTES

Como ya se mencionó, las inmunotransferencias fueron estandarizadas para observar cambios en la PRL 16K y en la cPRL, lo cual disminuyó la sensibilidad a los cambios en la PRL 23K por su gran cantidad; es quizá por eso que no se aprecian cambios de secreción de esta variante durante el ciclo estral (fig 4.2).

Por otra parte, la secreción de la PRL 23K bajo los diferentes retos farmacológicos es, en general, consistente con lo reportado en la literatura (fig 4.10). Pero si se comparan los efectos farmacológicos durante los diferentes periodos del ciclo estral, se puede observar que si bien la respuesta celular ante TRH, TPA, FKL y A23187 no varía con el ciclo; la respuesta a BRCY sí lo hace: durante el proestro no se da la inhibición de la secreción de PRL 23K por este agonista dopaminérgico. Esta falta de respuesta durante el proestro ya ha sido reportada anteriormente utilizando fragmentos de adenohipófisis profundos con medio conteniendo dopamina [Brandi et al 1990].

Por su parte, en los medios de cultivo de este grupo experimental, la PRL 16K se encontró presente en una concentración cerca de 200 veces menor que la PRL 23K (fig 4.7), cantidad que no varió notablemente en los diferentes periodos del ciclo estral. Su respuesta a los tratamientos, sin embargo, no es la misma durante todo el ciclo (fig 4.12); los efectos de la TRH y del TPA son mucho mayores durante el diestro que en el proestro o el estro. Notablemente el A23187 es más efectivo durante el estro, a pesar del posible daño que ya mencioné. Otro dato importante de resaltar, es el hecho de que la BRCY es muy efectiva para la inhibición de la secreción de la PRL 16K, incluso durante el proestro, que como se recordará es el periodo en el que este fármaco no es capaz de inhibir la secreción de la PRL 23K.

Ahora bien, analizando a la PRL 16K encontrada en condiciones reductoras, esto es, la secretada como tal más la obtenida por la reducción de la cPRL, se obtuvo en una cantidad aproximadamente 20 veces mayor que la PRL 16K en CNR (fig 4.8), y ≈ 10 veces menor que la PRL 23K. A diferencia de las otras variantes ya discutidas, la cantidad de cPRL encontrada sí varió durante el ciclo estral; se encontró una gran cantidad durante el diestro, menos en el proestro y aún menos en el estro. Esta variación en la secreción puede verse

como un cambio en la actividad proteolítica de la o las enzimas involucradas en el procesamiento de PRL 23K a cPRL.

Además de la diferencia en producción de la cPRL durante el ciclo estral, la respuesta celular de secreción de esta variante es ligeramente mayor durante el diestro (fig 4.12); sin embargo, la magnitud de respuesta ante los diferentes retos farmacológicos es menor a la encontrada para la PRL 16K en CNR.

Por su parte, la PRL 15K se encontró en pocos casos y solamente analizando los medios de cultivo en condiciones reductoras; su cantidad es pequeña, cerca de 20 veces menor a la de la PRL 16K (fig 4.8) y su perfil de secreción es parecido al de la PRL 16K (fig 4.13). Pero lo más importante es que sólo fue detectable en cuatro de los 13 experimentos realizados.

Con respecto a la PRL 19K, esta se encontró en cantidades de 10 a 20 veces menores que la PRL 23K (fig 4.5), siendo entonces secretada proporcionalmente en mayor cantidad en las hembras que en los machos (en estos es cerca de 100 veces menor que la PRL 23K). Ahora bien, la cantidad secretada de PRL 19K aumenta con el tratamiento del medio de cultivo con un agente reductor, especialmente durante el diestro; este resultado sugiere fuertemente la existencia de heteropolímeros, uno de cuyos componentes sería la PRL 19K; o alternativamente, que existe una cPRL que daría lugar a esta variante.

Ahora bien, con respecto al efecto de los fármacos sobre la secreción de la PRL 19K (fig 4.11), se puede notar que los diferentes secretagogos parecen disminuir su efectividad si se analizan las muestras en condiciones reductoras, lo cual significa que los agregados de los cuales proviene la PRL 19K extra no son muy afectados en su secreción por los fármacos utilizados.

4.3 HEMBRAS OVARIECTOMIZADAS Y ESTROGENIZADAS

Los niveles encontrados de PRL 23K en los medios de cultivo son básicamente los mismos que los encontrados en las ratas ciclantes (fig 4.2), y su perfil de respuesta a los fármacos es muy similar al encontrado en el grupo de los animales durante el proestro (fig 4.14); esto es, todos los fármacos tienen poco efecto sobre la secreción de esta forma de prolactina. El hecho de que se parezcan estos resultados a los obtenidos durante el proestro hace pensar en el

posible papel de los estrógenos en este fenómeno, cabe recordar que durante el proestro se presenta un pico de secreción de estrógenos, aunque sin llegar a los niveles farmacológicos a los que estuvieron sometidos los animales de este grupo.

Un resultado muy importante, fue el que la PRL 16K (en condiciones no reductoras) no fue detectada en el grupo de animales con un tratamiento estrogénico (fig 4.7); la forma que apareció principalmente fue la PRL 15K, en niveles comparables a los de la PRL 16K en los otros grupos experimentales con hembras ciclantes. Esto puede señalar la existencia en los animales estrogenizados de algún mecanismo capaz de cortar a la prolactina en un sitio tal de obtener a la PRL 15K y no a la PRL 16K.

La cantidad de la PRL 15K es aproximadamente 100 veces menor que la de PRL 23K, y no aumenta con el tratamiento reductor de los medios de cultivo (figs 4.7 y 4.8). Viendo el perfil de respuesta de secreción de esta variante (fig 4.17) se puede notar el gran efecto que tienen los fármacos, principalmente el TPA y la FKL en el grupo con un periodo corto de estrogenización, y al TRH con un periodo largo.

Por otra parte, la cPRL (analizada como PRL 16K en CR) encontrada en el medio fue ≈ 50 veces menor a la PRL 23K en los mismos cultivos (fig 4.8). La cantidad de cPRL es claramente menor en el grupo de una semana de estrogenización que en los de las ratas ciclantes, y la cantidad de esta variante en el grupo de 9 semanas de estrogenización es aún menor. Esto sugiere de nuevo, la regulación negativa por parte de los estrógenos sobre la secreción de la cPRL.

Por último, la PRL 19K se encontró en niveles menores (5 a 10 veces) a los encontrados en las hembras ciclantes (fig 4.5), y con respecto a su perfil de respuesta farmacológica, no se presentan cambios llamativos con respecto a la PRL 23K (fig 4.15), excepto que parece responder un poco mejor a la BRCY con el tratamiento estrogénico, y a la FKL con poco tiempo de estrogenización.

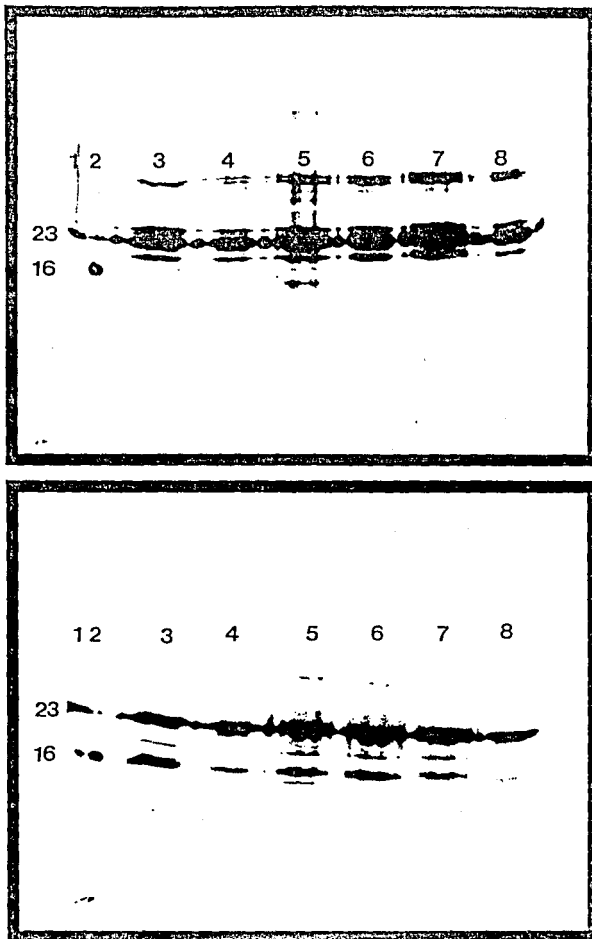


FIGURA 4.1 Aspecto de las inmunotransferencias. Carriles: 1.-standard de PRL 23K 2.-standard de PRL 16K 3.-cultivo control 4.-cultivo con BRCY 5.-cultivo con TRH 6.-cultivo con TPA 7.-cultivo con FKL 8.-cultivo con A23187. 23: Peso molecular de 23 000 daltones. 16: Peso molecular de 16 000 daltones. Panel superior: condiciones no reductoras, panel inferior: condiciones reductoras

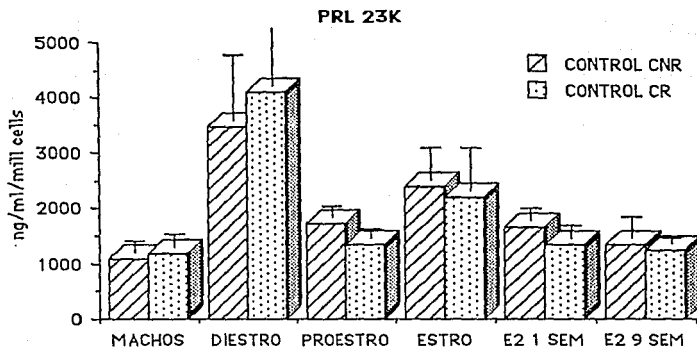


FIGURA 4.2 Secreción espontánea en 24h de la PRL 23KD por células adenohipofisarias. Los valores son los obtenidos en medios control de todos los grupos experimentales. E2 1 SEM : ratas ovariectomizadas y estrogenizadas por una semana; E2 9 SEM: ratas ovariectomizadas y estrogenizadas por nueve semanas.

