

Instituto Nacional de Endocrinología

## CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA DE PROLACTINA DE DIFERENTES ESPECIES

Lic. Víctor Cabrera Oliva<sup>1</sup>, Lic. Julio C. Rodríguez García,<sup>1</sup> Lic. Isabel Méndez,<sup>1</sup>  
Lic. Fernando Larrea Gallo<sup>1</sup> y Lic. Alina Chapé Puerta<sup>1</sup>

### RESUMEN

Se utilizaron diferentes técnicas para determinar las características bioquímicas de las preparaciones de prolactina (Prl) de origen hipofisario con preparados que se utilizan en centros de investigaciones para el desarrollo de sistemas *in vivo e in vitro*, bioanálisis, radioinmunoanálisis y análisis inmunoenzimáticos. Los preparados se analizaron por electroforesis bajo condiciones reductoras (SDS-PAGE), electrotransferencia e inmunodetección, enfoque isoeléctrico, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), y capacidad de unión a receptores microsomales (RRA). Se encontró que en las Prl (s) porcina (pPrl), ovina (oPrl) y humana (hPrl) existen proporciones significativas de la forma glucosilada (30-40%), no así en la Prl bovina (bPrl) y en la de rata (rPrl). Se comprobó que es posible detectar impurezas o mezclas de las diferentes formas moleculares de la Prl presentes en estos preparados hipofisarios utilizando HPLC. El análisis por enfoque isoeléctrico de las Prl (s) hipofisarias de diferentes especies reveló que en la bPrl existen 4 isoformas de carga eléctrica, la oPrl y la hPrl están compuestas por 3 isoformas mientras que la rPrl y la pPrl presentan 1 y 2 isoformas, respectivamente. Aún se desconoce cuál podría ser el significado fisiológico de las isoformas de carga eléctrica en la Prl hipofisaria de diferentes especies. Según los resultados obtenidos a partir de las curvas de desplazamiento y de las gráficas de Scatchard, se encontró que existen diferencias entre las constantes de disociación ( $K_d$ ) y la capacidad de unión de las prolactinas a los receptores microsomales. Finalmente es necesario conocer con mayor exactitud las propiedades bioquímicas, inmunológicas y biológicas de los preparados de las prolactinas que son utilizadas en diferentes estudios tanto *in vivo* como *in vitro*, porque en esas residen las funciones biológicas de la hormona. Se confirmó y se amplió la heterogeneidad estructural de la Prl en diferentes especies de mamíferos, que dan lugar a la existencia de diferentes variantes moleculares de la hormona y a la diversidad de funciones que ejerce. Se comprobó la necesidad de desarrollar nuevos métodos para el estudio del significado biológico de la heterogeneidad estructural de la Prl y de obtener las diferentes variantes moleculares de la Prl con un alto grado de pureza, que permitan establecer nuevos métodos cuantitativos, útiles para ser aplicados en estudios clínicos y

---

<sup>1</sup> Licenciado en Bioquímica.

bioquímicos. La adecuada comprensión de las modificaciones estructurales de las Prl y de sus consecuencias biológicas, permitirán establecer los mecanismos de síntesis y secreción de esta hormona, incluyendo sus propiedades multifuncionales.

*Descriptores DeCS:* PROLACTINA/química; IN VITRO; ELECTROFORESIS/métodos; ENFOQUE ISOELECTRICO/métodos; CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA PRESION/métodos.

---

Actualmente se considera que la prolactina (Prl) es la hormona más versátil en términos de sus actividades biológica e inmunológica y que el número de funciones en las que participa es superior al resto de las hormonas hipofisarias en su conjunto. Se han informado más de 150 acciones diferentes de la Prl.<sup>1</sup> Es una hormona proteínica con peso molecular (pm) aproximado de 23 kDa y aunque durante muchos años se consideró que era producida exclusivamente por las células somatotropas o mamosomatotropas,<sup>2</sup> investigaciones realizadas durante las últimas décadas han demostrado la producción ectópica de Prl, así como la expresión de su mensajero (mARN) en una gran variedad de órganos, células y tejidos. La fuente más rica de la Prl extrahipofisaria es la placenta,<sup>3</sup> pero también es producida por el endometrio,<sup>4</sup> miometrio<sup>5</sup> y por el tejido cerebral.<sup>6</sup> En estudios más recientes se ha confirmado que células del sistema inmunológico son capaces de producir factores con actividad prolactínica<sup>7</sup> y se ha demostrado su expresión génica en los timocitos,<sup>8</sup> células linfoblastoides de tipo B<sup>9</sup> y en los linfocitos T.<sup>10,11</sup>

