

Instituto Nacional de Endocrinología

ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LA PROLACTINA EN PACIENTES CON GALACTORREA Y ANOVULACIÓN

Lic. Julio César Rodríguez García,¹ Lic. Niubys Cayado Gutiérrez² y Lic. Víctor Cabrera Oliva³

RESUMEN

Uno de los efectos más documentados para la prolactina es su actividad lactótrofa y sobre el desarrollo mamario en mamíferos. Existen numerosos casos de pacientes normoprolactinélicas que cursan con galactorrea, en las cuales se desconoce el mecanismo responsable de este signo clínico, postulándose la posible existencia de formas hiperactivas de la hormona. En el presente trabajo se estudió la actividad biológica de la prolactina en pacientes normoprolactinélicas e hiperprolactinélicas con galactorrea y/o anovulación asociada, midiendo la actividad mitogénica de la hormona en un bioensayo de células Nb2 en cultivo, a un grupo de muestras de suero obtenidas en el Laboratorio de Reproducción Asistencial del Instituto Nacional de Endocrinología a las cuales previamente se les determinó el nivel de prolactina sérica inmunorreactiva mediante radioinmunoanálisis; se realizó además un ensayo de inhibición de la actividad biológica de la hormona en presencia de anticuerpos antiprolactina, para medir hasta qué punto la actividad mitogénica detectada se debía a la prolactina presente en las muestras. Los resultados obtenidos demuestran que la galactorrea es independiente de los niveles séricos de prolactina inmunorreactiva, no se demostró la existencia de formas hiperactivas responsables de este signo clínico en los diferentes grupos de pacientes normoprolactinélicas y se corroboró el papel biológico de la hormona en el fallo ovárico que tiene lugar en las pacientes hiperprolactinélicas.

Descriptores DeCs: ANOVULACION; GALACTORREA; PROLACTINA.

La prolactina (Prl) es una de las hormonas más versátiles de la glándula pituitaria en términos de estructura y acción biológica.^{1,2} Se ha postulado que para el funcionamiento biológico normal del ovario

y la secreción de leche son necesarias cantidades mínimas de Prl que varían desde 5 hasta 25 ng/L, mientras elevados niveles séricos de la hormona están asociados con una variedad de trastornos reproductivos

¹ Licenciado en Biología. Instituto Nacional de Endocrinología.

² Licenciada en Bioquímica. Instituto de Hematología.

³ Licenciado en Bioquímica. Instituto Nacional de Endocrinología.

que incluyen: amenorrea, oligomenorrea, anovulación y ciclos ovulatorios cortos.³

McNatty ha demostrado que los niveles elevados de Prl en plasma y fluido folicular están asociados con un número reducido de células de granulosa y una marcada reducción de la esteroidogénesis intrafolicular.⁴ Para mantener la producción de progesterona (Prg) estimulada por LH se necesitan niveles de Prl equivalentes a los encontrados durante el ciclo menstrual normal. Estos estudios sugieren que los niveles elevados de Prl actúan directamente sobre el ovario, suprimen el desarrollo folicular e inhiben la secreción de gonadotropinas, actúan sobre el eje hipotalámico-pituitario.

Algunos trastornos en la secreción de Prl han sido asociados con la disfunción menstrual, los niveles séricos elevados están asociados con una variedad de trastornos reproductivos que incluyen: amenorrea, oligomenorrea, anovulación y ciclos ovulatorios con fases lúteas cortas o inadecuadas.⁵ Estos niveles hormonales también suelen presentarse en pacientes con ciclos menstruales regulares, galactorrea e infertilidad, por lo que la hipersecreción de Prl permite constatar otras funciones de la misma. La hiperprolactinemia es frecuentemente causada por tumores pituitarios o prolactinomas, tratamiento con ciertos medicamentos, destrucción de tejidos de la región hipotalámica, producción ectópica de la hormona y recientemente ha sido asociado con la diabetes idiopática insípida.⁶ Además, la concentración sérica de la hormona se puede incrementar por una serie de estados fisiológicos, como: la estimulación mamaria, el coito, el ejercicio, el embarazo y el estrés, físico y/o psíquico.

Aunque generalmente la galactorrea es asociada a estados de hiperprolactinemia, existen numerosos casos donde concen-

traciones normales de Prl radioinmuno-detectable (Prl-RIA) están relacionados con la presencia de galactorrea y trastornos ovulatorios.⁷ Hasta el presente no ha sido bien establecida la importancia de la galactorrea como signo de relativa hiperprolactinemia para pacientes con determinaciones Prl-RIA normales y disfunción ovulatoria, la presencia de galactorrea en estas pacientes sugiere la existencia de un trastorno fisiológico en la acción de la Prl e indica la discrepancia entre la Prl-RIA sérica y los hallazgos clínicos mencionados.