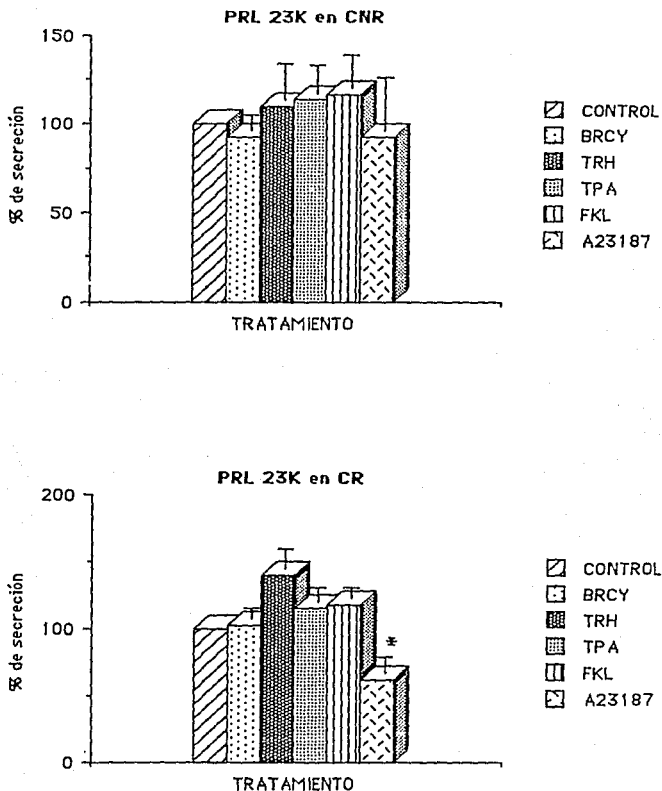


FIGURA 4.3 Secreción de la PRL 23KD por células adenohipofisarias de ratas macho en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos por 24 horas: BRCY $1\mu\text{M}$, TRH $1\mu\text{M}$, TPA $1\mu\text{M}$, FKL $10\mu\text{M}$ y A23187 $20\mu\text{M}$. Medios de cultivo analizados bajo condiciones no reductoras (CNR) y en condiciones reductoras (CR). Los resultados están expresados como el porcentaje de secreción con respecto a su valor control; los valores individuales se encuentran reportados en el apéndice B. * significancia al 95%. $n = 4$.

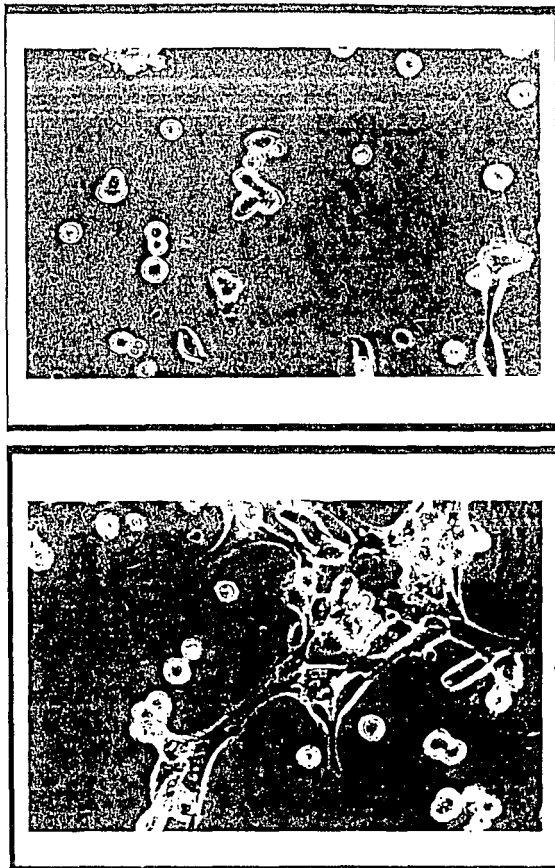


FIGURA 4.4 Morfología celular. En el panel superior se ven las células después de 24 horas de tratamiento con el ionóforo de calcio A23187, compárese con el aspecto de las células en el cultivo control (panel inferior).

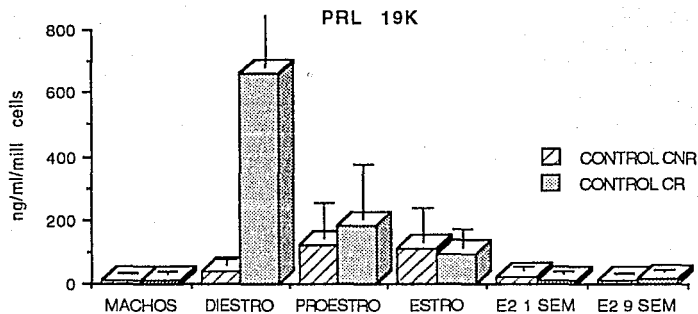


FIGURA 4.5 Secreción espontánea de la PRL 19KD por células adenohipofisarias. Los valores son los obtenidos por los cultivos control de todos los grupos experimentales.

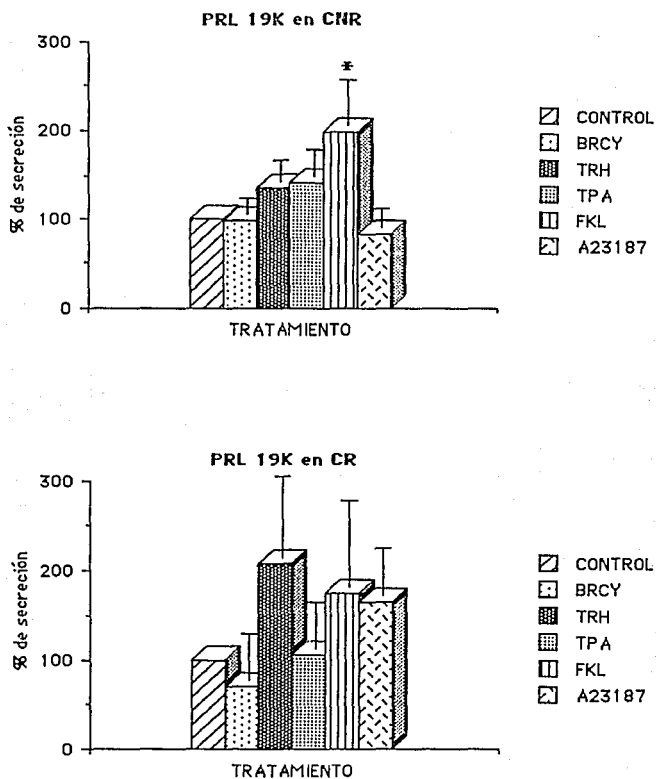


FIGURA 4.6 Secreción de la PRL 19KD por células adenohipofisarias de ratas macho en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. * significancia al 95%. n = 4.

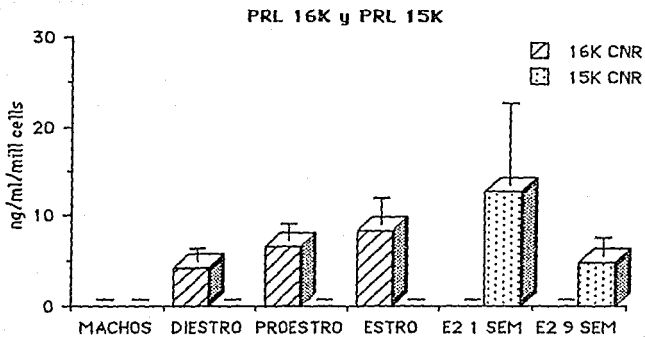


FIGURA 4.7 Secreción espontánea de la PRL 16KD y PRL 15KD por células adenohipofisiarias. Los valores son los obtenidos por los cultivos control en condiciones no reductoras de todos los grupos experimentales.

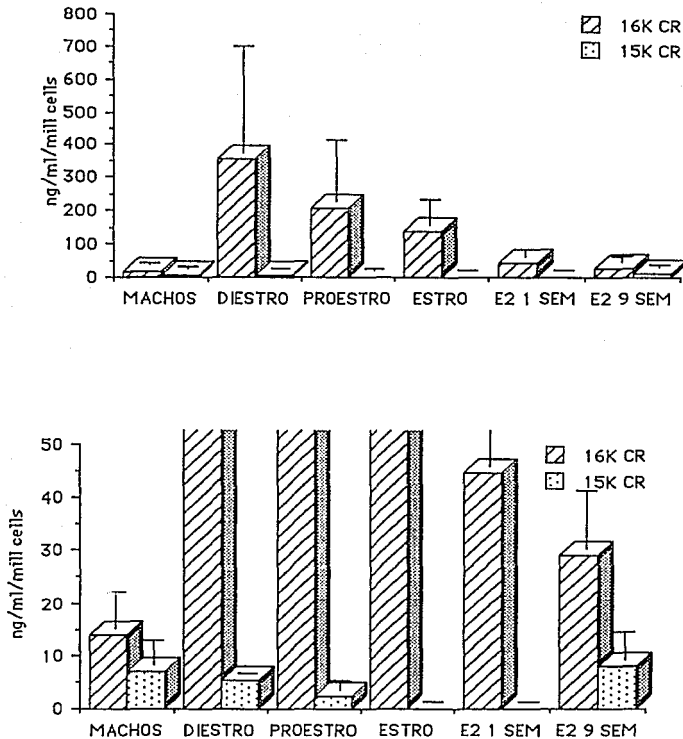


FIGURA 4.8 Secreción espontánea de la PRL 16KD y PRL 15KD por células adenohipofisarias. Los valores son los obtenidos en los medios control separados tanto en condiciones reductoras como no reductoras de todos los grupos experimentales. La figura inferior es la misma del panel superior pero con una escala mayor para poder apreciar los valores de ambas variantes.

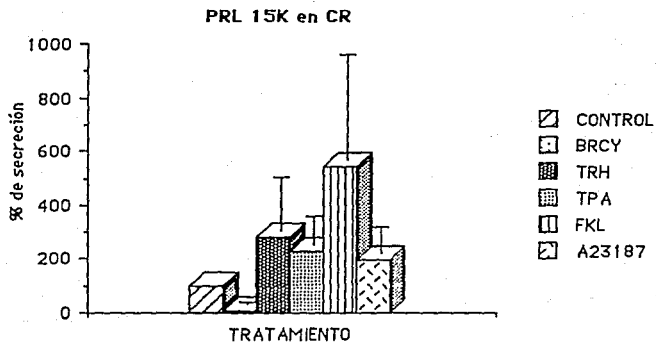
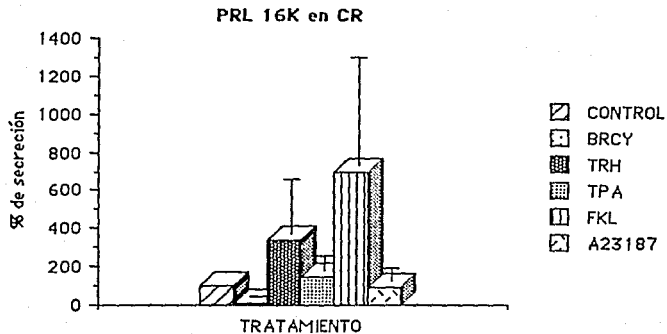


FIGURA 4.9 Secreción de la PRL 16KD y PRL 15 KD por células adenohipofisarias de ratas macho en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. Ninguna de ambas bandas fue detectada en los medios analizados en condiciones no reductoras. Para la PRL 16K $n = 4$, y para la PRL 15K $n=3$.