La secuencia proteínica o del ADN complementario (cDNA) ha permitido conocer y establecer la estructura primaria de la Prl de más de 25 especies.<sup>12</sup> A este respecto, en la mayoría de las especies estudiadas, la estructura de la hormona está compuesta por 197-199 residuos de aminoácidos, con 3 puentes disulfuros intracatenarios localizados entre las posiciones 4-11,58-174 y 191-199. La Prl de primates y la humana,<sup>13</sup> ovina,<sup>14</sup> porcina,<sup>15</sup> equina<sup>16</sup> y

la de dromedarios,<sup>17</sup> contienen un sitio único de glucosilación situado en la posición 31 correspondiente al residuo de asparagina, a diferencia de los cocodrilos y los lagartos,<sup>18</sup> en los que se encuentra ubicado en la posición 60. Al compararse las secuencias aminoacídicas de la Prl contenida en diferentes especies, se observa un grado variable de homología, lo cual refleja en gran parte, el orden de las interacciones filogenéticas. Entre las especies se han conservado alrededor de 32 residuos aminoacídicos,<sup>19</sup> los que aparecen formando celdas localizadas en 4 regiones distintas de la molécula y situadas en las posiciones 18-32,58-72,83-98 y 160-199. Se considera que estas celdas forman dominios en la molécula de la Prl para la unión específica a receptores y que son importantes para la regulación de los múltiples efectos biológicos descritos para esta hormona.<sup>12</sup>

La Prl se caracteriza por su marcado polimorfismo molecular.<sup>20,21</sup> Dentro de éste se incluye, en algunas especies, la existencia de variantes genéticas de la hormona.<sup>22</sup> En la mayoría de las especies estudiadas, la Prl se encuentra constituida por varias formas moleculares determinadas por transformaciones postraduccionales. Dentro de éstas las más comunes son aquellas derivadas de procesos como la glucosilación,<sup>23</sup> fosforilación,<sup>24</sup> sulfatación,<sup>25</sup> desaminación,<sup>26</sup> y enzimáticas.<sup>27</sup>

Durante los últimos años, nuestro laboratorio ha estado interesado en la búsqueda de las posibles relaciones que existen entre la estructura molecular de la

Prl y la secreción inadecuada de la hormona como causa de infertilidad. Al mismo tiempo hemos utilizado modelos *in vitro* con la finalidad de determinar el significado de las diferentes formas moleculares de la Prl sobre la regulación de algunas funciones celulares y metabólicas como son la esteroidogénesis de las células de ovarios y testículos, maduración folicular, espermatogénesis y otras que resultan de interés en la reproducción humana. Por otra parte, hemos desarrollado diferentes procedimientos analíticos para determinar las actividades biológicas e inmunológicas de la Prl, en estas investigaciones se utilizan, por razones de costos, preparaciones provenientes de diferentes especies, con un grado de pureza similar al descrito para la Prl hipofisaria humana.

El objetivo fundamental de la presente investigación fue caracterizar preparados de la Prl de diferentes especies y que son ampliamente utilizadas en estudios *in vivo* e *in vitro*, a través de electroforesis en geles poliacrilamida, enfoque isoelectrico, cromatografía líquida de alta presión (HPLC), incluyendo estudios de unión a receptores obtenidos de membranas microsomales (RRA) de hígados de ratas gestantes.

## MÉTODOS

### *Reactivos*

Utilizamos acrilamida y bisacrilamida de calidad analítica (*British Drug House*, BDH, *Poole*, Inglaterra), persulfato de amonio, TEMED, Glicina, Tris HCl y SDS de calidad analítica (Merck Damstadt, Alemania), anfolinas de rango de 3,5-10 (LKB, Suecia). Durante el desarrollo del trabajo empleamos otros reactivos de calidad analítica o superior.

