

Regulación y control de la secreción de prolactina en la rata

Flavio Mena, Dolores Aguayo, Gisela Hummelt, María Teresa Morales
Departamento de Fisiología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Recibido, agosto 27, 1992; aceptado, septiembre 25, 1992)

El proceso de secreción de la prolactina por las células adenohipofisiarias especializadas, vgr., los lactotrofos, se inicia con la síntesis de la hormona en el retículo endoplásmico rugoso y continúa con una serie de eventos que resultan en su concentración dentro de gránulos de secreción. En estos gránulos ocurren una serie de transformaciones químicas y morfológicas hasta que entran en exocitosis, medio por el cual la hormona es exportada del interior al exterior de la célula y de ahí a la circulación general (1,2).

Además de sus efectos bien conocidos sobre la secreción láctea, la prolactina ejerce decenas de efectos identificados en toda la escala de los vertebrados, tanto dentro como fuera de la esfera reproductiva. Estos efectos han sido catalogados en tres grandes categorías: los relacionados con la reproducción; los relacionados con el crecimiento; y los de tipo osmorregulador (3).

Los efectos más estudiados en los que participa la prolactina son los relacionados con la fisiología reproductiva de los mamíferos. En la rata, la prolactina estimula el crecimiento y la secreción de leche por las glándulas mamarias (4,5), la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo (6) y el crecimiento y funcionamiento de la próstata (7).

En el ciclo estral de la rata, la concentración plasmática de la prolactina se mantiene baja durante el diestro, se incrementa bruscamente durante la tarde y la noche del proestro, para declinar nuevamente hasta valores basales en la mañana del estro (8). Este incremento se encuentra precedido y es estimulado, directa o indirectamente, por la concentración plasmática de estrógenos (9). La estimulación cervical producida durante el coito, induce que las concentraciones plasmáticas de la hormona aumenten dos veces por día, durante los primeros 10 a 11 días

del embarazo. Ya que dichos incrementos se repiten espontáneamente durante este período, se ha sugerido que la hormona es secretada con un ritmo circádico controlado por el sistema nervioso central (10,11), en el cual la participación de los esteroides ováricos es mínima (12). A partir del día 11 del embarazo, la concentración plasmática de la prolactina se mantiene baja hasta uno o dos días antes del parto, cuando ocurre un incremento significativo (13). Este incremento parece ser causado por el aumento en la secreción de estrógenos y la disminución en la secreción de progesterona que tienen lugar en dicha fase.

Durante la lactancia, y a diferencia de lo que acontece fuera de este estado fisiológico, la secreción de la prolactina se encuentra casi totalmente bajo el control de impulsos neurogénicos aferentes, generados por la succión de las crías o a partir de señales de tipo exteroceptivo asociados con la succión (14). Como resultado de tal regulación, la hormona no es secretada en forma tónica, sino fásica en respuesta a la estimulación aferente (15). La importancia relativa de la estimulación proveniente de las crías varía durante la lactancia. Así, estudios previos han mostrado que si bien la succión es el estímulo más importante, la estimulación exteroceptiva se desarrolla a mediados del ciclo y su importancia se incrementa al final del mismo (16). Se ha observado que en esta fase, aumenta la sensibilidad del mecanismo de regulación de la hormona en respuesta a estímulos exteroceptivos. Como consecuencia, la madre libera prolactina no sólo en respuesta a la estimulación exteroceptiva de sus crías, sino también a la estimulación exteroceptiva provista por las crías de otras madres lactantes (17).

Mecanismos involucrados en la secreción de la prolactina.

Aspectos Generales. La secreción de la prolactina por los lactotropos hipofisarios es un fenómeno complejo que está determinado por interacciones estimulantes e inhibitorias de origen hipotalámico y por mecanismos intracelulares de regulación. Durante muchos años se consideró a la adenohipófisis como un órgano blanco pasivo, cuya función era el resultado exclusivo de la acción de factores hipotalámicos. Sin embargo, el nivel de funcionamiento de los lactotropos puede cambiar drásticamente según el estado fisiológico del organismo. Asimismo, el control hipotalámico puede ser ejercido sobre mecanismos específicos del proceso de secreción de la hormona, tales como la liberación, la biosíntesis, el procesamiento, etcétera, afectando con ello la secuencia general del mismo. Es evidente, entonces, que son las interacciones antes mencionadas, y el resultado de las mismas, lo que determina el funcionamiento de dichas células hipofisarias.

El modelo experimental, provisto por la rata lactante para los estudios de la secreción de la prolactina, ha permitido recabar información importante, tanto en condiciones *in vivo* como *in vitro*, sobre los aspectos fisiológicos del proceso secretor de esta hormona. Entre las características más importantes que distinguen a este modelo experimental de otros que se utilizan, están, entre otras, la existencia de una relación cuantitativa entre la síntesis, el procesamiento y la secreción de la hormona por la hipófisis y la intensidad de la estimulación aferente producida por la succión y, por otra parte, la de que la secreción de la prolactina en la rata lactante es de naturaleza fásica en respuesta al mismo estímulo (15,18). Las ventajas que se derivan de tales características permiten el análisis del procesamiento intracelular, del almacenamiento y degradación de la hormona, ya que es posible conocer dichas fases mediante el simple procedimiento de variar la intensidad de la succión o el intervalo inter-succiones (19).