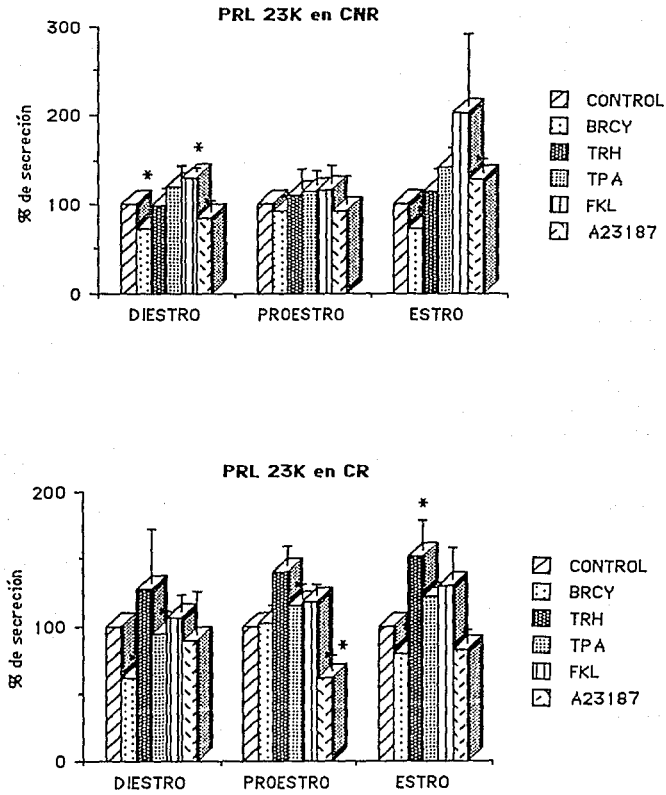


FIGURA 4.10 Secreción de la PRL 23KD por células adenohipofisarias de ratas hembra en diferentes periodos de su ciclo estral en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. * significancia al 95%. Para diestro n = 5, proestro y estro n = 4.

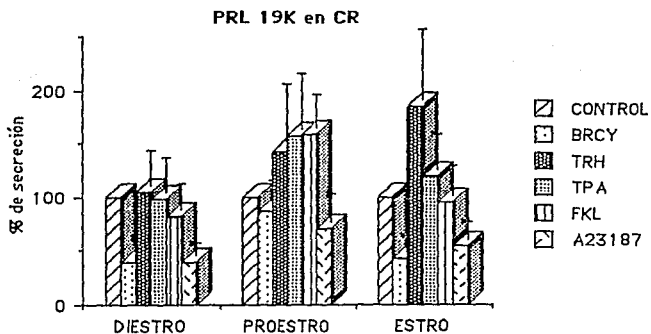
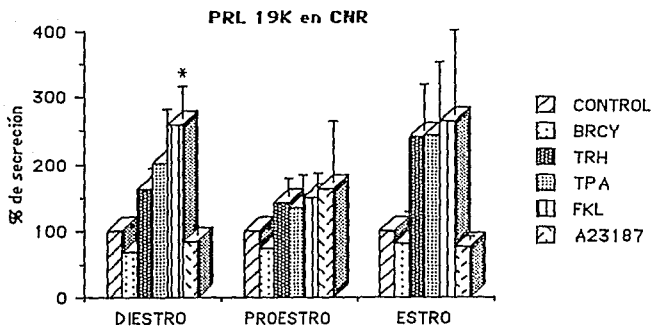


FIGURA 4.11 Secreción de la PRL 19KD por células adenohipofisarias de ratas hembra en diferentes periodos de su ciclo estral en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. * significancia al 95%. Para diestro $n = 5$, proestro y estro $n = 4$.

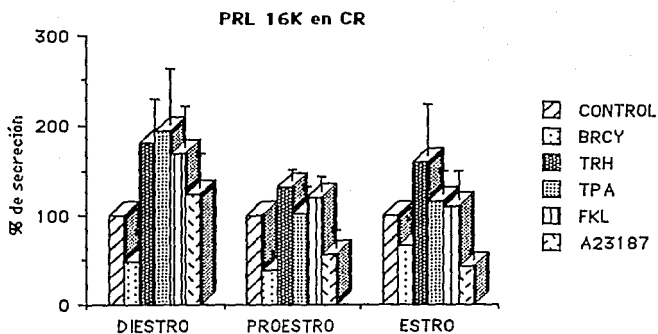
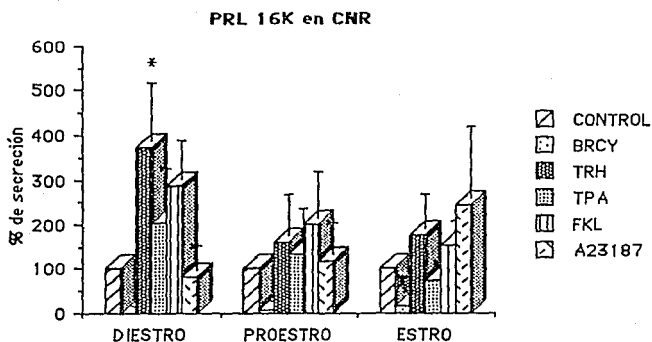


FIGURA 4.12 Secreción de la PRL 16KD por células adenohipofisarias de ratas hembra en diferentes periodos de su ciclo estral en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. * significancia al 95%. En condiciones reductoras, para diestro n = 5, proestro y estro n = 4; y en condiciones no reductoras, estro n = 4, y diestro y proestro n = 3.

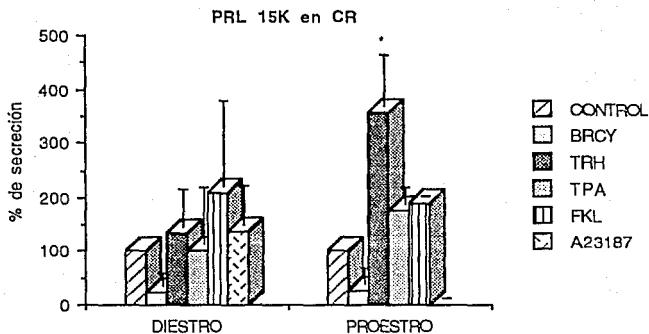


FIGURA 4.13 Secreción de la PRL 15KD por células adenohipofisarias de ratas hembra en diferentes periodos de su ciclo estral en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. En este caso no se detectó esta variante en condiciones no reductoras, y durante el estro en ningún caso. * significancia al 95%. n = 2.

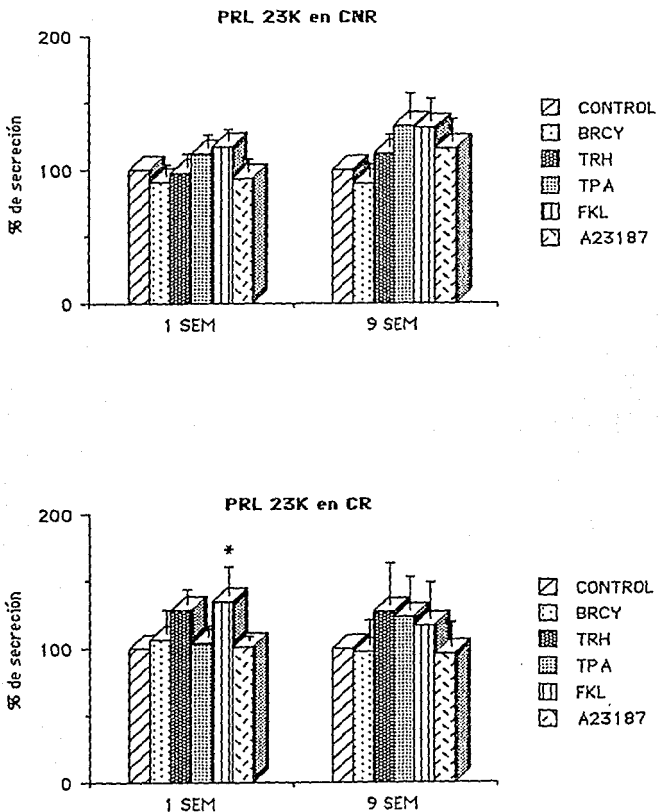


FIGURA 4.14 Secreción de la PRL 23KD por células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas crónicamente tanto por un periodo corto (1 semana) como por uno largo (9 semanas), en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. * significancia al 95%. $n = 3$.

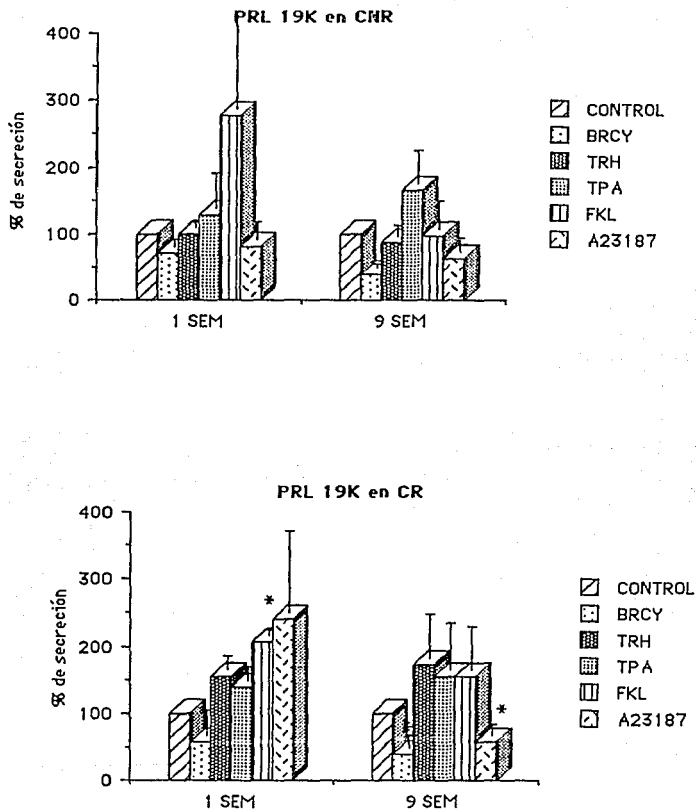


FIGURA 4.15 Secreción de la PRL 19KD por células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas crónicamente tanto por un periodo corto (1 semana) como por uno largo (9 semanas), en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos, . * significancia al 95%. n = 3.

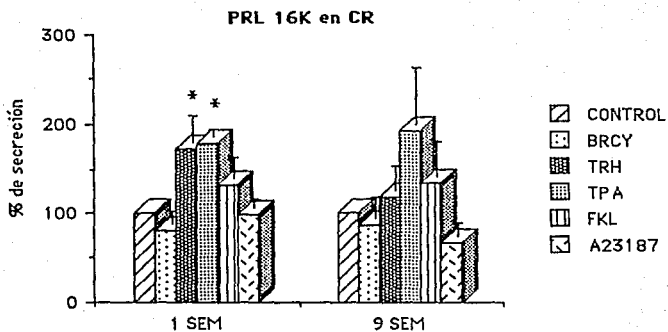


FIGURA 4.16 Secreción de la PRL 16KD por células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas crónicamente tanto por un periodo corto (1 semana) como por uno largo (9 semanas), en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos, * significancia al 95%. n = 3.