### *Preparados hormonales analizados*

Los siguientes preparados de Prl de origen hipofisario fueron suministrados por *The National Hormone and Pituitary Program, the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, the National Institute of Child Health and Human Development* y *the U.S. Department of Agriculture* de los Estados Unidos: bPrl USDA-bPrl-B-1 (AFP-5300), rPrl NIDDK-rPrl-RP-3 (AFP-4459B), (hPrl) NIDDK-hPrl-B-1 (AFP-8982C), pPrl USDA-pPrl-B-1 (AFP-5300), oPrl NIAMDD-oPrl-14.

### *Electroforesis de los distintos tipos de Prl hipofisaria en presencia de sulfato dodecílico de sodio SDS-PAGE) y condiciones reductoras. Identificación por electrotransferencia, inmunotinción y autorradiografía*

Disolvimos los diferentes preparados de la Prl de origen hipofisario en la solución para muestras de *Laemmli*<sup>28</sup> y las calentamos durante 5 min a 95 °C.

Sometimos las muestras a electroforesis en geles de poliacrilamida al 12,5 % en presencia de SDS al 1 % y 5 % de  $\beta$ -mercaptoetanol de acuerdo con el método descrito previamente.<sup>28</sup> Determinamos los pesos moleculares (pm) a través de una curva con proteínas de pm conocido y los analizamos bajo las mismas condiciones electroforéticas arriba señaladas.

Transferimos las Prl separadas por electroforesis en presencia de SDS a membranas de nitrocelulosa (NTC) en solución amortiguadora de SDS-PAGE que contenía metanol (20 %) de acuerdo con el

método descrito por *Tobwin* y otros.<sup>29</sup> Bloqueamos las membranas de NTC durante toda la noche a 4 °C con leche descremada al 5 % en solución amortiguadora de tris/fosfatos salina 0,01 M, pH 7,4 (TFS). Posterior al lavado con la solución TFS descrita anteriormente suplementada con Tween-20 al 1 % (TFS-Tween), incubamos las membranas durante 2 h a temperatura ambiente con suero anti-hPrl diluido 1:200 en solución TFS-Tween. Después de la incubación, lavamos las membranas con la solución TFS y las tratamos durante 2 h a 4 °C con 200 000 cpm/mL de proteína A marcada con I<sup>125</sup> según el método descrito por *Thorell* y *Johannson*<sup>30</sup>. Después de eliminar el exceso de radiactividad mediante lavados con solución TFS-Tween, secamos las membranas y visualizamos los inmunocomplejos por exposición autorradiográfica durante 72 h a -70 °C y revelado de acuerdo con la técnica de rutina.

### Determinación del punto isoelectrico (pi) de los diferentes preparados de Prl

Analizamos los pi(s) de los preparados de Prl(s) hipofisarias de diferentes especies por enfoque isoelectrico en geles de poliacrilamida a 0,5 % que contenían anfolitas en un rango de pH 3,5-10 de acuerdo con la metodología recomendada por el fabricante.<sup>31</sup> Al finalizar, los geles fueron fijados en una solución de ácido tricloroacético al 50 % y teñidos con azul de coomasie al 0,4 %. Analizamos las bandas producidas por cada una de las Prl(s) hipofisarias en un densitómetro láser de barrido (LKB, Suecia). Determinamos los valores de pi(s) y los comparamos contra un patrón de referencia comercial (SERVA, Feinbichemica,

Suiza) analizado bajo las mismas condiciones.

### Determinación de los patrones de elución de la Prl hipofisaria de diferentes especies por cromatografía líquida de alta presión (HPLC)

Diluimos la Prl hipofisaria obtenida de diferentes especies en una solución amortiguadora de fosfato (PBS 0.1M; pH 7,4) a una concentración de 5 µg/mL. Cromatografiamos alicuotas (20 µL) de esta solución en una columna TSK-2 000 (Tokyo, Japón) y la equilibramos con PBS a un flujo de 0,5 mL/min. Se obtuvieron los tiempos de retención de las distintas muestras analizadas de manera continua a 280 nm.

### Determinación de la capacidad de unión de la Prl hipofisaria de diferentes especies a receptores microsomaes del hígado de la rata

Realizamos este análisis de acuerdo con la metodología descrita por *Posner* y *Kelly*.<sup>32</sup> Obtuvimos las membranas microsomaes por centrifugación diferencial.