En la rata macho y en la rata hembra ciclante, la secreción de la prolactina es de tipo tónico o tónico-fásico y es influida por los esteroides gonadales. Tal tipo de secreción tónica también es característica de las hipófisis trasplantadas o cultivadas *in vitro* a largo plazo y de las líneas celulares normales como la GH3. En este último modelo, también se observa una forma de secreción atípica con alto recambio de la hormona, asociada a un procesamiento acelerado, escaso almacenamiento y maduración de la misma (20). Todas estas características son diferentes, no sólo de las observadas en el modelo de la rata lactante, sino también de las que posiblemente existen bajo

condiciones fisiológicas en animales no lactantes. Como consecuencia de tal disparidad, la información que se obtiene sobre las tasas de síntesis, de procesamiento y de liberación de la hormona queda limitada por el modelo particular que se emplea en los experimentos. La información que se obtiene en condiciones experimentales diferentes es a menudo difícil de extrapolar. Por esta razón, la información obtenida de los mecanismos regulatorios del lactotrofo y del control hipotalámico es incompleta. Por lo tanto, es posible que la consistencia en la información recabada utilizando el modelo de la rata lactante, permita normar el criterio para la interpretación fisiológica en este campo.

Los cambios en la detectabilidad de la prolactina hipofisaria durante la secreción *in vivo* e *in vitro*. Se ha descrito que el proceso de secreción de la prolactina en la rata lactante (en respuesta a la succión, a la estimulación exeroceptiva de las crías, a la estimulación eléctrica de un nervio mamario, o como resultado de la incubación *in vitro* de la adenohipófisis de ratas lactantes no succionadas) es un evento multifásico, en el que la liberación de la hormona hacia la circulación o hacia el medio de cultivo es sólo una de las fases (18,21,22,23,24,25). Este concepto surge de los resultados obtenidos utilizando las técnicas de bioensayo, de electroforesis en gel de poliacrilamida y densitometría (PAGE), y por el radioinmunoanálisis (RIA) del contenido y la detectabilidad de la hormona en la glándula, en comparación con la hormona secretada. Así, la estimulación de la secreción durante un período breve (1 a 2 min) provoca disminución brusca, rápida y extensa (15-60 ug/mg) del contenido de la hormona en la glándula. Este resultado no coincide cuantitativamente con la proporción de la hormona liberada (2-3 ug/mg) durante el mismo período. En cambio, es seguida de la reacumulación gradual de la hormona dentro de la glándula, que ocurre independientemente de que la activación sea o no sostenida (19,23,26). Estas observaciones se han confirmado utilizando técnicas morfológicas (27,28) y, en conjunto, permiten postular que la disminución rápida, o depleción del contenido glandular de prolactina, no corresponde a la expulsión de la hormona de la glándula sino a una pérdida reversible en la detectabilidad de la misma, la cual se recupera durante las fases de reacumulación o de repleción y de liberación.

Otros estudios hechos *in vivo* o *in vitro* permiten mostrar que la depleción, la repleción y la liberación de la prolactina son procesos interdependientes, ya que están regulados por mecanismos hipofisarios y

por influencias hipotalámicas. Tanto la hormona reaccumulada como la hormona liberada provienen de la PRL que previamente entró en la fase de depleción y que, consecuentemente, dejó de ser detectable. Si se aplican períodos prolongados de estimulación por succión y se determina la tasa de secreción de la prolactina a la circulación, se observa que la cantidad total liberada al cabo de la succión corresponde a la cantidad total que dejó de ser detectable durante los primeros minutos de succión (18).

Por otra parte, en experimentos de incubación se observa que la actividad específica de la hormona marcada (con ^3H -leucina, 8 hs antes del experimento) que se ha reaccumulado o bien que ha sido liberada, corresponde a la actividad específica de la hormona en fase de depleción (23,24,25). Con base en estas observaciones se ha propuesto que, en la hipófisis de la rata lactante, la prolactina se almacena en una forma preliberable y detectable, la cual, mediante un proceso de transformación reversible, pasa de la forma detectable a una indetectable y, finalmente, recupera su detectabilidad durante la liberación. Según este esquema se considera que dicha fase de transformación corresponde a la fase de depleción e indetectabilidad de la prolactina, y que la fase de liberación propiamente dicha ocurre a partir de la hormona transformada. Dado que dicha transformación es reversible, permite explicar la recuperación de la detectabilidad tanto en la hormona que se reaccumula en la hipófisis como en la que es liberada.

Diferentes autores han estudiado el papel que ejercen los factores hipotalámicos inhibidores y facilitadores sobre cada una de las fases del proceso de secreción de la prolactina. Tanto la fase de depleción-transformación como la de repleción de la hormona son inhibidas por el factor inhibidor de la prolactina (PIF), que se encuentra en los extractos ácidos de hipotálamo; por la dopamina (DA) y por el agonista dopaminérgico bromocriptina (CB-154). La fase de liberación es poco inhibida por estos agentes, pero es aumentada por un factor estimulante de la prolactina (PRF) y por la hormona estimulante de la tirotrófina o TRH (29,30). Sin embargo, estos últimos agentes no ejercen ningún efecto sobre la fase de depleción-transformación de la hormona. Por otra parte, se observa que la tasa de repleción es estimulada tanto por los extractos hipotalámicos como por la propia prolactina, administrados una vez que la depleción ha ocurrido (30).