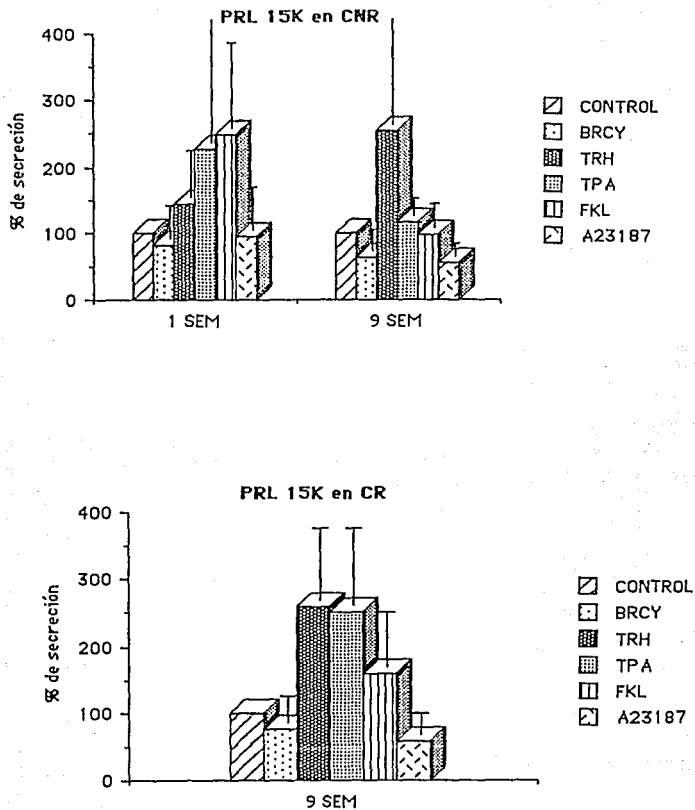


FIGURA 4.17 Secreción de la PRL 15KD por células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas y estrogenizadas crónicamente tanto por un periodo corto (1 semana) como por uno largo (9 semanas), en respuesta a los diferentes tratamientos farmacológicos. $n = 3$.

5 DISCUSION

Ya ha sido reportado que la cPRL se encuentra en homogenados adenohipofisarios [Shah y Hymer 1989] y también que es secretada tanto por fragmentos de adenohipófisis [Mena et al 1992], como de agregados de células adenohipofisarias [Andries et al 1992]; en esta tesis muestro que la cPRL también es secretada por células adenohipofisarias en cultivos primarios. La cPRL, la cual se analizó en este estudio como PRL 16K en condiciones reductoras, aparece indiscutiblemente en todos los grupos experimentales. Si bien no existen diferencias estadísticas entre los grupos, parece apreciarse una diferencia, en donde los niveles más altos de secreción se obtuvieron en el grupo de las hembras ciclantes (fig 4.8), el grupo de los animales estrogenizados aparenta tener niveles menores de secreción; y menor aún en el caso de los machos. Cabe recalcar que estas diferencias son aparentes, la demostración de su existencia queda fuera (por el momento) de la capacidad del método utilizado.

Los valores encontrados para la secreción de la cPRL sugieren una relación entre ésta y los niveles estrogénicos de los animales de los cuales se obtuvieron las células. Al menos en el caso de los diferentes grupos de hembras se puede formular la siguiente hipótesis: a mayor cantidad de estrógenos circulantes, menor cantidad de cPRL secretada.

Ahora bien, se sabe que los estrógenos tienen un efecto aumentando la síntesis y decreción de la PRL 23K, el precursor de la cPRL. Por lo tanto, de ser cierta la hipótesis anteriormente formulada, el efecto estrogénico sobre la cantidad de cPRL encontrada en el medio de cultivo, sería debido posiblemente a la modulación (cambio de actividad) de la enzima cortadora de la prolactina.

Por otra parte, los diferentes estimulantes de la secreción aquí estudiados tuvieron efectos similares tanto sobre la cPRL como sobre la PRL 23K (teniendo una tendencia a aumentar la secreción). En la mayoría de los casos no se obtuvo una diferencia estadística con respecto a los cultivos control; esto pudiera atribuirse al periodo tan prolongado de exposición a los fármacos, que provocaría su degradación y por lo tanto su poca eficacia a largo plazo. Alternativamente, la continua activación de enzimas intracelulares (de la adenilato ciclasa por la forskolina, o la cinasa C por el TPA) causaría su inactivación ("down regulation"). Desgraciadamente si se

disminuye el tiempo de incubación, la cantidad secretada de las variantes que nos interesan sería tan minúscula que no serían detectables por el método utilizado.

Sin embargo, analizando el efecto de la bromocriptina (BRCY) sobre la inhibición de la secreción de la prolactina, se obtuvo un resultado interesante. Durante el proestro, la BRCY no es tan efectiva inhibiendo la secreción de la PRL 23K como lo es durante el diestro y el estro [Brandi et al 1990, y la presente tesis], ni tampoco es capaz de inhibir la secreción de la PRL 23K en los machos. Pero la BRCY tuvo una marcada tendencia (de nuevo, una diferencia no estadísticamente significativa) a inhibir la secreción de la cPRL tanto en el grupo de hembras en proestro como en el de los machos.

Comparando el efecto de la BRCY sobre la secreción de la cPRL entre los diferentes grupos, se encontró que existe un adiferencia importante. Este agonista dopaminérgico inhibe más la secreción de la cPRL en el grupo de los machos que en el de hembras; y esta diferencia es estadísticamente significativa entre los machos y la hembras estrogenizadas ($8.15 \pm 8.15\%$ de secreción en machos, contra $81.14 \pm 12.12\%$ en hembras OVX+E2 1SEM, y $85.66 \pm 24.02\%$ en hembras OVX+E2 9SEM). Este resultado no se obtiene con otras variantes ni con otros fármacos. Esto implica que el mecanismo de inhibición de secreción de la cPRL, inducida por la ocupación de los receptores de dopamina son distintos entre los machos y las hembras con un tratamiento estrogénico crónico. El mecanismo por el cual se da esta diferencia está totalmente fuera del alcance de este trabajo. Una primera explicación pudiera ser que los lactotrofos de las hembras estrogenizadas tuvieran menos receptores a dopamina, lo cual disminuiría la sensibilidad a la inhibición por BRCY sobre todas las variantes. Sin embargo, la banda inmunorreactiva a PRL en la región de 19.5KD de peso (que yo llamo PRL 19K) responde muy bien a este fármaco; de hecho, en hembras OVX+E2 9SEM, en análisis en condiciones reductoras muestra una inhibición estadísticamente significativa.

Como ya se mencionó, de la reducción química de la cPRL se obtiene la PRL 16K (y el fragmento carboxilo terminal de 8KD); sin embargo existen por lo menos dos tipos de cPRL [Andries et al 1992, y la presente tesis], de una de ellas se obtiene la PRL 16K y de la otra una PRL 15K> En ese trabajo se mostró que la cPRL que es precursora de la PRL 16K tiene una actividad biológica (síntesis de DNA en

gonadotropos y tiotropos *in vitro*), en tanto que la otra forma cortada es inactiva en el mismo ensayo. Ahora bien, en el trabajo de esta tesis se encontraron tanto a la PRL 16K como a la PRL 15K en condiciones no reductoras, pero en condiciones reductoras se obtuvo un aumento considerable de la PRL 16K, en tanto que la PRL 15K en condiciones reductoras aumentó muy poco o nada.

En el grupo de animales estrogenizados se secreta la forma de PRL 15K en vez de la PRL 16K, sin embargo la principal forma de cPRL secretada es la que da lugar a la PRL 16K (figuras 4.7 y 4.8). Esto plantea una pregunta interesante: ¿en este grupo de animales se producen las dos cPRL's, y una de ellas preferentemente se reduce en tanto que la otra preferentemente se secreta? Si bien los resultados de esta tesis hacen pensar en la pregunta, no indica ninguna posible respuesta.

La PRL 16K se encontró principalmente en el grupo de las hembras ciclantes (fig 4.7), en tanto que en las hembras estrogenizadas la forma secretada fue la PRL 15K, y en el grupo de los machos ninguna de ambas. Es claro entonces que la reducción de la cPRL a PRL 16K está regulada por las células, pues la cPRL se secretó en todos los grupos experimentales.

El único reporte del efecto *in vivo* de la PRL 16K [Mitra 1980b], mostró que esta molécula posee una actividad mitogénica sobre las células de la glándula mamaria; con los resultados de esta tesis, se puede formular la hipótesis de que la posible función fisiológica de la PRL 16K pudiera estar relacionada con un ciclo reproductor normal de las hembras.

También se mostró que la secreción de la PRL 16K parece ser más susceptible a los tratamientos farmacológicos, tanto inhibitorios como facilitadores de secreción, que las demás variantes de prolactina estudiadas; especialmente, durante el diestro el efecto de la TRH aumenta la secreción de esta variante de manera estadísticamente significativa (fig 4.12).

Otro punto más a discutir, es el de la naturaleza de la banda inmunorreactiva a prolactina en la zona de 19.5KD, que yo llamo PRL 19K. Esta molécula apareció consistentemente en todos los grupos experimentales, incluso con algunas variaciones aparentes en los niveles de secreción entre ellos.

La PRL 19K apareció principalmente en el grupo de las hembras ciclantes, las cuales presentaron siempre la mayor cantidad de casi todas las variantes de prolactina (a excepción de la PRL 15K). Notablemente, durante el diestro la cantidad de esta variante analizada bajo condiciones reductoras aumenta muchísimo (fig 4.5), sin embargo el error estandard es muy grande, pues este aumento se dio en dos de las cinco repeticiones de este experimento (ver apéndice B) Por otro lado, tanto en los machos como en las hembras con un tratamiento estrogénico crónico, esta molécula se secreta en cantidades menores que en las hembras ciclantes.

Los secretagogos aquí utilizados también fueron capaces de modificar la secreción de la PRL 19K (fig 4.11), de manera similar a como lo hacen con la PRL 23K. Tanto la inmunorreactividad como la respuesta secretora ante los diferentes fármacos, sugieren que esta proteína es en realidad una forma de prolactina. Sin embargo, nadie ha reportado su existencia a pesar de encontrarse en tan alta cantidad (al menos con el procedimiento aquí utilizado).

También existe la posibilidad de que esta banda inmunorreactiva a prolactina sea la PRL 21K reportada anteriormente [Sinha y Jacobsen 1988], y que se degrade parcialmente hasta hasta llegar al peso de 19.5KD. O bien, pudiera ser la banda inmunorreactiva a prolactina de 18K obtenida de homogenados de adenohipófisis de rata [Sinha et al 1989], pero que por errores de medición den esa diferencia de 1.5KD. Cualquiera que sea la naturaleza de esta banda, su esclarecimiento es tema de otro trabajo, por el momento aquí se presentó como una caracterización preliminar.