## RESULTADOS

### Análisis por electroforesis en geles de poliacrilamida, inmunodetección y autorradiografía de las Prl obtenidas de diferentes especies

Según los patrones electroforéticos de cada uno de los preparados de las diferentes Prl(s) analizadas, en los preparados

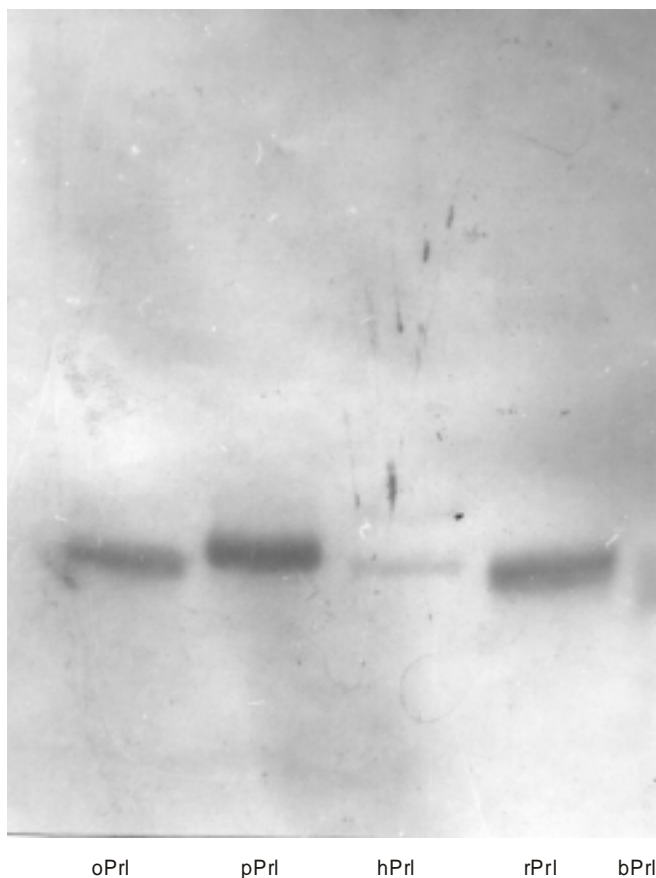


FIG. 1. Separación electroforética de los distintos tipos de prolactina: prolactina ovina (oPrl), porcina (pPrl), humana (hPrl), de rata (rPrl) y bovina (bPrl).

de oPrl, pPrl y hPrl observamos 2 bandas de pesos moleculares que oscilaron entre 23 y 25 kDa. La bPrl y la rPrl, se caracterizaron por una banda única con pm aproximado de 24 kDa. Como se observa en la figura 1, los preparados de oPrl, pPrl y hPrl de origen hipofisario se caracterizaron por la presencia de 2 bandas proteínicas con pesos moleculares idénticos. La banda mayoritaria tiene un pm aproximado de 23 kDa que representa aproximadamente el 70 % del contenido de la Prl inmunoreactiva y que corresponde a la forma monomérica de la hormona. La otra banda de 25 kDa, corresponde a la forma glucosilada de la hormona y representó el

resto del contenido total de la Prl en las muestras. La rPrl y la bPrl se caracterizaron por una banda única con pm de 24 kDa.

### *Cromatografía HPLC de los preparados de Prl hipofisaria de distintas especies*

De acuerdo con los patrones de elución por HPLC, los diferentes preparados de Prl se resolvieron generalmente en una sola área cuyos tiempos de retención aparecen en la tabla 1. En el caso de la hPrl, encontramos una zona de elución con tiempo de retención de 30,67 min.

La pPrI presenta un área máxima de elución con tiempo de retención de 30,92 min.

TABLA 1. *Tiempos de retención obtenidos para el componente principal de PrI separado por cromatografía de gel filtración en HPLC*

Tipo de prolactina	Tiempo de retención (min)
pPrI	30,92
oPrI	31,56
rPrI	30,57
bPrI	34,32
hPrI	30,67

### *Determinación del punto isoeléctrico (pi) de la PrI hipofisaria de diferentes especies*

En la tabla 2 se pueden observar los pi(s) para las diferentes PrI(s) hipofisarias estudiadas. Con excepción de la rPrI, todas las demás mostraron varios componentes definidos de pH. Para la bPrI, observamos 4 bandas con pi que oscilaron entre 5,8 y 6,6 unidades de pH.