En conjunto, estos resultados muestran que la fase de depleción-transformación es el paso limitante para la disponibilidad de la hormona liberable en la

hipófisis de la rata lactante y que el control hipotalámico es ejercido selectivamente sobre las fases compartimentalizadas del proceso general. Es importante mencionar que procesos similares a los de la depleción-transformación de la prolactina han sido descritos para otras hormonas adenohipofisiarias (31); y que los resultados obtenidos, que son la base de la hipótesis descrita, han sido confirmados en diferentes laboratorios, tanto en ratas lactantes (21,32,33) como en ratas pseudopreñadas (34), preñadas (35), así como en explantes de hipófisis (36) y en células dispersas (37,38).

Estudios sobre la naturaleza bioquímica-molecular del proceso de transformación de la prolactina. En la hipófisis, la prolactina se encuentra almacenada en forma de gránulos compuestos por una matriz hormonal densa recubierta de membrana (1,2). Desde un punto de vista morfofuncional, la matriz hormonal de los gránulos que van a la excitosis presenta una estructura estable (20). Asimismo, la insolubilidad química, que caracteriza al gránulo de la prolactina, guarda relación directa con la edad de la hormona (tiempo transcurrido desde su síntesis) (39). Existe una gran variedad de cambios postraduccionales posibles, que tendrían influencia sobre la detectabilidad química, biológica e inmunológica de una proteína. Entre estos posibles cambios, que en general suelen tener una gran importancia para la actividad biológica del compuesto en cuestión, destacan por su frecuencia y ubicuidad las modificaciones covalentes (con residuos de carbohidratos; por ejemplo, la glucosilación): la fosforilación, la formación o la ruptura de puentes disulfuro, la proteólisis, etcétera.

En los últimos años, se han obtenido evidencias de que la molécula de prolactina puede presentar algunos de estos cambios, aunque en muchos casos no se ha establecido el significado funcional de los mismos. Así, se ha descrito que normalmente los hidratos de carbono macromoleculares forman parte de la matriz de los gránulos de prolactina de bovinos (40). En la rata, se ha mostrado que, durante la excitosis, los glucoconjugados extracelulares interactúan con los gránulos de prolactina (41). Entre las modificaciones postraduccionales que se han descrito se pueden mencionar: a) la glucosilación en las prolactinas ovina y humana asociada a la disminución en la actividad biológica de las mismas (42); b) la desamidación de las prolactinas de ovino y de ratón (43,44); c) la agregación y la oligomerización de las prolactinas de rata, ratón y del ser humano (45,46,47); d) la proteólisis de las prolactinas de rata y ratón,

relacionada con la ruptura del asa mayor, formada por uno de los puentes disulfuro de la molécula. La reducción del puente disulfuro da lugar a formas submonoméricas con actividad biológica e inmunológica diferente a la de la forma nativa (48); y, finalmente, e) la generación de formas reducidas de prolactina ovina carentes de actividad biológica e inmunológica (49).

Durante la fase de depleción-transformación, la prolactina hipofisiaria es indetectable al análisis por PAGE, RIA y bioensayo (14,15). Asimismo, la prolactina transformada es resistente a la extracción en amortiguador Tris-HCL a pH neutro, pero puede ser extraída en amortiguador de bicarbonato a pH 10 (23). Este resultado sugiere que la depleción-transformación está asociada con un aumento en la estabilidad de la hormona. Por otra parte, dado que las soluciones alcalinas pueden facilitar el intercambio tiol-disulfuro (50), estos datos sugieren que la hormona puede presentar cambios conformacionales que involucran la reducción-oxidación de puentes disulfuro, antes de la exocitosis, y que tales cambios determinan su indetectabilidad a los métodos empleados (23,51).

Por lo anterior, en la rata lactante se investigó si los fenómenos de óxido-reducción de puentes disulfuro, por medio de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, participan normalmente en los procesos de depleción-transformación, repleción y liberación de la prolactina. Se ha descrito que el uso de tioles, aminotioles, agentes alquilantes, cationes divalentes y amortiguadores alcalinos provoca cambios drásticos en la detectabilidad de la prolactina de murinos y bovinos (51), por lo que es posible que los mecanismos de intercambio tiol-disulfuro estén involucrados en el almacenamiento y la secreción de la hormona (51,52). Se ha mostrado que, en el cultivo de hipófisis, los agentes reductores de grupos tiólicos como el glutatión reducido (GSH), el ditioneitol (DTT), el b-mercaptoetanol (MCE) y la cisteamina (CSH) aumentan la fase de depleción-transformación de la prolactina. Incluso, la administración *in vivo* de la CSH induce tal respuesta.

Por otra parte, se observa que tanto los agentes oxidantes (glutatión oxidado, GSSG, ácido 5, -5-ditio-(2-nitro-benzoico), DTNB), como los alquilantes (bloqueadores de los radicales tiol (N-etilmaleimida, NEM) y la iodoacetamida, IAA) deprimen o bloquean la transformación de la prolactina. La liberación de la prolactina hacia el medio de incubación es inhibida por los tioles y los

alquilantes, mientras que los oxidantes la estimulan de manera significativa (52). Según estos resultados, parece que las moléculas de prolactina almacenadas en los gránulos son inicialmente reducidas (por el rompimiento de los puentes disulfuro intramoleculares) y, posteriormente, reoxidadas a la forma original, o bien reoxidadas de manera cruzada (formando puentes intermoleculares) y dando origen a formas oligoméricas de alto peso molecular, indetectables con los métodos empleados. Asimismo, dada la posibilidad de que dichos procesos sean reversibles y de que, una vez alterada la conformación de la molécula de prolactina, ésta quedara expuesta a la acción de enzimas proteolíticas (48), es probable que dicha polimerización reversible explique la transformación de la prolactina y los cambios asociados de detectabilidad y de proteólisis antes mencionados.