En general, esta tesis sirve como una primera caracterización fisiológica de moléculas que poseen algunos efectos específicos *in vitro* que no comparten con ningún otro miembro de la familia de la prolactina. Los datos existentes sobre una función propia, aunados a los de patrones de secreción y respuesta celular diferentes a lo que ya se conoce para la prolactina nativa, y un receptor específico al menos para la PRL 16K, hace posible el plantear la hipótesis que tanto la cPRL como la PRL 16K pudieran tener *in vivo* funciones propias que permitirían ver a estas proteínas como nuevas hormonas.

La gran cantidad de datos presentados y los resultados poco claros en algunos casos, hace que se respondan sólo unas pocas preguntas; pero a cambio se generaron muchas más. Después de todo, una característica de la ciencia es precisamente la de aumentar las dudas que tenemos sobre la naturaleza.

A manera de conclusiones se puede decir que:

- Las células adenohipofisarias en cultivo primario secretan, además de la PRL 23K a:

- dos tipos de cPRL

- una PRL 16K

- una PRL 15K

- una proteína inmunorreactiva a prolactina de 19.5 KD

- La PRL 16K es secretada principalmente por células adenohipofisarias de ratas ciclantes

- La PRL 15K es secretada principalmente por células adenohipofisarias de ratas OVX+E2

- Las células adenohipofisarias de machos no secretan ni a la PRL 16K ni a la PRL 15K

- La bromocriptina es capaz de inhibir la secreción de la cPRL en células adenohipofisarias de macho, pero no de hembras OVX+E2

6 BIBLIOGRAFIA

Aceves, C; Martínez, T; y Valverde-R, C. (1991) Aspectos neuroendócrinos y metabólicos de la lactación y hormonas tiroideas. En Dominguez, R. (ed.) *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. UNAM-Miguel Angel Porrúa. México, D.F.

Amenomori, Y; Chen, C; and Meites, J. (1970) Serum prolactin levels in rats during different reproductive stages. *Endocrinology* **88**: 1368

Andries, M; Tilemans, D; and Deneff, C. (1992) Isolation of cleaved prolactin variants that stimulate DNA synthesis in specific cell types in rat pituitary cell aggregates in culture. *Biochem J* **281**: 393-400

Asawaroengchai, H; Russell, S; Nicoll, C. (1978) Electrophoretically separable forms of rat prolactin with different bioassay radioimmunoassay activities. *Endocrinology* **102**: 407-414

Benker, G; Jaspers, C; Häusler, G; and Reinwein, D. (1990) Control of prolactin secretion. *Klin. Wochenschr.* **68**: 1157-1164

Bilinski, M; y Framezzani, J. (1990) Regulación de la secreción de prolactina a nivel celular. *Acta Physiol Pharmacol Latinoam* **40**: 437-498

Bjoro, T; Sand, O; Østberg, B; Gordeladze, J; Torjesen, P; Gautvik, K; and Haug, E. (1990) The mechanism by which vasoactive intestinal peptide (VIP) and thyrotropin releasing hormone (TRH) stimulate prolactin release from pituitary cells. *Bioscience Reports* **10**: 189-199

Brandi, A; Joannidis, S; Peillon, J; and Joubert, D. (1990) Changes of prolactin response to dopamine during the rat estrous cycle. *Neuroendocrinology* **51**: 449-454

Chien, Y; and Thompson, E. (1980) Genomic organization of rat prolactin and growth hormone genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 4583-4587

Clapp, C. (1984) *Regulación de la secreción láctea durante la lactancia en la coneja*. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Fisiológicas. UNAM

Clapp, C. (1987) Analysis of the proteolytic cleavage of the prolactin by the mammary gland and liver of the rat. Characterization of the cleaved and 16K forms. *Endocrinology* **121**: 2055-2064

Clapp, C; Sears, P; Rusell, D; Richards, J; Levay-Young, B; and Nicoll, C. (1988) Biological and immunological characterization of cleaved and 16K forms of rat prolactin *Endocrinology* **122**: 2892-2898

Clapp, C; and Weiner, R. (1992) A specific, high affinity saturable binding site for the 16-kilodalton fragment of prolactin on capillary endothelial cell. *Endocrinology* **130**: 1380-1386

Compton, M; and Witorsch, R. (1984) Proteolytic degradation and modification of rat prolactin by subcellular fractions of the rat ventral prostate gland. *Endocrinology* **115**: 476

Corcia, A; Steinmetz, R; Liu, J; and Ben-Jonathan, N. (1993) Coculturing posterior pituitary and GH₃ cells: dramatic stimulation of prolactin gene expression. *Endocrinology* **132**: 80-85

Davis, J; Hoggard, N; Wilson, E; Vidal, M; and Sheppard, M. (1991) Calcium/calmodulin regulation of the rat prolactin gene is conferred by the proximal enhancer region. *Mol Endocrinol* **5**: 8-12

Davis, J; and Linzer, D. (1989) Expression of multiple forms of prolactin receptor in mouse liver. *Mol Endocrinol* **3**: 674

de Greef, W; Plotsky, P; and Neill, J. (1981) Dopamine levels in hypophyseal stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* **32**: 229-233

Emanuele, N; Jurgens, J; Halloran, M; Tentler, J; Lawrence, A; and Kelley, M. (1992) The rat prolactin gene is expressed in brain tissue: detection of normal and alternatively spliced prolactin messenger RNA. *Mol Endocrinol* **6**: 35-42

Falconer, I; and Rowe, J. (1977) Effect of prolactin on sodium and potassium concentration in mammary alveolar tissue. *Endocrinology* **101**: 181-186

Farkouh, N; Parker, M; and Franz, A. (1979) Large molecular size prolactin with reduced receptor activity in human serum: High proportion in basal state and reduction after thyrotropin-releasing hormone. *J Clin Endoc Metab* 48: 1026-1032

Feder, H. (1981) Estrous cyclicity in mammals. En Adler (ed) *Neuroendocrinology of reproduction. Physiology and behavior*. Plenum, New York.

Ferrara, N; Clapp, C; and Weiner, R. (1991) The 16K fragment of prolactin specifically inhibits basal and fibroblast growth factor stimulated growth of capillary endothelial cells. *Endocrinology* 129: 896-900

Findling, J; y Tyrrell, J. (1988) Adenohipófisis y somatomedinas. En Greenspan, F; y Forsham, P. (eds.). *Endocrinología básica y clínica*. El manual moderno. México D.F.

Fraser, I; and Zhuang, G. (1990) Polymers of prolactin and their clinical significanse. *Obstet. Gynecol. Survey* 48: 515-520

Giannattasio,, G; Zanini, J; and Meldolesi, J. (1975) Molecular organization of rat prolactin granules: I. In vitro stability of intact and "membraneless" granules. *J Cell Biol* 64: 246-250

Greenspan, F; y Forsham, P. (eds.) (1988). *Endocrinología básica y clínica*. El manual moderno. México D.F.

Harvey, C; Jackson, S; Siddiqui, S; and Gutierrez-Hartmann, A. (1991) Structure-function analysis of the rat prolactin promoter: phasing requirements of proximal cell-specific elements *Mol Endocrinol* 5: 830-834

Jones, G; and Catanzaro, D. (1991) Interactions between rat prolactin gene promoter and enhancer regions in mammosomatotrope and lactotrope cell lines. *Mol Endocrinol* 5: 1836-1844

Kelly, P; Djiane, J; Postel-Vinay, M; and Edery, M. (1991) The prolactin / growth hormone receptor family. *Endocrine Reviews* 12: 235-251

Lamberts, S; and MacLeod, R. (1990) Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiological Reviews* **70**:279-318

Leavitt, W; Kimel, G; and Friend, J. (1973) Steroid hormone uptake by anterior pituitary cell suspensions. *Endocrinology* **92**: 94-103

Lewis, U. (1984) Variants of growth hormone and prolactin and their posttranslational modifications. *Ann Rev Physiol* **46**: 33-42

Lewis, U; Singh, R; Lewis, L; Seavey, B; and Sinha, Y. (1984) Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 385-389

Lumpkin, M; Samson, W; and McCann, S. (1983) Hypotalamic and pituitary sites of action of oxytocin to alter prolactin secretion in the rat. *Endocrinology* **112**: 1711-1717

Martínez de la Escalera, G. (1984) *Estudio del proceso de secreción de prolactina y su regulación en la rata lactante*. Tesis para obtener el título de Doctor en Ciencias Fisiológicas. UNAM.

Martínez de la Escalera, G; Clapp, C; Aguayo, D; Morales, T; Hummelet, G; y Mena, F. (1991) La regulación de la secreción de prolactina. En Domínguez, R. (ed.) *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. UNAM-Miguel Angel Purrúa. México, D.F.

Martínez de la Escalera, G; and Weiner, R. (1992) Dissociation of dopamine from its receptor as a signal in the pleiotropic hypothalamic regulation of prolactin secretion. *Endocrine Reviews* **12**: 241-255

MacLeod, R; Abad, A; and Eidson, L. (1969) *In vivo* effect of sex hormones on the *in vitro* synthesis of prolactin and growth hormone in normal and pituitary tumor bearing rats. *Endocrinology* **84**: 1475-1483

Maurer, R. (1982) Thyroid hormone specifically inhibits prolactin synthesis and decreases prolactin messenger ribonucleic acid levels in ergocryptine-treated pituitary cells. *Endocrinology* **110**: 1507-1514

Mena, F; Hummelet, G; Aguayo, D; Clapp, C; Martínez de la Escalera, G; and Morales, T. (1992) Changes in molecular variants during *in vitro* transformation and release of prolactin by the pituitary gland of the lactating rat. *Endocrinology* **130**: 3365-3377

Mena, F; Martínez de la Escalera, G; Aguayo, D; Clapp, C; y Grosvenor, C. (1982) Acción farmacológica de la prolactina sobre la glándula mamaria. Análisis experimental. En Valverde-R, C; Fanghanel, G; y Mena, F. (eds) *Nuevos conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisiaria*. PRONASA-CONACYT. México, D.F.

Miller, W; and Eberhardt, N. (1983) Structure and evolution of the growth hormone gene family. *Endocr Rev* **4**: 97-130

Mittra, I. (1980a) A novel "cleaved prolactin" in the rat pituitary: Part I Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem, Biophys. Res. Commun.* **95**: 1750-1759

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

Mittra, I. (1984) Somatomedins and proteolytic bioactivation of prolactin and growth hormone. *Cell* **38**: 347-348

Murdoch, G; Waterman, M; Evans, R; and Rosenfeld, M. (1985) Molecular mechanisms of phorbol ester, thyrotropin releasing hormone and growth factor stimulation of prolactin gene transcription. *J Biol Chem* **256**: 5942-5945

Nagy, G; Mulchahey, J; and Neill, J. (1988) Autocrine control of prolactin secretion by vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* **122**: 364-366

Nicoll, C. (1974) Physiological actions of prolactin. En Geiger (ed) *Handbook of physiology*. Sect 7, Vol 4, Part 2. Williams and Wilkins, Baltimore.