Desde hace algún tiempo se conoce que la Prl sérica inmunorreactiva puede no siempre correlacionarse con la bioactividad de ciertas formas moleculares de la hormona. En la actualidad se han descrito situaciones donde la bioactividad de algunas formas de Prl está disminuida, sin embargo, la posibilidad de que existan formas moleculares con actividad biológica elevada no ha sido adecuadamente estudiada. *Mitra* demostró que la forma escindida de la Prl(16kDa), obtenida de la glándula pituitaria de rata, incrementa la síntesis de ácido desoxirribonucleico y la división celular en células epiteliales mamarias.⁸ *Love* y *Rose*, encontraron niveles elevados de Prl bioactiva en pacientes con cáncer de mama, mientras los valores de Prl-RIA eran normales.⁹ Estos estudios sugieren la posibilidad de que existan diferentes formas de Prl bioactiva, algunas de las cuales no pueden ser detectadas por RIA.

En diferentes series estudiadas, entre el 28 y el 55 % de las pacientes con galactorrea presentan concentraciones normales de Prl sérica y la proporción es mayor si se excluyen las pacientes amenorreicas.¹⁰ El mecanismo de la galactorrea en estas pacientes es aún desconocido. Mujeres con galactorrea y trastornos en la ovulación asociados con

valores de Prl-RIA normales, representan un grupo ideal para investigar la existencia de Prl hiperactiva.¹¹

Con vistas a esclarecer algunas de estas cuestiones se desarrolló el presente trabajo, que tuvo como objetivos: investigar si la presencia de galactorrea en pacientes normoprolactinélicas se debe a la existencia de formas hiperactivas de la hormona y corroborar el papel fisiológico de la Prl en el mecanismo responsable de la anovulación en pacientes normoprolactinélicas e hiperprolactinélicas.

MÉTODOS

OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS

Utilizamos muestras de plasma de pacientes de la Consulta de Reproducción del INEN, las almacenamos a -20 °C hasta el momento del bioensayo, una vez determinada la concentración de Prl inmunorreactiva por RIA.

Una vez recepcionada la muestra, tomamos los datos del diagnóstico y el número de historia clínica de cada paciente para la posterior conformación de los grupos de estudio, el indicador de la ovulación fue el nivel de progesterona plasmática determinado a la muestra por RIA, seleccionamos los grupos de estudios siguientes:

1. Control: normoprolactinélica ovuladora.
2. Normoprolactinélica ovuladora con galactorrea.
3. Normoprolactinélica anovuladora con galactorrea.
4. Hiperprolactinélica ovuladora con galactorrea.
5. Hiperprolactinélica anovuladora con galactorrea.

Centrifugamos las muestras durante 30 min a 3 000 rpm para eliminar los coágulos de fibrina, decantamos y pasamos por filtros milipore de 0,2 μ m para garantizar la esterilidad de la muestra en el momento del ensayo.

MANTENIMIENTO DE LAS CÉLULAS Nb2 EN CULTIVO

MEDIO DE MANTENIMIENTO (MM)

Empleamos el medio Fischer's (Flow Laboratories) suplementado con 10 % de suero de caballo (HS, Oxoid LTD), 10 % de suero bovino fetal (FCS, GIBCO), 1 % de solución antibiótico-antimicótico 100x (10 000U Penicilina, 19mg estreptomycin, 25mg anfotericina B / mL; SIGMA/ Cell Culture), 10^{-4} M de 2- β -mercaptoetanol (2-ME) y 1% de Na_2HCO_3 .

MEDIO DE QUIESCENCIA (MQ)

Nuestro medio de quiescencia fue Fischer's suplementado con 10 % HS, 1 % FCS, 1 % de solución antibiótico-antimicótico 100x, 10^{-4} M de 2-ME y 1 % de Na_2HCO_3 .

MEDIO DE ENSAYO (ME)

Empleamos el medio Fischer's suplementado con 10 % HS, 10^{-4} M de 2-ME y 1 % de Na_2HCO_3 .