Por otra parte, también existe la posibilidad de que dichos mecanismos de intercambio tiol-disulfuro actúen sobre otros mecanismos reguladores intracelulares que influyen, directa o indirectamente, sobre la transformación y la liberación de la prolactina. La posible participación fisiológica de los mecanismos de óxido-reducción en la secreción de esta hormona, nos permite proponer una hipótesis integrativa sobre el proceso de secreción de la prolactina, así como en el procesamiento y la síntesis de la misma, en la que tales mecanismos de óxido-reducción desempeñarían una acción fundamental. En apoyo a las posibilidades mencionadas, de polimerización reversible y de proteólisis de la prolactina hipofisiaria, se ha observado que la acción de los agentes tiólicos también se manifiesta en homogenados de hipófisis; que su acción inductora de la indetectabilidad se debe a la oligomerización de la forma monomérica (23kDa) de la hormona; y que la reversibilidad de dicho fenómeno es dependiente del pH al que son incubados los homogenados (53). Dichos agentes tiólicos provocan indetectabilidad de la prolactina a pH ácido, (pH 5-6), mientras que a pH alcalino (pH 8-10) provocan que la hormona indetectable existente en el homogenado de hipófisis recupere su detectabilidad. Este efecto es similar al mecanismo previamente descrito del bicarbonato sobre el mismo fenómeno. Dado que la simple incubación (a 37°C durante 1-3 hs) de homogenados ácidos o alcalinos provoca los mismos cambios obtenidos en presencia de tioles, aunque en menor magnitud, y puesto que tales cambios son bloqueados por factores alquilantes (NEM, o IAA), se sugirió que los tioles endógenos contenidos en la hipófisis, activados por el pH

intracelular o intragranular, son los responsables de los cambios de detectabilidad de la hormona observados en condiciones fisiológicas (53).

Recientemente se ha demostrado que la inhibición de la transformación *in vitro* de la prolactina por extractos ácidos de la eminencia media (PIF) de rata es bloqueada por los agentes tiólicos antes mencionados. Los cationes divalentes, como el Zn, Ni, etcétera, son capaces de inhibir el intercambio tiol-disulfuro (54). El Zn tiene un efecto similar al de la DA y el PIF y su acción inhibitoria es bloqueada por agentes tiólicos (55). Estos resultados sugieren que, en la adenohipófisis de la rata lactante, la inhibición de la transformación, la repleción y la liberación de la prolactina por agentes hipotalámicos ocurren al inhibir el intercambio tiol-disulfuro, tanto en la reducción-oxidación inicial que dará lugar a la prolactina transformada como en el mismo proceso que dará lugar a las prolactinas que o bien son reaccumuladas en la hipófisis después de la depleción, o bien son liberadas. Por todo lo anterior, y a manera de conclusión preliminar, se puede considerar que la transformación de la prolactina por la hipófisis de la rata lactante es un fenómeno postraduccional de la hormona madura en forma granular y que desde el punto de vista fisiológico tiene por objeto regular la disponibilidad de la hormona en forma liberable, y permitir las modificaciones estructurales de la misma que dan lugar a formas con diversa actividad bioinmunológica (véase más adelante).

Estudios sobre las formas variantes de la prolactina durante la transformación y liberación de la misma por la adenohipófisis de la rata lactante. Como se mencionó en una sección previa, la hipótesis de trabajo de nuestro laboratorio postula que la transformación de la prolactina es debida a una menor detectabilidad de la misma, asociada a un cambio estructural de la molécula hormonal, cuya regulación y control es efectuado, respectivamente, por mecanismos de intercambio tiol-disulfuro pH-dependientes y por la inhibición dopaminérgica hipotalámica. Recientemente se realizaron observaciones sobre las formas variantes o isohormonas de la prolactina durante la transformación *in vitro* de la misma y se determinó la influencia de la dopamina y de agentes tiólicos sobre dichas variantes. Dado que, como ya fue señalado, la prolactina está constituida por una serie de variantes estructurales, las observaciones realizadas llevaron el propósito de precisar a partir de cuál de las variantes de la hormona se generaba la oligomerización de la misma, que supuestamente sucede durante el proceso

de transformación. Por otra parte, también se consideró importante determinar si los cambios asociados a la transformación de la prolactina suceden en la forma granular de la misma y, finalmente, qué tipo de variantes de la hormona y en qué proporción son secretadas *in vitro* por la hipófisis.

En estos experimentos la prolactina hipofisiaria fue analizada tanto mediante su marcaje isotópico (con ³H-Leucina) *in vivo* (24) como a través de identificar las variantes inmunoactivas de la hormona en geles de poliacrilamida. Los resultados obtenidos mostraron que la transformación de la prolactina está asociada a un incremento en las variantes poliméricas de alto peso molecular (vgr., > 100 kDa de la hormona), el cual ocurrió a expensas de la forma monomérica (23 kDa) de la misma. Por otra parte, se confirmó que estos cambios son inhibidos por dopamina e inducidos por agentes reductores tiólicos. Finalmente, se confirmó que los cambios de la prolactina observados durante la incubación de los tejidos suceden también en los gránulos maduros de la misma, por lo que es posible suponer que es en dicho compartimento granular donde sucede la transformación de la prolactina y se lleva a cabo su regulación y control.