Neill, J. (1988) Prolactin secretion and its control. En Knobil, E. and Neill, J. (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York.

Oetting, W; Tuazon, D; Traugh, J; and Walker, A. (1986) Phosphorilation of prolactin. *J Biol Chem* **261**: 1649-1652

Osborne, R; and Tashjian, A. (1981) Tumor-promoting phorbol esters affect production of prolactin and growth hormone by rat pituitary cells. *Endocrinology* 108: 1164-1170

Oweibach, D; Rutter, W; Cooke, N; Martial, J; and Shows, T. (1981) The prolactin gene is located on chromosome 6 in humans. *Science* 212: 815-816

Page, R. (1988) The anatomy of the hypothalamo-hypophyscal complex. En Knobil, E. and Neill, J. (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York.

Pérez-Enríquez, B; y Valverde-R, C. (1982) Aspectos embrigénicos y morfofuncionales. En Valverde-R, C; Fanghanel, G; y Mena, F. (eds) *Nuevos conceptos sobre fisiología y patología hipotálamo-hipofisiaria*. PRONASA-CONACYT. México, D.F.

Ramsay, D. (1988) Neurohipófisis. En Greenspan, F; y Forsham, P. (eds.). *Endocrinología básica y clínica*. El manual moderno. México D.F.

Reichlin, S. (1985) Neuroendocrinology. En Wilson and Foster (eds) *Textbook of endocrinology*. Williams. Philadelphia, Pa.

Ruh, T; and Ruh, M. (1975) Androgen induction of a specific uterine protein. *Endocrinology* 97: 1144-1150

Rui, H; Djeu, J; Evans, G; Kelly, P; and Farrar, W. (1992) Prolactin receptor triggering, evidence for rapid tyrosine kinase activation. *J. Biol. Chem.* 267: 24076-24081

Shah, G; and Hymer, W. (1989) Prolactin variants in the rat adenohypofisis. *Mol. Cell Endocrinol.* 61: 97-107

Shiu, R; Elsholtz, H; Tanaka, T; Frieser, H; Gout, P; Beer, C; and Noble, R. (1983) Receptor mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology* 113: 159

Shull, J; and Gorski, J. (1986) The hormonal regulation of prolactin gene expression: an examination of mechanisms controlling prolactin synthesis and the possible relationship of estrogen to these mechanisms. *Vitamines and Hormones* 43: 197-249

Sinha, Y. (1980) Molecular size variants of prolactin and growth hormone in mouse serum: strain differences and alterations of concentrations by physiological and pharmacological stimuli. *Endocrinology* **102**: 1959-1969

Sinha, Y. (1992) Prolactin variants. *Trends Endocrinol Metab* **3**: 100-106

Sinha, Y; and Gilligan, T. (1984) A cleaved form of prolactin in the mouse pituitary gland: identification and comparison of in vitro synthesis and release in strains with high and low incidence of mammary tumors. *Endocrinology* **114**: 2046-2053

Sinha, Y; and Gilligan, T. (1985) Identification and partial characterization of a 25K protein structurally similar to prolactin. *Proc Soc Exp Biol Med* **178**: 505-514

Sinha, Y; and Jacobsen, B. (1988) Structural and immunologic evidence for a small molecular weight ("21K") variant of prolactin. *Endocrinology* **123**: 1364-1370

Sinha, Y; Jacobsen, B; and Lewis, U. (1989) Antibodies to newly recognized murine 13-18 KDa pituitary peptides crossreact with growth hormone and prolactin from several species, including man. *Biochem Biophys Res Comm* **163**: 386-393

Smith, C; and Norman, M. (1990) Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Clin Biochem* **27**: 542-550

Vallar, L; and Meldolesi, J. (1989) Mechanisms of signal transduction at the dopamine D2 receptor. *Trends Pharmacol Sci* **10**: 74-77

Valverde-R; Arámburo, C; y Bayón, A. (1988) Neuroendocrinología y comunicación intercelular. En Muñoz-Martínez (ed) *Teorías y hechos sobre la vida*. SEP. México, D.F.

Vick, R; Wong, U; and Witorsch, R. (1987) Biological, immunological and biochemical characterization of cleaved prolactin generated by lactating mammary gland. *Biochem Biophys Acta* **931**: 196-204

Weiner, R; Findell, P; y Kordon, C. (1988) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En Knobil, E. and Neill, J. (eds) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press. New York.

Whitaker, M; Klee, G; Kao, P; Randall, R; and Hesser, D. (1984) Demonstration of biological activity of prolactin molecular weight variants in human sera. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 826-830

White, B; Baverle, L; and Bancroft, F. (1981) Calcium specifically stimulates prolactin synthesis in GH3 cells. *J Biol Chem* 256: 5942-5945

APENDICE A

METODOLOGIA in extenso

ANIMALES

En este estudio se utilizaron ratas de la cepa Wistar, reproducidas y criadas en el bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Se usaron ratas hembras en los diferentes periodos de su ciclo estral (diestro, proestro y estro), ratas hembra ovariectomizadas y estrogenizadas, y ratas macho. Los animales fueron mantenidos en un cuarto con humedad y temperatura constantes y con alimento preparado para roedores y agua *ad libitum* en un régimen de 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

RATAS CICLANTES

Las ratas hembra que se utilizaron para monitorearles su ciclo estral se dejaron aclimatar durante una semana al cuarto donde fueron mantenidas; posteriormente se tomaron frotis vaginales diariamente; esto es, se tomaron muestras celulares de la vagina con un gotero conteniendo un poco de solución salina (NaCl 0.9%). Las muestras se colocaron en un portaobjetos para su observación al microscopio de luz (campo claro), y la morfología de las células fue el indicador del periodo del ciclo. Todas las muestras vaginales se tomaron alrededor de las 12:00 diariamente hasta que las ratas hubieran completado al menos tres ciclos.

RATAS OVARIECTOMIZADAS Y ESTROGENIZADAS

Uno de los grupos experimentales consistió en utilizar las adenohipófisis de ratas hembra a las que se les indujo un prolactinoma con una presencia elevada de estrógenos. Para obtener los prolactinomas, se implantaron subcutáneamente cápsulas conteniendo 17 β -estradiol (ver adelante) a ratas recién ovariectomizadas.

a) ovariectomías

La rata que será sometida a operación se duerme profundamente en una cámara saturada con éter sulfúrico, y durante la operación se mantiene dormido al animal manteniéndole cerca un algodón también humedecido con éter.

Para ovariectomizar una rata, ésta se rasura en la parte dorsal a la altura lumbar, se hace un corte longitudinal de piel (1 cm) cuyo centro quede 1.5 cm debajo de la última costilla. Por dicha abertura se hace una disección roma anterolateralmente para separar a la piel del músculo. Después se toma un paquete muscular en la región ventrolateral. Ahí se separa el músculo hasta que quede una pequeña abertura (2 mm) por donde se extrae el ovario y la trompa. Se pinza la trompa por debajo del ovario y ésta se ata con hilo para evitar la circulación sanguínea, se corta para separar al ovario y se regresa la trompa a la cavidad abdominal. Este proceso se repite con el ovario del otro lado.

Posteriormente se inserta subcutáneamente (por la misma abertura) una cápsula con 17 β -estradiol, procurando que quede lo más cerca posible del cráneo. Por último, se cierra la abertura de la piel con una grapa de cirugía.

Los animales ovariectomizados y estrogenizados se regresan al bioterio por el tiempo que durará la estrogenización (1 y 9 semanas), y se sacrifican a los animales para obtener la adenohipófisis.

b) cápsulas de estrógeno

Para tratar crónicamente a las ratas con estrógenos, se decidió implantarlas con una cápsula conteniendo 17 β -estradiol hecha en nuestro laboratorio. Se hacen de la siguiente manera: se corta un tubo silicón (Dow Corning; 0.076 in y 0.125 in de diámetro interno y externo respectivamente) de 2 cm de longitud, y se tapa un extremo con madera, ocupando 0.5 cm del interior del tubo. Después se llena el tubo con 17 β -estradiol cristalino (Sigma) hasta que ocupe 1 cm de la cavidad del tubo (\approx 14 mg), se tapa la otra extremidad del mismo también con madera y por último se recubren los extremos expuestos de madera con silicón de grado médico (silastic, Dow Corning).

Se ha calculado que estas cápsulas con capaces de liberar estrógenos continuamente una cantidad de 45 μ g de hormona diariamente [Wiklund 1981], lo cual asegura una liberación constante para todos los grupos experimentales en este trabajo.

CULTIVOS CELULARES

Debido a la pequeña cantidad de PRL 16K secretada al medio de cultivo, se necesitaron tres o cuatro adenohipófisis por experimento.

Los animales elegidos para extraerles los órganos tenían, desde luego, el mismo tiempo de estrogenización o se encontraban en el mismo periodo de su ciclo.

Los animales de todos los grupo experimentales se sacrificaron durmiendolos primero profundamente en una cámara saturada con éter dietílico, y posteriormente decapitandolos con una guillotina.

Los cultivos celulares de las adenohipófisis se hicieron bajo el siguiente protocolo: primeramente, se sacrifica a la rata y, lo más rápidamente posible, se le separa la piel del cráneo hasta dejar a éste expuesto. En este paso se debe llevar la cabeza del animal a la campana de flujo laminar para hacer la extracción del órgano en un ambiente estéril. Se separa la tapa del craneo y se extrae el cerebro con cuidado para no desprender a la hipófisis. Así, queda la hipófisis sobre el esfenoides cubierta por las meninges, éstas se separan y se retira la neurohipófisis; por último se toma a la adenohipófisis y se coloca en un plato de Petri con solución salina de Hanks (Sigma), donde se reunirán todas las adenohipófisis que se ocuparán en el experimento (en este caso tres o cuatro).

Una vez reunidos todos los órganos, se lavan con Hanks cuatro veces para eliminar la sangre remanente lo más posible. Ahora, se cortan las adenohipófisis con una navaja lo más finamente posible (dispersión mecánica). Todos los fragmentos se recolectan con 10 ml de Hanks, se colocan en un tubo de centrifuga de 15 ml, y se centrifuga la suspensión a 1000 rpm durante 2 min. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el botón en 3 ml de colagenasa¹ más 200 µl de DNasa². Se protege al tubo de la luz y se deja incubar a 37 °C con agitación durante 60 min (dispersión enzimática).

Posteriormente se agregan otros 200 µl de colagenasa, y con una pipeta pasteur siliconizada se crea una corriente de la solución subiéndola y bajándola de la pipeta (dispersión por flujos) hasta que no sea visible ningún grumo. Una vez concluido lo anterior, se centrifuga la solución a 1000 rpm por 10 min, se descarta el sobrenadante, y se resuspende el botón en 5 ml de DME cs (medio

¹ 5 mg de colagenasa tipo I (Worthington, 260 U/mg) en 3 ml de Hanks, preparada al momento de utilizar.

² 1 mg de DNasa tipo I (Sigma, 2500 U/mg) en 1 ml de Hanks.