Mantuvimos las células en cultivo en suspensión con MM en una atmósfera húmeda de 5% CO_2 , 95% O_2 , 37°C, subcultivándose al registrar concentraciones celulares de 1×10^6 células /mL para mantener el cultivo activo, un alto porcentaje de viabilidad y un tiempo de replicación constante.

Bioensayo: 24 h antes del ensayo, transferimos las células a MQ con el fin de mantenerlas en estado estacionario. En cada ensayo montamos una curva estándar de oPrl (NIH-USA) a partir de una solución estándar a la que realizamos diluciones sucesivas 1:2 que comprenden un rango de concentraciones de 4,9 a 78ng/L de hormona disuelta en ME. Añadimos 50µL de cada dilución por pozo que completamos con 50µL de suspensión celular y 100mL de ME para un volumen final de 200µL. A cada punto de la curva le realizamos 4 réplicas.

Sembramos las placas de cultivo de 96 pozos con 50µL de suspensión celular en ME a razón de 5×10^4 células/pozo, completamos el volumen de ensayo con 50µL de muestra y 100 µL de ME. Realizamos 6 réplicas por muestra y, simultáneamente, montamos 6 réplicas de cada muestra a las que añadimos 50µL de un antisuero anti-Prl(RIA-OMS) para determinar el porcentaje de inhibición de la actividad mitogénica de la hormona. Incubamos las placas durante 72 h bajo las mismas condiciones de cultivo de mantenimiento y al final de este período aplicamos un pulso de timidina tritiada ($T-H^3$) añadiendo 20µL por pozo de una solución estéril de 1µCi/mL de $T-H^3$; incubamos durante 6-8h bajo las mismas condiciones antes mencionadas y al término de este período, congelamos las placas a -70 °C. Posteriormente, cosechamos la suspensión celular en un cosechador semiautomático de células para determinar, por conteo de radiactividad en un contador de radiaciones β LKB, la proliferación celular. Determinamos la concentración de Prl interpolando los cpm promedio en la curva estándar de oPrl.

A cada muestra le determinamos la concentración de Prl plasmática por un RIA en fase líquida que se aplica en el Laboratorio de Reproducción Asistencial del INEN.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Determinamos la existencia de diferencias significativas entre el bioensayo de células Nb2 en cultivo y el RIA a través de la distribución t de Student y, de igual manera, determinamos las diferencias existentes entre los niveles de Prl-RIA y Prl-BIO de los diferentes grupos de ensayo con respecto al grupo control. Analizamos 15 muestras por cada grupo, consideramos valores de $p < 0,001$ como altamente significativos.

RESULTADOS

En la figura 1 aparece la curva dosis-respuesta típica para el bioensayo de oPrl en células Nb2 en cultivo. Se puede apreciar un incremento de la actividad biológica de la hormona directamente proporcional al incremento de la concentración hormonal en el medio de ensayo, en un rango que comprende valores fisiológicos normales y valores correspondientes a estados hiperprolactinémicos.

Las diferencias obtenidas entre los niveles de Prl calculados por RIA y bioensayo (Prl-BIO) se muestran en la tabla, en todos los grupos de estudio existen diferencias altamente significativas, aunque en el de pacientes hiperprolactinémicas anovuladoras la concentración hormonal se mantiene en un rango de valores hiperprolactinémicos en ambos sistemas de detección empleados.

En esta tabla se observan también los porcentajes de inhibición de la proliferación celular, cuando añadimos al medio de cultivo una concentración fija de antisuero anti-Prl. En los grupos normoprolactinémicos se aprecian niveles de inhibición prácticamente despreciables mientras los grupos hiperprolactinémicos exhiben porcentajes de inhibición superiores que en el caso de las pacientes que cursan con anovulación sobrepasan el 50%.

Fig. 1. Curva dosis-respuesta del bioensayo de oPrl en células Nb2 en cultivo.

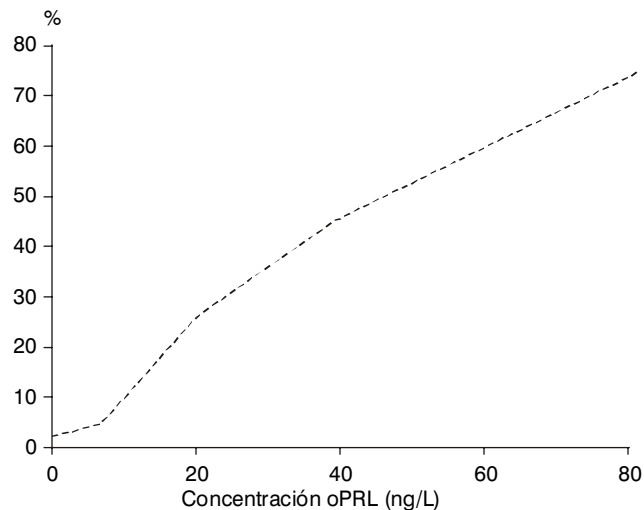


TABLA. Diferencias entre los niveles de Prl calculados por RIA y bioensayo (Prl-BIO)