Con relación a la prolactina secretada al medio de incubación, se observó que si bien la forma monomérica de la hormona era secretada en alta proporción, otras variantes de diferente peso molecular (vgr., 16-97 kDa), son también secretadas en proporción variable. Por otra parte, se encontró que una variante de alto peso molecular (vgr., > 100 kDa) fué también secretada en alta proporción, similar a la mostrada por la forma monomérica de la prolactina. Es importante mencionar que dicha variante oligomérica está constituida a su vez por una serie de formas moleculares de menor peso, entre las que destaca una de 27 kDa. Aunque se desconoce la naturaleza de estas formas de la prolactina, los datos recabados hasta ahora hacen suponer un origen extragranular de las mismas. En caso de que tal suposición sea confirmada, será necesario considerar la existencia de una vía extragranular, vgr., de tipo constitutivo, en la secreción fisiológica de la prolactina.

Influencia del pH sobre la secreción basal y sobre la secreción de prolactina regulada por dopamina. Como ya se mencionó, la participación de mecanismos de intercambio tiol-disulfuro en la transformación de la prolactina es dependiente del pH, y ya han sido referidas las observaciones que apoyan la posibilidad de que el pH intracelular y/o intragranular ejerza una influencia importante en la secreción de prolactina.

Con el propósito de analizar esta hipótesis, recientemente determinamos, mediante experimentos farmacológicos, el efecto de diferentes sustancias capaces de acidificar el pH intracelular, tales como el dinitrofenol (DNP), la amilorida (AMI), el cloruro de amonio (NH_4Cl), la nigericina, etcétera, sobre la transformación y liberación de prolactina en condiciones basales y en presencia de dopamina. Los resultados obtenidos mostraron que el DNP, la nigericina y el NH_4Cl contrarrestan de manera selectiva la inhibición dopaminérgica sobre la transformación de la prolactina, aún cuando no modifican la inhibición de la liberación de la hormona por la amina. Por otra parte, cuando se empleó la AMI se observó que esta sustancia incrementa por sí misma la transformación de la hormona, a la vez que inhibe claramente la liberación de la misma. Asimismo, cuando se aplicó conjuntamente la AMI con la dopamina se obtuvo una inhibición considerable de la liberación hormonal, la cual fue superior a la obtenida de manera independiente por cada uno de estos agentes.

Por otra parte, en contraste con estos efectos, la AMI no antagonizó la inhibición dopaminérgica de la transformación de la hormona. Estos resultados sugieren que la AMI y la dopamina compiten por el mismo mecanismo sobre la transformación de la prolactina pero que ejercen acciones independientes sobre la liberación de la hormona.

Los resultados arriba mencionados sugieren que la acidificación intracelular contrarresta la inhibición dopaminérgica de la transformación de la prolactina y que en dicha acidificación probablemente participa un mecanismo de intercambio Na^+/H^+ . Esta hipótesis se basa en los efectos obtenidos con la AMI sobre la transformación y en el hecho de que dicha sustancia es considerada como un inhibidor específico del mecanismo responsable del intercambio Na^+/H^+ celular (56).

Otros resultados recientes que apoyan esta hipótesis son, por una parte, el de que en presencia de veratrina, compuesto que incrementa el Na^+ intracelular (56), se inhibe la transformación de la prolactina y se bloquea la acción de AMI sobre el mismo fenómeno. Por la otra, cuando se analizó el efecto de la AMI en homogenizados de hipófisis (pH 7.5) se observó una reducción drástica de la detectabilidad de la prolactina similar a la obtenida *in vitro* con dicho compuesto, o a la obtenida en incubación ácida (pH 6.5) de homogenizados de hipófisis.

Considerados en conjunto, los resultados mencionados apoyan la probabilidad de que la acidificación intracelular de los lactotrofos sea un evento asociado normalmente a la activación secretoria de los mismos. Dado que actualmente se considera que la interrupción transitoria del tono dopaminérgico hipotalámico es la causa principal de la transformación y subsecuente liberación de la prolactina, es posible que dicha interrupción esté asociada a la acidificación intracelular y/o intragranular en los lactotrofos y que, en dicha acidificación, participen mecanismos iónicos de intercambio Na^+/H^+ . Sin embargo, se requieren estudios adicionales sobre la interacción de estos mecanismos con otros mecanismos bien conocidos que participan en la fisiología de la secreción de prolactina.

Edad intracelular y regulación de la secreción de la prolactina. Otros factores que afectan la secreción de la prolactina y que, a su vez, pueden ser regulados por mecanismos de intercambio tiol-disulfuro, son los relacionados con la maduración intracelular y la liberación de la hormona después de su transformación. Sólo la hormona que ha sido sintetizada 4 a 8 hrs antes es susceptible de ser transformada y liberada, mientras que las hormonas con menos de 4 hrs, o aquéllas de 16 a 24 hrs de edad son retenidas o degradadas, respectivamente (24). Estudios *in vitro* sobre la dinámica secretora de las prolactinas de diferente edad (marcadas *in vivo* con ^3H -Leucina, 10 min a 24 hrs antes de la incubación de las hipófisis) muestran la aparente existencia de un patrón de secreción secuencial de las prolactinas de diferentes edades. Es decir, que las prolactinas de 10 min, 1 h y 16-24 hrs son secretadas con una dinámica diferente y en menor proporción que la prolactina de 4-8 hrs de edad. Asimismo, tal patrón secuencial está asociado con un período en el que dichas hormonas son secretadas al máximo, aun cuando la duración de dicho período es diferente para cada prolactina. Al considerar en conjunto los periodos de dicha actividad alta por cada prolactina, se puede calcular que la duración de este período es de 6 a 8 hrs. Este período de máxima secretabilidad es precedido por un período de 2 hrs durante el cual la actividad específica de la prolactina aumenta gradualmente y es seguido por un período de alrededor de 16 hrs durante el cual la hormona muestra únicamente baja actividad específica (57).