TABLA 2. *Valores de puntos isoeléctricos determinados para las diferentes isoformas de los preparados de prolactina*

Tipo de PrI	Bandas observadas	PI determinado
bPrI	1	6,6
	2	6,2
	3	6,0
	4	5,8
oPrI	1	6,2
	2	6,0
	3	5,0
rPrI	1	6,8
pPrI	1	6,3
	2	6,0
hPrI	1	5,9
	2	5,3
	3	5,6

### DETERMINACIÓN DE LA CAPACIDAD DE UNIÓN A RECEPTORES MICROSOMALES

En la figura 2 aparecen las diferentes curvas de desplazamiento obtenidas con los distintos preparados de las PrI(s)

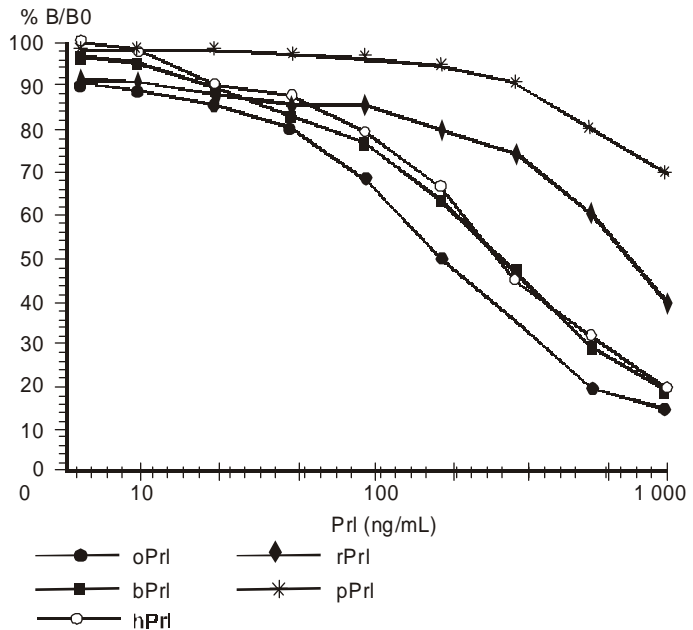


FIG. 2. *Curvas de desplazamiento de la unión de los distintos tipos de prolactinas a sus receptores.*

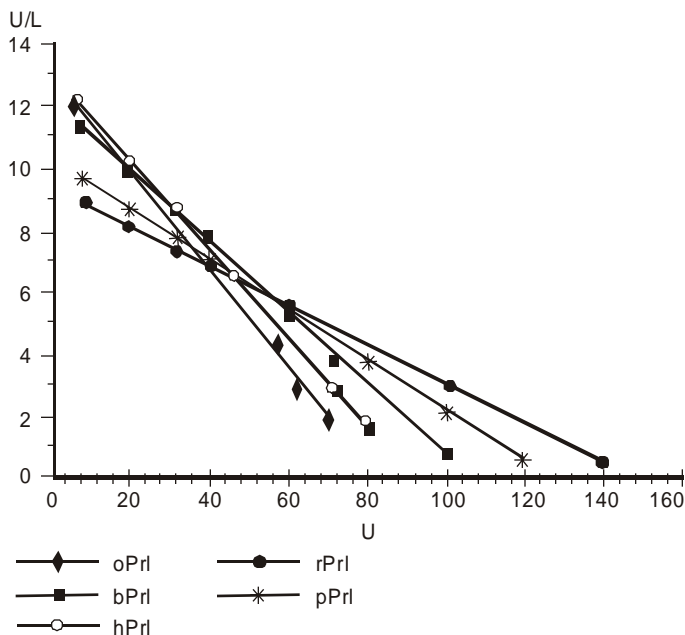


FIG.3. Ploteo de Scatchard de las prolactinas de diferentes especies.

hipofisarias. En éste análisis empleamos 150  $\mu\text{g}$  de proteína de la fracción microsomal hepática los cuales incubamos en presencia de concentraciones crecientes de las Prl(s) hipofisarias de diferentes especies (3,9-1 000 ng) y de 2 ng de  $I^{125}$ -hPrl. La fracción libre (L) de la unidad (U) la separamos por centrifugación y graficamos los porcentajes de hormona unida al receptor contra las concentraciones de la hormona no radiactiva para construir las curvas de desplazamiento características para las distintas Prl(s) hipofisarias analizadas. En la figura 3 se muestran las gráficas de Scatchard de los distintos tipos de Prl(s) construidas a partir de los datos de las curvas de desplazamientos.