Eagle modificado de Dulbecco con 10% de suero bovino³; se centrifuga a 1000 rpm por 10 min y se descarta el sobrenadante. El botón se resuspende en 6 ml de DME cs y se colocan alícuotas de 1 ml en platos de Petri de 35 mm que previamente han sido recubiertos con una capa de matriz extracelular "matrigel" (Research products). Posteriormente se adiciona a cada plato 2 ml más de DME cs (volumen final 3 ml por plato; 6 platos, uno para cada tratamiento farmacológico). Se cuenta la cantidad de células sembradas con un hemocitómetro, y se incuban las células a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% CO₂ y 95% aire por aproximadamente 24 h.

Para el siguiente paso, se aspira el medio de cultivo de cada plato cuidadosamente para desprender la menor cantidad posible de células, se agregan 0.6 ml de DME (sin suero) y se incuba por 30 min; al cabo de los cuales se vuelve a aspirar el medio y se agregan 0.6 ml de DME conteniendo los diferentes fármacos a utilizar (ver figura).

Los secretagogos utilizados en este estudio fueron bromocriptina (BRCY) a una concentración de 1 µM en el medio de cultivo, hormona liberadora de tirotropina (TRH) 1 µM, 12 *O*-tetradecanoil forbol 13-acetato (TPA) 1 µM, forskolina (FKL) 10 µM; y ionomicina (A23187) 20µM. Las concentraciones utilizadas de cada fármaco son las más utilizadas en diferentes reportes. Cada plato contenía uno de los secretagogos ya mencionados, y el cultivo control sólo tenía DME sin ningún fármaco.

La incubación de las células adenohipofisarias con los secretagogos anteriores, fue por 24 h; después de eso, se tomaron los medios de cultivo (500 µl por plato) y se les eliminaron las células por centrifugación a 14000 rpm por 4 min. Estos medios se liofilizaron y se conservaron a -20 °C hasta su utilización.

INMUNOTRANSFERENCIAS

Los medios de cultivo liofilizados se resuspendieron en 25 µl de agua dosionizada, quedando así concentrados 20 veces (de 500 µl a 25 µl), se repartió cada alícuota en dos partes iguales, una para

³ El DME con y sin suero fue suplementado con antibióticos, por cada 99 ml de DME se agregó 1 ml de "antibiotic-antimycotic" (Gibco, 10000 U/ml de sal sódica de penicilina G, 10000 µg/ml de sulfato de estreptomycinina y 25 µg/ml de anfotericina B.

correrla en geles en condiciones no reductoras y la otra en condiciones reductoras.

Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) a una concentración del 15%. Se usaron cámaras miniprotean II (Bio-Rad) para geles de de 8.2 cm por 7.2 cm, 0.75 mm de espesor y peines de 15 pozos. El método que se siguió fue el sugerido por Bio-Rad, basado en el de Laemmli.

Las muestras se corrieron durante 50 min a 180 V. Terminando la corrida, los geles se equilibraron en buffer de transferencia⁴ frio durante 15 min. Después se colocaron los geles en la cámara de transferencia (mini trans-blot de Bio-Rad) y se electrotransfirieron a papel de nitrocelulosa por 24 h a 40 V en un cuarto frio (4 °C).

Posteriormente los papeles se secaron y se colocaron en solución salina de fosfatos con seroalbúmina bovina al 2% (PBS-BSA 2%)⁵ durante cuatro horas para bloquear al papel con proteínas. Posteriormente se incorporó suero hiperinmune anti PRL 16K de rata levantado en conejo, hasta obtener una dilución 1:1500 del suero. Se dejaron incubando los papeles por 2 h a temperatura ambiente, o toda la noche a 4 °C. La incubación se terminó lavando rápida y vigorosamente los papeles con solución salina⁶. Después se agregó anti IgG de conejo levantado en cabra acoplado a fosfatasa alcalina (Cappel), en una dilución 1:2500 en PBS-BSA 2%; se deja reaccionar este anticuerpo por 2 h a temperatura ambiente y se volvieron a lavar los papeles con la solución salina.

El revelado de los papeles se hizo con el kit de Bio-Rad para revelado de fosfatasa alcalina⁷. La reacción se detuvo con solución salina cuando los papeles comenzaron a mancharse (aproximadamente 5 min).

DENSITOMETRIA

⁴ TRIS 25 mM, glicina 192 mM y metanol 20% v/v en agua desionizada.

⁵ NaCl 137 mM, KCl 2.68 mM, Na₂HPO₄ 8.06 mM, MgCl₂ 1.47 mM en agua desionizada, se ajusta a pH 7.4 y se agrega BSA hasta obtener 2% w/v

⁶ NaCl 0.15M

⁷ Nitrobluc tetrazolium y 5-bromo-4-cloro-3-indolil fosfato en dimetilformamida y TRIS

El método de cuantificación utilizado, fue el de la densitometría. Se utilizó un densitómetro Hoefer GS-300, acoplado a un programa de computadora para análisis densitométricos: GS-370 Data System versión para computadora Macintosh.

Se utilizó el análisis de la reflectancia de los blots a 585 nm, y se tomó la densitometría de las bandas encontradas entre las zonas correspondientes a los 24 y 14 kD de peso molecular; y de ellas, se cuantificaron las que aparecían con mayor frecuencia, a saber: 23 kD y 16 kD.

PAQUETES DE SOFTWARE

El análisis estadístico de los datos obtenidos se realizó con la ayuda del paquete computacional StatView™SE+ (Abacus Concepts), utilizando el análisis de varianza multifactorial (ANOVA), utilizando un valor >95% para la significancia estadística.

Las gráficas se realizaron con la ayuda de los programas Cricket Graph™ v1.3.2 (Cricket Software), FullPaint™ (Ann Arbor Softworks, Inc.) y MacDraw II v1.1 (Claris™). Finalmente, los textos se realizaron con el procesador de palabras Word v4.0 (Microsoft™).

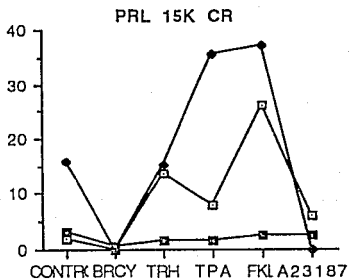
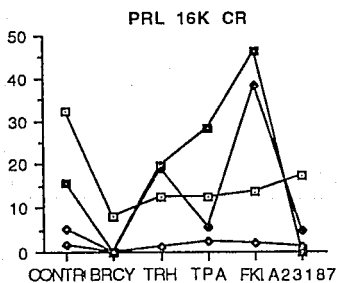
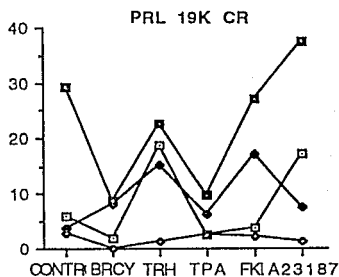
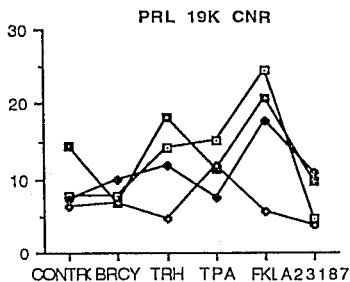
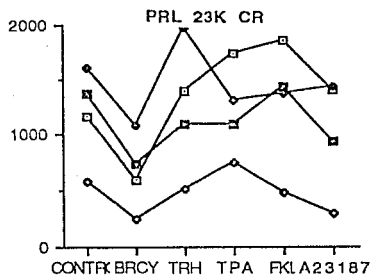
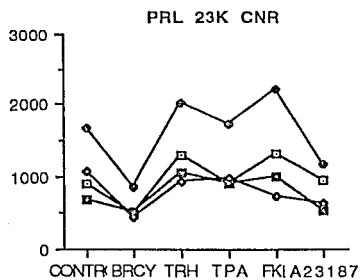
APENDICE B

RESULTADOS INDIVIDUALES

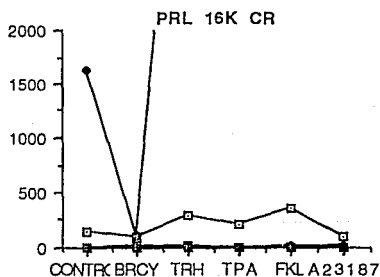
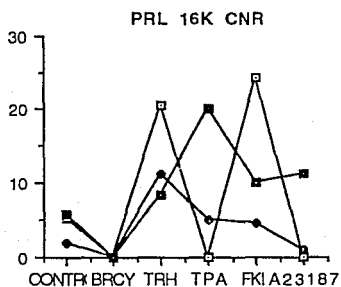
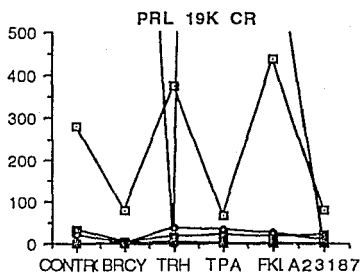
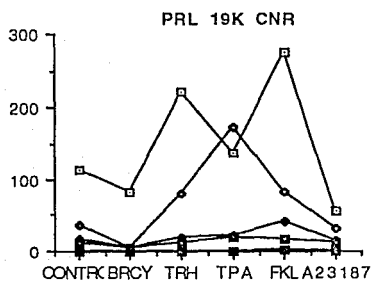
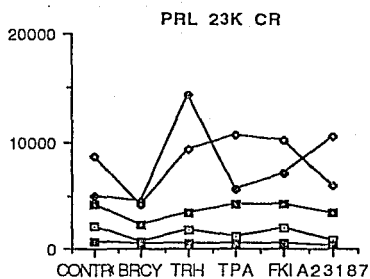
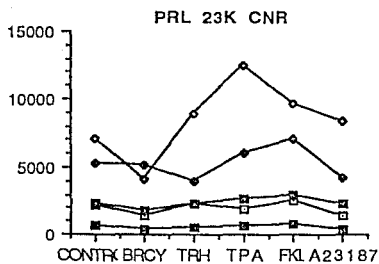
En este apartado presento en forma gráfica los valores individuales de todos los experimentos, con la intención de que el lector pueda comprobar la gran variabilidad existente entre los distintos experimentos; conservando, sin embargo, una gran confiabilidad dentro de cada experimento. Esto es, se pueden comparar muy bien los efectos de los secretagogos con el experimento control.

Cabe señalar que debido a la variabilidad se ajustaron las escalas de las gráficas para poder apreciar la mayoría de los experimentos, aunque algunos no aparezcan por la misma razón.