En conjunto, estos datos, y los obtenidos sobre la transformación *in vivo* de las prolactinas de diferentes edades (24), sugieren que, después de la biosíntesis, la

prolactina granular en cada lactotrofo presenta una secuencia cíclica de cambios, que va en paralelo con la maduración de la misma en forma granular. Estos cambios determinarían el destino de la hormona, ya sea para ser transformada en hormona liberable (en cuyo caso dichos cambios se reflejarían en sus perfiles de secreción), o para ser degradada por el sistema lisosomal de la célula (2). Se considera que este modelo es adecuado para describir la secuencia general de los eventos asociados a la secreción de la prolactina por la hipófisis de la rata lactante. Dado que tal secuencia es consistente con las observaciones de la ontogenia de la prolactina granular (58), es posible que el modelo pueda ser aplicado a otras condiciones fisiológicas diferentes a las del animal lactante.

En relación a los mecanismos de óxido-reducción y al hecho de que la hormona madura (de 4 a 8 hrs de edad) es la que puede ser afectada por tales mecanismos, es posible que existan diferencias estructurales entre las prolactinas de diferentes edades que están asociadas; es decir, las causantes de su comportamiento funcional y de la susceptibilidad que muestran a la acción de agentes reguladores hipotalámicos.

Por consiguiente, un análisis de la estructura, la inmunoreactividad y la susceptibilidad de la(s) prolactina(s) a la acción de agentes tióxicos y factores hipotalámicos podría dar información valiosa sobre el procesamiento, secreción y degradación de la hormona por los lactotrofos hipofisarios. Resultados recientes han mostrado que *in vitro* la tasa de incorporación de la ³H-leucina a la prolactina y la síntesis de novo de la misma hormona *in vivo* se ven frenadas por la dopamina o aceleradas por la TRH. Asimismo, se ha observado que tales hormonas hipotalámicas ejercen sus acciones inhibitorias

(dopamina) y estimuladora (TRH) sobre la secreción *in vitro* de la prolactina. La intensidad de estos efectos depende de la edad de la hormona. En términos generales, la prolactina de 4 a 8 hrs de edad es menos inhibida por la dopamina y más estimulada por la TRH que las prolactinas más jóvenes o más viejas (57).

Estos resultados sugieren que el control hipotalámico y los mecanismos de regulación intracelular de la prolactina funcionan armónicamente a todos los niveles del proceso de secreción, desde la biosíntesis hasta la liberación de la hormona.

Conclusiones

La rata lactante constituye un modelo experimental adecuado para analizar algunos de los fenómenos principales que preceden y determinan la secreción de PRL en respuesta a estímulos fisiológicos. Después de ser sintetizada, la hormona se concentra en gránulos, los cuales, en paralelo con su maduración y aumento de tamaño, presentan modificaciones físico-químicas secuenciales que determinan que la hormona sea transformada y convertida de una forma preliberable a una forma liberable; o bien que sea degradada por lisosomas. Estos cambios implican la existencia, dentro de la célula secretora de prolactina, de mecanismos reguladores capaces de retener la hormona recién sintetizada para su mayor procesamiento y de preservar o almacenar la hormona madura, la que será secretada selectivamente o, si no es secretada, será digerida. La transformación es un proceso de intercambio tiol:disulfuro, dependiente del pH, que resulta en la polimerización reversible de la molécula de prolactina a partir de su forma monomérica y que lleva aparejada la proteólisis parcial selectiva de la misma, lo que origina formas submonoméricas con diversa actividad bioinmunológica.

REFERENCIAS.

1. Cowie AT, Forsyth IA, Hart IC. Hormonal control of lactation. Springer-Verlag, 1980.
2. Farquhar MG. Secretion and crinophagy in prolactin cells. En: Dellman AD, Johnson JA, Klachko MD, eds. Comparative endocrinology of prolactin. New York: Plenum Press, 1977:37-53.
3. Nicoll CS. Physiological actions of prolactin: En: Knobil E, Sawyer WH, eds. Handbook of Physiology. Am Physiol Soc, Washington DC, 1974:253-72.
4. Cowie AT, Tindal JS. The physiology of lactation. Monographs of the Physiological Society. Arnold, Londres, 1971.
5. Tucker HA. General endocrinological control of lactation. En: Larson BL, Smith VR, eds. Lactation. A comprehensive treatise. New York: Academic Press, 1974:277-85.
6. Smith MS, McLean BK, Neill JD. Prolactin: The initial luteotropic stimulus of pseudopregnancy in the rat. Endocrinology 1976;98:1370-7.
7. Negro-Vilar A, McCann SM. Evidence for a role of prolactin in prostate and seminal vesicle growth in immature male rats. Endocrinology 1977;100:729-37.
8. Neill JD. Prolactin: Its secretion and control. En: Knobil E, Sawyer WH, eds. Handbook of Physiology. Am Physiol Soc. Washington DC, 1974:469-88.