En la tabla 3 expresamos los valores de actividad biológica informados para cada uno de los preparados de Prl(s) hipofisarias. Los autores no especifican cuáles fueron los métodos utilizados para determinar la actividad biológica.

TABLA 3. Valores de actividad biológica reportados para los distintos preparados de prolactina hipofisaria

Tipo de Prl	Código (NIH)	Actividad biológica(Ul/mg)
rPrl	NIDDK-rPrl-RP-(AFP-4459B)	30,0
bPrl	USDA-bPrl-B1 (AFP-5300)	13,0
hPrl	NIDDK-hPrlB-1 (AFP-8982 C)	40,0
pPrl	USDA-pPrl-B-(AFP-5300)	34,0
oPrl	NIAMDD-oPrl-14	38,9

En la tabla 4 aparecen los valores de  $K_d$  y  $K_a$  encontrados para las Prl(s) hipofisarias de diferentes especies. La mayor afinidad por el receptor microsomal lo mostró la hPrl, ( $K_d$  de  $3,16 \times 10^7$  M), seguido por la bPrl y la oPrl con valores de  $K_d$  de  $3,15 \times 10^7$  y  $1,94 \times 10^7$  M, respectivamente.

TABLA 4. Constantes de disociación ( $K_d$ ) y de afinidad ( $K_a$ ) para los diferentes tipos de prolactina hipofisaria

Hormona	$K_a$ ( $M^{-1}$ )	$K_d$ (M)
bPrl	$3,15 \times 10^7$	$3,18 \times 10^8$
oPrl	$1,94 \times 10^7$	$5,15 \times 10^8$
hPrl	$3,16 \times 10^7$	$3,16 \times 10^8$
pPrl		$2,25 \times 10^7$
rPrl		$1,67 \times 10^7$

## DISCUSIÓN

Durante los últimos años se ha considerado al polimorfismo molecular de la Prl como uno de los mecanismos de regulación de la actividad biológica y vida media de la hormona. Esta propiedad permite a la Prl participar en la modulación y regulación *in vivo* de un número importante de funciones bioquímicas y fisiológicas. Parte del polimorfismo molecular de la Prl se debe a la asociación de monómeros, por lo que es posible encontrar en la circulación, además de la forma monomérica mayoritaria, las variantes dimericas (*big*) y poliméricas (*big-big*) de la hormona. Algunos autores han sugerido que las proporciones entre estas formas circulantes de alto peso molecular pueden variar en ciertos estados fisiológicos y patológicos como son el embarazo, la hiperprolactinemia con función ovárica conservada y la hiperprolactinemia de origen tumoral.<sup>33-37</sup>

El polimorfismo molecular de la Prl también puede asociarse a modificaciones de la molécula por enzimas de naturaleza proteolítica que dan lugar a la generación de péptidos con grados variables de actividad biológica.<sup>38</sup> Durante años se conoce de la existencia de variantes moleculares de la Prl asociadas a modificaciones postraduccionales. Dentro de éstas las más representativas son las formas glucosiladas, fosforiladas, desaminadas y sulfatadas. La especie glucosilada, con excepción del bovino, se encuentra en la mayoría de las especies de mamíferos que se han estudiado.<sup>39-43</sup>

Nuestros resultados concuerdan con estas observaciones y confirman que la forma glucosilada de la Prl, es la modificación postraducciona l más frecuente en las especies estudiadas. En

todos los preparados analizados observamos la variante glucosilada de la Prl que, en algunos casos, representó hasta el 50 % del contenido hormonal total.<sup>42</sup> La bPrl no contiene una fracción glucosilada y en esta especie predomina la variante sulfatada. Aunque los informes relacionados con la actividad biológica de la Prl glucosilada son contradictorios,<sup>44,45</sup> la mayoría de los autores han demostrado que es inferior a la de su contraparte no glucosilada.<sup>46,47</sup> Sin embargo, como la glucosilación altera en forma selectiva la actividad biológica de la Prl,<sup>48</sup> los resultados pueden ser variables y depender tanto del sistema de bioanálisis que se utilice, como de determinadas condiciones fisiológicas. La relación entre las proporciones de prolactina glucosilada y no glucosilada dentro de la composición de los diferentes preparados que se utilizan en las investigaciones es un factor que debe ser considerado, porque los métodos actuales para obtener Prl altamente purificada no excluyen la posibilidad de que los preparados contengan determinadas proporciones de la hormona estructuralmente modificada por sucesos postraduccionales.

La cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) en filtración en gel de los diferentes preparados analizados y con grados comparables de purificación demostró que la hPrl presenta el mayor grado de variabilidad molecular.

Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por SDS-PAGE. En todos los casos, la mayor concentración de la Prl se resolvió en una sola área con tiempos de retención similares, excepto para el caso de la bPrl, que mostró tiempos de retención mayores. Es posible que los grupos sulfatos presentes en la molécula de bPrl, modifiquen el patrón de elución por gel filtración de la hormona.

El polimorfismo molecular de la Prl se expresa por la existencia de diferentes formas moleculares de la hormona, las cuales pueden estar presentes en la circulación, así como en sitios de su síntesis y en depósitos metabólicos. Estas formas pueden ser agregados moleculares, escinciones, deleciones o pérdidas de determinados fragmentos de la molécula y cambios estructurales de tipo postraduccionales. Según nuestros resultados, en los preparados de la Prl hipofisaria de diferentes especies existen isoformas de la hormona que se diferencian por su punto isoeléctrico. De acuerdo con los resultados obtenidos por SDS-PAGE, la bPrl es un preparado de composición molecular homogénea; sin embargo, se encontró que existen 4 isoformas con valores de  $p_i$  en un rango comprendido entre 5,8 y 6,6 lo que pudiera tener algún significado fisiológico.

Durante los últimos años se han descrito diferentes métodos para determinar la actividad biológica de las hormonas lactogénicas.<sup>45</sup> Hasta el presente todos los procedimientos utilizados poseen ventajas y desventajas. El RRA es útil para determinar la capacidad de la hormona de ser reconocida por los receptores de membrana, pero no así para predecir cambios relacionados con la transducción de la señal. Nuestros resultados coinciden con los de otros autores que han demostrado que en el análisis por RRA, la menor capacidad de unión para las hormonas se obtiene en sistemas homólogos, sin que exista hasta el momento una explicación concluyente.<sup>49</sup>

Cuando se analizan conjuntamente los resultados de la unión de los distintos

preparados de Prl(s) hipofisaria a los receptores microsomales y sus Kd con los valores de actividad biológica informados por los suministradores, se observa una marcada discordancia. Esto demuestra claramente, que los preparados hormonales de origen hipofisario, pueden mostrar una actividad biológica que va a ser dependiente del tipo de bioensayo utilizado y del origen del preparado analizado.

En conclusión, es sumamente importante elegir el tipo de Prl a ser utilizada para el desarrollo de experimentos bajo condiciones *in vivo* o *in vitro*. Las razones se encuentran relacionadas con el origen del preparado hormonal, incluyendo su estructura y composición, así como la heterogeneidad molecular y eléctrica, además de la propia actividad biológica del preparado. Es probable que durante el proceso de purificación de la Prl ocurran cambios en la estructura de las moléculas como son la formación de agregados, escinciones proteolíticas y la formación de combinaciones entre monómeros glucosilados y no glucosilados. Estas variaciones estructurales podrían alterar en forma definitiva las características bioquímicas y biológicas de los preparados hormonales que se utilizan con fines experimentales.

## AGRADECIMIENTOS

*Los autores desean expresar su agradecimiento a The National Hormone and Pituitary Program, NIDDK, NICHHD y al USDA por los reactivos e información suministrados.*