Grupo	Descripción	n	Prl-RIA (ng/L) ^a	Prl-BIO (ng/L) ^a	%	t ^p
I	Control	15	16,8 ± 0,65	4,84 ± 0,26	7,7	51,8***
II	NormoPrl-ovul + Gal	15	18,1 ± 0,40	4,40 ± 0,33	5,4	76,5***
III	NormoPrl-anovul + Gal	15	15,9 ± 0,36	5,9 ± 0,26	23,4	57,5***
IV	HiperPrl-ovul + Gal	15	40,6 ± 1,55	5,0 ± 0,46	32,2	83,6***
V	HiperPrl-anovul + Gal	15	64,5 ± 1,57	57,7 ± 1,50	72,2	24,6***

t=t calculado.

p=0,001 (nivel de significación).

I= Inhibición de la división celular en presencia de anti-Prl.

a= Media ± desviación estándar

En la Fig.2 mostramos los valores de Prl-RIA y Prl-BIO obtenidos para los diferentes grupos de estudio. Como puede observarse, no existen diferencias significativas entre los resultados obtenidos para las pacientes normoprolactinémicas con galactorrea con respecto al grupo control, los niveles de Prl se mantienen en rangos fisiológicos normales en ambos ensayos. En las

pacientes hiperprolactinémicas los niveles de Prl-RIA son significativamente superiores a los obtenidos para el grupo control y aquellas que cursan con anovulación muestran valores de Prl-BIO con diferencias altamente significativas con respecto al grupo control, se mantuvieron los niveles de marcada hiperprolactinemia en ambos ensayos.

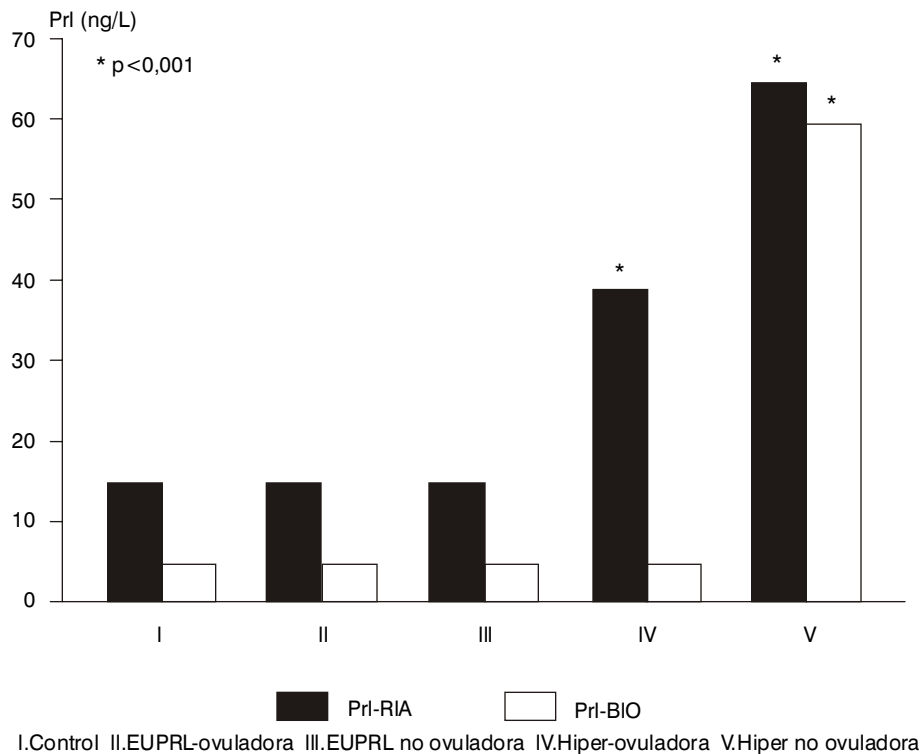


FIG. 2. Concentraciones de Prl-RIA y Prl-BIO en pacientes con galactorrea.