9. Neill JD. Neuroendocrine regulation of prolactin secretion. En: Martini L, Ganong WF, eds. *Frontiers in Neuroendocrinology*. Nueva York: Raven Press, 1980:129-41.
10. Bethea CL, Neill JD. Prolactin secretion after cervical stimulation of rats in constant dark or constant light. *Endocrinology*. 1979;104:870-76.
11. Smith M, Neill JD. Termination at midpregnancy of the two daily surges of plasma prolactin initiated by mating in the rat. *Endocrinology*. 1976;98:696-701.
12. Freeman ME, Smith AD, Nazian SJ, Neill JD. Ovarian and hypothalamic control of the daily surges of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology*. 1974;94:875-82.
13. Amenomori Y, Chen CL, Meites J. Serum prolactin levels in the rats during different reproductive states. *Endocrinology* 1970;86:506-10.
14. Grosvenor CE, Mena F. Neural and hormonal control of milk secretion and milk ejection. En: Larson BL, Smith VR, eds. *Lactation: A Comprehensive Treatise*. Nueva York: Academic Press, 1974:27-65.
15. Grosvenor CE, Mena F. Regulating mechanisms for oxytocin and prolactin secretion during lactation. En: Muller EE, McCleod RM eds. *Neuroendocrine perspectives*. Amsterdam: Elsevier Biomedical Press, 1982:69-92.
16. Grosvenor CE, Maiweg H, Mena F. A study of factors involved in the development of the exteroceptive release of prolactin in the rat. *Hormon Behav* 1970;1:111-20.
17. Mena F, Grosvenor CE. Effect of suckling and of exteroceptive stimulation upon prolactin release in the rat during late lactation. *J Endocr* 1972;52:11-22.
18. Grosvenor CE, Mena F, Withworth NS. The secretion rate of prolactin in the rat during suckling and its metabolic clearance rate after increasing intervals of nonsuckling. *Endocrinology* 1979;104:372-6.
19. Grosvenor CE, Mena F. Effect of suckling upon the secretion and release of prolactin from the pituitary of the lactating rat. *J Anim Sci* 1971;32:115-36.
20. Vila-Porcile E, Oliver C. Exocytosis and related membrane events. En: Jutisz H, McKernes KW, eds. *Synthesis and release of adenohypophyseal hormones*. Nueva York: Plenum Press, 1980:67-80.
21. De Greef WF, Plotsky PM, Neill JD. Dopamine levels in hypophyseal stalk plasma and prolactin levels in peripheral plasma of the lactating rat: Effects of a simulated suckling stimulus. *Neuroendocrinology* 1981;32:229-33.
22. Grosvenor CE, Withworth NS, Mena F. Evidence that depletion and release phases of prolactin secretion in the lactating rat have different activation thresholds in response to exteroceptive stimulation from rat pups. *Endocrinology* 1981;108:820-4.
23. Mena F, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Aguayo D, Forray C, Grosvenor CE. A solubility shift occurs during depletion-transformation of prolactin within the lactating rat pituitary. *Endocrinology* 1982;111:1086-91.
24. Mena F, Martínez de la Escalera G, Clapp C, Grosvenor CE. In vivo and in vitro secretion of prolactin by lactating rat adenohypophyses as a function of intracellular age. *J Endocr* 1984;101:27-32.
25. Nicoll CS, Mena F, Nichols CW, Green SH, Tai SM, Russell YM. Analysis of suckling-induced changes in adenohypophyseal prolactin concentration in the lactating rat by three assay methods. *Acta Endocrinol* 1976;83:512-21.
26. Mena F, Pacheco P, Grosvenor CE. Effect of electrical stimulation of mammary nerve upon pituitary and plasma prolactin concentrations in anesthetized lactating rats. *Endocrinology* 1980;106:458-62.
27. Chang NG, Nikitovitch-Winer NB. Correlation between suckling-induced changes in the ultrastructure of mammothrophs and prolactin release. *Cell Tiss Res* 1976;166:399-405.
28. Shiino M, Williams G, Rennels EG. Ultrastructural observation of pituitary release of prolactin in the rat by suckling stimulus. *Endocrinology* 1972;90:176-87.
29. Grosvenor CE, Mena F. Evidence that thyrotropin-releasing hormone and hypothalamic prolactin-releasing factor may function in the release of prolactin in the lactating rat. *Endocrinology* 1980;107:863-8.
30. Grosvenor CE, Mena F, Withworth NS. Evidence that dopaminergic prolactin-inhibiting-factor mechanism regulates the depletion-transformation phase and not the release phase of prolactin secretion during suckling in the rat. *Endocrinology* 1980;106:481-5.
31. Nicoll CS, Swearingen KC, Matteij JAM. Relationship between depletion and release of prolactin in the lactating rat: A quantitative analysis. En: Mena F, Valverde CM, eds. *Prolactin secretion: A multidisciplinary approach*. Nueva York: Academic Press, 1984:285-301.
32. De Greef WF, Visser TS. Evidence of the involvement of hypothalamic dopamine and thyrotropin-releasing hormone in suckling-induced release of prolactin. *J Endocr* 1981;91:213-23.
33. Plotsky PM, Neill JD. Interactions of dopamine and thyrotropin-releasing hormone in the regulation of prolactin release in lactating rats. *Endocrinology* 1982;111:168-73.
34. Haisenleder DJ, Moy JA, Gala RR, Lawson DM. The effect of transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in pseudopregnant rats. *Endocrinology* 1986a;119:1989-95.
35. Haisenleder DJ, Moy JA, Gala RR, Lawson DM. The effect of transient dopamine antagonism on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin release in pregnant rats. *Endocrinology* 1986b;119:1980-8.
36. Fagin KD, Neill JD. The effect of dopamine on thyrotropin-releasing hormone-induced prolactin secretion in vitro. *Endocrinology* 1981;109:1835-40.
37. Martínez de la Escalera G, Guthrie J, Weiner RI. Transient removal of dopamine potentiates the stimulation of prolactin release by TRH but not VIP: Stimulation via Ca²⁺/protein kinase pathway. *Neuroendocrinology* 1988;47:38-45.
38. Martínez de la Escalera G, Weiner RI. Mechanism(s) by which the transient removal of dopamine regulation potentiates the prolactin-releasing action of TRH. *Neuroendocrinology* 1988;47:186-93.
39. Giannattasio G, Zannini A, Meldolesi J. Molecular organization of rat prolactin granules. I. In vitro stability of intact and membraneless granules. *J Cell Biol* 1975;64:246-50.