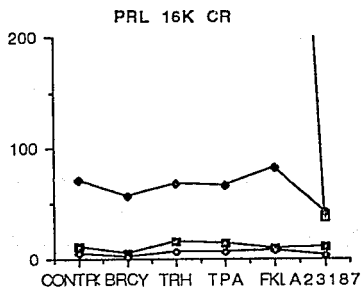
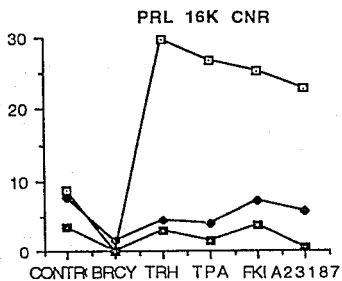
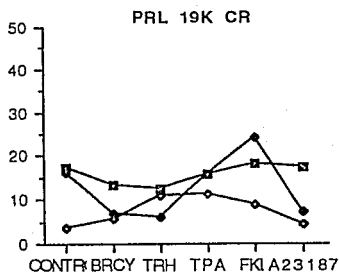
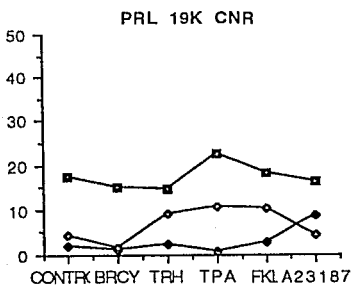
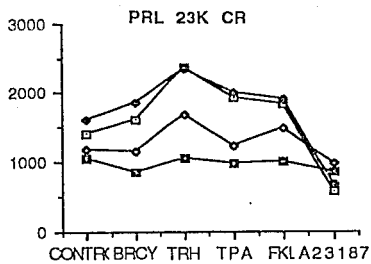
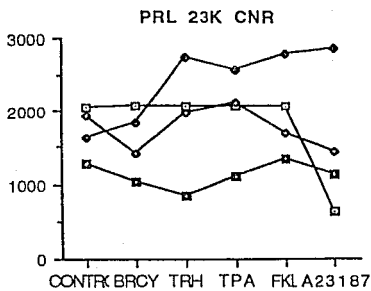
Todos los resultados están expresados como nanogramos de proteína por mililitro de medio de cultivo por millón de células sembradas (ng/ml/mill cells).



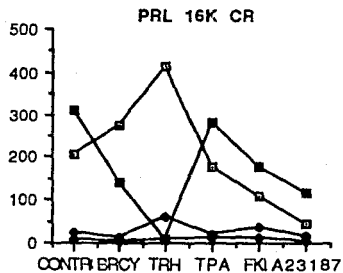
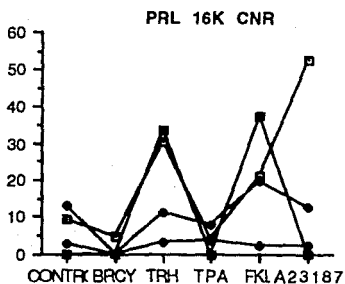
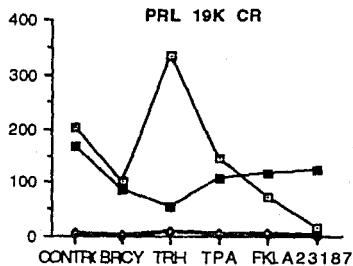
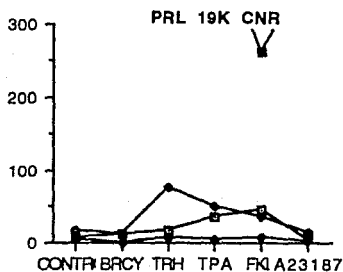
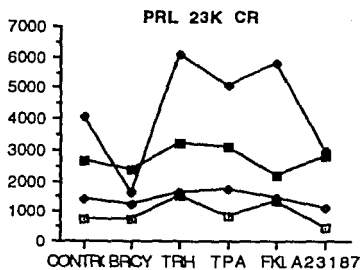
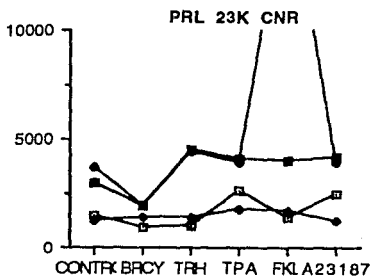
Valores individuales de las diferentes formas de prolactina secretadas al medio por células adenohipofisarias de macho



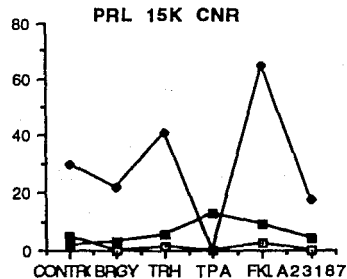
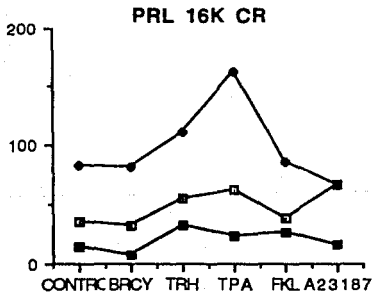
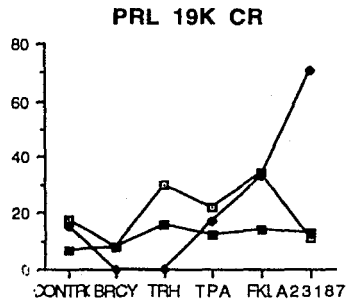
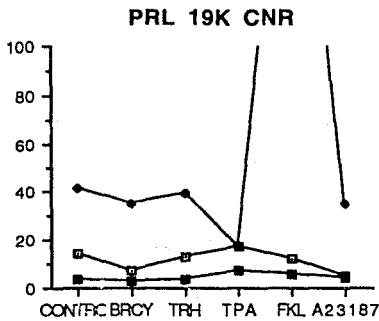
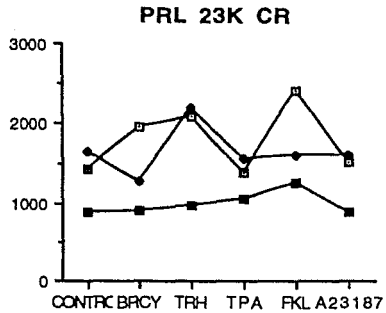
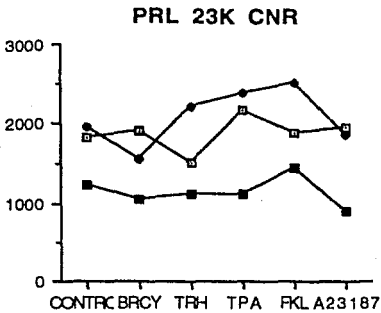
Valores individuales de las diferentes formas de prolactina secretadas al medio por células adenohipofisarias de hembras en diestro



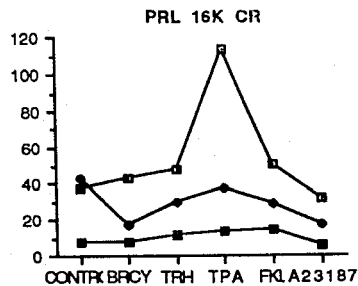
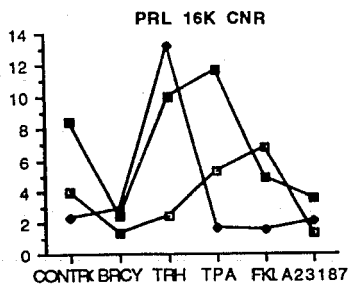
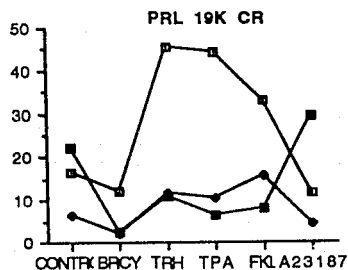
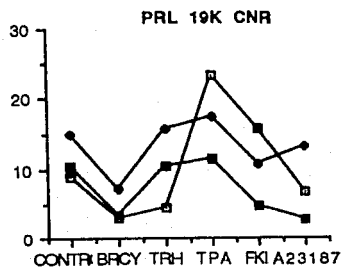
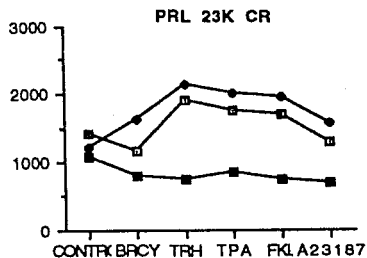
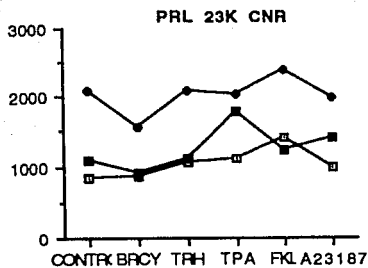
Valores individuales de las diferentes formas de prolactina secretadas al medio por células adenohipofisarias de hembras en proestro



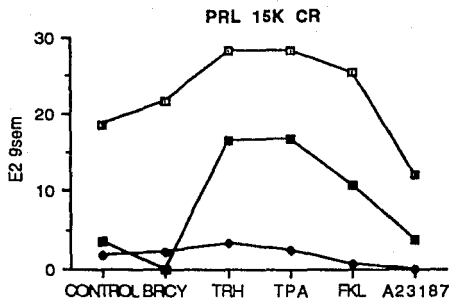
Valores individuales de las diferentes formas de prolactina secretadas al medio por células adenohipofisarias de hembras en estro



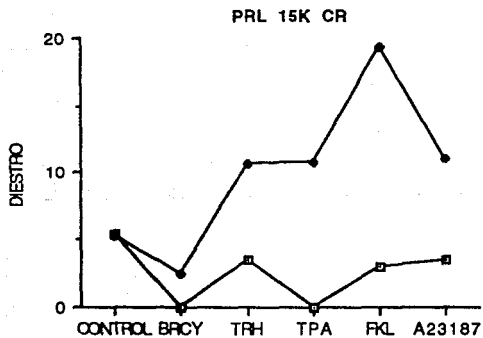
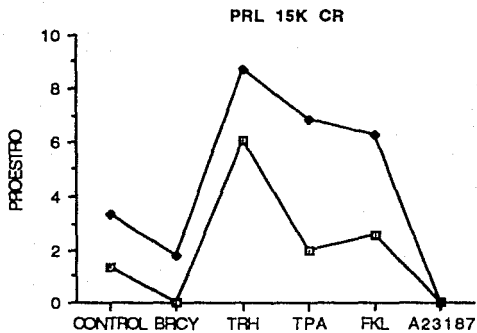
Valores individuales de las diferentes formas de prolactina secretadas al medio por células adenohipofisarias de hembras ovariectomizadas y estrogenizadas por una semana



Valores individuales de las diferentes formas de prolactina secretadas al medio por células adenohipofisarias de hembras ovariectomizadas y estrogenizadas por nueve semanas



ESTA TIPO DE ESTUDIO
SOLUCION DE LA PROBLEMA



Otros valores

**The time is gone the song is over,
thought I'd something more to say.****

**** Time**

by N. Mason, R. Waters, R. Wright and D. Gilmour
in Pink Floyd: The dark side of the moon
© 1973 EMI Ltd.