DISCUSIÓN

La curva dosis-respuesta obtenida para el bioensayo en células Nb2 demuestra la existencia de receptores de Prl en esta línea celular, lo que permite su utilización como sistema de estudio de la actividad biológica de esta hormona al medir su efecto sobre la división celular en cultivo.

Aunque no se muestra en la figura, durante el desarrollo experimental se observó que la actividad mitogénica de la Prl no varía a partir de concentraciones superiores a los 80ng/L, lo que puede explicarse teniendo en cuenta los resultados de otros autores que plantean que a pesar de la alta densidad de receptores de Prl presentes en esta línea celular, sólo se

observa actividad mitogénica estimuladora cuando están ocupados hasta el 35 % de dichos receptores.¹²

Las altas diferencias obtenidas entre los valores de Prl-RIA y Prl-BIO en todos los grupos de estudio apoyan la posibilidad de que existan formas moleculares inmunorreactivas de la hormona que no son reconocidas por los receptores hormonales de Prl presentes en esta línea celular.

Los resultados del estudio de inhibición obtenidos para los grupos normoprolactinémicos se corresponden con su baja actividad biológica detectada lo que a su vez concuerda con los bajos niveles de Prl inmunorreactiva en estas pacientes. Por su parte, el alto porcentaje de inhibición obtenido para las pacientes

hiperprolactinémicas anovuladoras (57,7%) indica que más del 50 % de la actividad biológica detectada en estos casos, se debe a la presencia de formas moleculares biológicamente activas de la hormona que se corresponden con los altos niveles de Prl inmunodetectables en estas pacientes, lo cual reafirma la función de estas formas de Prl en el fallo ovárico presente en las mismas.

El hecho de que en los grupos normoprolactinémicos, los valores de Prl-RIA y Prl-BIO se mantengan en rangos fisiológicos normales corrobora los resultados obtenidos por otros autores que no observaron incremento de la actividad biológica de las formas moleculares de Prl circulantes en estas pacientes, esto descarta la posible existencia de una hiperactividad biológica de la Prl inmunodetectable en las mismas.¹¹

En estas pacientes, así como en el caso de las hiperprolactinémicas ovuladoras donde la Prl-BIO está en un rango de valores normales, la galactorrea podría explicarse por la existencia de formas moleculares con actividad lactogénica mantenida, las cuales no son reconocidas por los receptores de las células Nb2 y por lo tanto, no inducen proliferación celular, teniendo los receptores de origen mamario la mayor capacidad de reconocimiento para estas formas moleculares.

Existen evidencias experimentales de la sustancial actividad mitogénica de las formas escindidas de la Prl en células epiteliales mamarias *in vivo* e *in vitro*,^{13,14} mientras otros autores han demostrado que la Prl de rata intacta, es más susceptible al clivaje en la glándula mamaria de ratas lactantes que en la glándula mamaria de ratas embarazadas o vírgenes, planteando que los productos escindidos desempeñan una función relevante en la diferenciación y la actividad secretora de la glándula.¹⁵

Otra posible explicación a la presencia de galactorrea en estas pacientes sería la existencia de otros mecanismos de tipo neurofisiológico que involucren otras hormonas y neurotransmisores. Los altos valores de Prl-RIA y Prl-BIO detectados en las pacientes hiperprolactinémicas anovuladoras demuestran que las formas moleculares de Prl inmunodetectable circulantes en estas pacientes son biológicamente activas y participan en el mecanismo responsable del fallo ovárico.

Si tenemos en cuenta que en el grupo de hiperprolactinémicas ovuladoras los niveles de Prl-BIO no difieren significativamente del grupo control y se mantienen en rangos fisiológicos normales, podríamos plantear que las formas moleculares de Prl responsables de la galactorrea en estas pacientes no tienen identidad molecular con aquellas formas responsables del fallo de la ovulación, y no existe asociación entre la galactorrea en pacientes hiperprolactinémicas y la actividad biológica de la Prl presente en las mismas.

A partir de los resultados obtenidos en el presente trabajo llegamos a las conclusiones siguientes:

1. La presencia de galactorrea en pacientes normoprolactinémicas no se relaciona con la existencia de formas moleculares hiperactivas de la Prl inmunodetectable en las mismas.
2. El fallo ovárico observado en pacientes hiperprolactinémicas está estrechamente relacionado con la existencia de formas moleculares biológicamente activas de la Prl inmunodetectable en las mismas.
3. La Prl no actúa de igual manera en los mecanismos responsables de la galactorrea y la anovulación sin identidad molecular en las formas moleculares de la hormona, responsables de estos signos clínicos.