40. Zanini A, Giannattasio G, Nussdorfer G, Margolis PK, Meldolesi J. Molecular organization of prolactin granules II: Characterization of glycosaminoglycans and glucoproteins of bovine prolactin granule matrix. *J Cell Biol* 1979;86:260-72.
41. Merchant-Larios H, Mena F. Evidence that extracellular glycoconjugates interact with prolactin granules during exocytosis in lactating rat adenohypophyses. *J Ultrastruct Res* 1982;80:53-61.
42. Lewis UJ, Singh RNP, Lewis LJ, Seavey BK, Sinha YN. Glycosylated ovine prolactin. *Proc Natl Acad Sci* 1984;81:385-9.
43. Haro LS, Talamantes F. Secreted mouse prolactin and stored ovine prolactin desamido isoforms: Effect of desamidation on both receptor binding and immunoreactivity. *Endocrinology* 1983; Suppl 112:116.
44. Nyberg F, Roos P, Wide L. Human pituitary prolactin isolation and characterization of three isohormones with different bioassay and radioimmunoassay activities. *Biochim Biophys Acta* 1980;625:255-9.
45. Kiefer KA, Malarkey B. Size heterogeneity of human prolactin in CSF and serum: Experimental conditions that alter gel filtration patterns. *J Clin Endocr Metab* 1978;46:119-24.
46. Lawson DM, Stevens RW. Size heterogeneity of pituitary and plasma prolactin: Effect of chronic estrogen treatment. *Life Sci* 1980;27: 1489-94.
47. Sinha YN. Molecular size variations of prolactin and growth hormone in mouse serum: Strain differences and alterations of concentrations by physiological and pharmacological stimuli. *Endocrinology* 1980;107: 1959-69.
48. Mitra J. A novel cleaved prolactin in the rat pituitary: Part I. Biosynthesis, characterization and regulation control. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;95:1750-9.
49. Singh RNP, Lewis LJ, Seavey BK, Lewis UJ. An open loop variant of prolactin. *Endocrinology*, 1983; Suppl 112:116.
50. Jocelyn PC. Physical aspects of SH and SS groups. En: *Biochemistry of the SH group*. Londres: Academic Press, 1972:47.
51. Lorenson MY, Miska SP, Jacobs LS. Molecular mechanisms of prolactin release. En: Mena F, Valverde CM, eds. *Prolactin secretion: A multidisciplinary approach*. Nueva York: Academic Press, 1984;141-60.
52. Mena F, Clapp C, Aguayo D, Lorenson MY, Martínez de la Escalera G. Thiol regulation of depletion-transformation and release of prolactin by the pituitary of the lactating rat. *Endocrinology* 1986;118: 1795-1802.
53. Mena F, Morales MT, Clapp C, Hummelt G, Martínez de la Escalera G. Effect of pH and thiols on polymerization and proteolytic processing of pituitary PRL. *The Endocrine Society, New Orleans, LA. 1988:171*.
54. Lorenson MY, Robson DL, Jacobs LS. Divalent cation inhibition of hormone release from isolated adenohypophyseal secretory granules. *J Biol Chem* 1983;258:8618-22.
55. Martínez de la Escalera G, Clapp C, Morales MT, Lorenson MY, Mena F. Reversal by thiols of dopamine-, stalk median-eminence-, and zinc-induced inhibition of prolactin transformation in adenohypophyses of lactating rats. *Endocrinology* 1986;118:1803-7.
56. Benos DJ. Amiloride: A molecular probe of sodium transport in tissues and cells. *Am J Physiol* 1982;242:C131-C135.
57. Mena F, Clapp C, Aguayo D, Morales MT, Grosvenor CE, Martínez de la Escalera G. Regulation of prolactin secretion by dopamine and thyrotropin-releasing hormone in lactating rat adenohypophyses: influence of intracellular age of the hormone. *Endocrinology* 1989;125: 1814-20.
58. Farquhar MG, Reid JJ, Daniell LW. Intracellular transport and packaging of prolactin: A quantitative electron microscope autoradiographic study of mammothrophs dissociated from rat pituitaries. *Endocrinology* 1976;102:296-311.