Teniendo en cuenta estos resultados recomendamos continuar profundizando en el estudio de la posible relación existente entre

la galactorrea y los niveles de Prl, realizando estudios de receptores y actividad biológica en líneas celulares de origen mamario.

SUMMARY

One of the most documented effects of prolactin is its lactotrophic activity and its influence on the mammary development of mammals. There are many cases of normoprolactinemic patients with galactorrhoea among whom the mechanism responsible for this clinical sign is not known and reference is made to the possible existence of hyperactive forms of the hormone. In the present paper, the biological activity of prolactin in normoprolactinemic and hyperprolactinemic patients with galactorrhoea and/or associated anovulation was studied by measuring the mitogenic activity of the hormone in a bioassay of Nb2 cells in culture in a group of serum samples obtained at the Laboratory of Assistance Reproduction of the National Institute of Endocrinology. The level of immunoreactive serum prolactin was previously determined by radioimmunoanalysis. An inhibition assay of the biological activity of the hormone in the presence of anti-prolactin antibodies was also conducted to know up to what extent the detected mitogenic activity was the result of the prolactin present in the samples. The results obtained showed that galactorrhoea is independent of the serum levels of immunoreactive prolactin. The existence of hyperactive forms responsible for this clinical sign in the different groups of normoprolactinemic patients was not proved. The biological role of the hormone in the ovarian failure that takes place among hyperprolactinemic patients was confirmed.

Subject headings: ANOVULATION; GALACTORRHOEA; PROLACTIN.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Neill JD, Nagy GM. Prolactin secretion and its control. En: Knobil E, Neill JD. The Physiology of Reproduction. 2nd ed. New York: Raven Press, 1994;1833-60.
2. Briski KP, Swason GN, Sylvester PW. Size and charge heterogeneity of pituitary and plasma prolactin in the male rat. Neuroendocrinol, 1996;63:437-45.
3. DelPozo E, Wyss H, Tolis G. Prolactin and deficient luteal function. Obstet Gynecol 1979;53:282.
4. McNatty KP. Relationship between plasma prolactin and endocrine microenvironment of the developing human antral follicle. Fertil Steril 1979;32:433-8.
5. Soules MR, Bremmer WJ, Steiner RA. Prolactin secretion and corpus luteum function in women with luteal phase deficiency. J Clin Endocrinol Metabol 1991;72:906-92.
6. Yutaka OS, Murase T, Kunikasu K. Prolactin secretion in patients with idiopathic diabetes insipidus. Endocrinol 1986;38:259-63.
7. Johnson DG, Haigh J, Prescott RWG. Prolactin secretion and biological activity in females with galactorrhea and normal circulatory prolactin concentrations at rest. Clin Endocrinol 1985;22:661-78.
8. Mitra LA. Novel cleaved prolactin in the rat pituitary. Biochem Biophys Res Commun 1980;95:1760.
9. Love R, Rose D. Elevated bioactive prolactin in women at risk for familial breast cancer. Eur J Cancer Clin Oncol 1985;21:1553.

10. Ataya KM, Subramanian MG, Gala RR. Clinical value of prolactin bioassay in euprolactinemic reproductive disorders. *Fertil Steril* 1988;49:71-5.
11. Subramanian MG, Spirtos NJ, Moghissi KS. Correlation and comparison of Nb2 lymphoma cell bioassay with RIA for human prolactin. *Fertil Steril* 1984;42:870-3.
12. Bates LG, Grove DS, Mastro AM. Mechanisms of activation and suppression in rat Nb2 lymphoma cells: a model for interactions between prolactin and the immune system. *Exp Cell Res* 1995;218:567-72.
13. Clapp C, Sears PS, Richard J. Biological, receptor binding and immunological properties of 16K rat prolactin. 69th Annual Meeting of the Endocrine Society, Indianapolis IN. 225 (Abstract).
14. Ferrara N, Clapp C, Weiner R. The 16K fragment of Prl specifically inhibits basal of fibroblast growth factor stimulated growth capillary endothelial cells. *Endocrinol* 1991;120:896-900.
15. Clapp C. Analysis of the proteolytic cleavage of prolactin by the mammary gland and liver of the rat: characterization of the cleaved and 16K forms.

Recibido: 30 de marzo de 1999. Aprobado: 30 de junio de 1999.

Lic. *Julio César Rodríguez García*. Instituto Nacional de Endocrinología, Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.