## SUMMARY

---

Different techniques were used to determine the biochemical characteristics of the Prolactin (Prl) preparations of hypophyseal origin with preparations that are used in research centers for the development of *in vitro* and *in vivo* systems,

bioanalyses, radioimmunoanalyses and immunoenzimatic analyses. The preparations were analyzed by electrophoresis under reducing conditions (SDS-PAGE), electrotransference and immunodetection, isoelectric focussing, high pressure liquid chromatography (HPLC) and binding capacity to microsomal receptors (RRA). It was observed that in the porcine Prl (pPrl), ovine Prl (oPrl) and human Prl (hPrl) there are significant proportions of the glycosilated form (30-40%) that are not found in the bovine Prl (bPrl) and in the rat Prl (rPrl). It was proved that it is possible to detect impurities or mixtures of the different molecular forms of Prl that appear in these hypophyseal preparations by using HPLC. The analysis by isoelectric focussing of the hypophyseal prolactins of different species revealed that in the bPrl there are 4 isoforms of electric charge, that the oPrl and the hPrl are composed of 3 isoforms, whereas the rPrl and the pPrl have 1 and 2 isoforms, respectively. The physiological meaning of the isoforms of electric charge in the hypophyseal Prl of different species is still unknown. According to the results obtained from the displacement curves and from the Scatchard graphs, it was found that there are differences among the dissociation constants ( $K_d$ ) and the binding capacity of prolactins to microsomal receptors. Finally, it is necessary to know with more precision the biochemical, immunological and biological properties of the preparations of prolactins that are used in different studies, both *in vivo* and *in vitro*, since that's where the biological functions of the hormone are. The structural heterogeneity of the Prl was confirmed and widened in different species of mammals giving rise to the existence of different molecular variants of the hormone and to the diversity of functions it performs. The need to develop new methods for studying the biological meaning of the structural heterogeneity of Prl and to obtain different molecular variants of Prl with a degree of purity that allow to establish new quantitative methods useful to be applied in clinical and biochemical studies was proved. The adequate understanding of the structural modifications of prolactins and of their biological consequences will make possible to establish the synthesis and secretion mechanisms of this hormone, including its multifunctional properties.

*Subject headings:* PROLACTIN/chemical; IN VITRO; ELECTROPHORESIS/methods; ISOELECTRIC FOCUSING/methods; CHROMATOGRAPHY, HIGH PRESSURE LIQUID/methods.

---

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. DeVlaming VL. Actions of prolactin among the vertebrates. En: Barrington EJW, ed. Hormones and evolution. New York: Academic, 1979:561-642.
2. Frowley LH, Brockfor FR. Mammosomatotropes: presence and functions in normal and neoplastic pituitary tissue. *Endocr Rev* 1991;12:337-55.
3. Handwerger S, Richards RG, Markoff E. The physiology of decidual prolactin and other decidual protein hormones. *Trends Endocrinol Metab* 1991;3:91-5.
4. Masler IA, Riddick DH. Prolactin production by human endometrium during the normal menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1979;135:751-4.
5. Walters CA, Daly DC, Chapitis J, Kuslis ST, Prior JC, Kusmik WF, Reddick DH. Human miometrium: a new potential source of prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 1983;147:639-44.
6. Fuxe K, Hakfelt T, Enerot P, Gustafson JA, Skett P. Prolactin-like immunoreactivity: Localization in nerve terminals of rat hypothalamus. *Science* 1977;196:899-900.
7. Hiestand PC, Meklar P, Nordmann R, Frieder A, Permmongol C. Prolactin as a modulator of lymphocytes responsiveness provides a possible mechanism for cyclosporine. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2599-603.
8. Montgomery PW, Shen GK, Ulrich ED, Steiner LL, Parrish PR, Zukoski CF. Human thymocytes express a prolactin like messenger ribonucleic acid and synthesize bioactive prolactin-like proteins. *Endocrinology* 1992; 131:3019-26.

9. Dimattia GE, Gellersen B, Bohnet HG, Friesen HG. A human lymphoblastoid cell line produces prolactin. *Endocrinology* 1988;122:2508-17.
10. Pellegrini I, Lebrun JJ, Ali S, Kelly PA. Expression of prolactin and its receptors in human lymphoid cells. *Mol Cell Endocrinol* 1992;5:1023-31.
11. Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, Liu Q, Arkins S, et al. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:7713-6.
12. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995;16:354-69.
13. Cole ES, Nichols EH, Lauziere K, Admunds T, McPherso JM. Characterization of the microheterogeneity of recombinant primate prolactin: Implications for posttranslational modifications of the hormone in vivo. *Endocrinology* 1991;129:2639-46.
14. Li CH, Dixon JS, Lo TB, Schmidt KD, Pankov YA. Studies on pituitary lactogenic hormones. XXX. The primary structure of the sheep hormone. *Arch Biochem Biophys* 1970;141:705-37.
15. Li CH. Studies on pituitary lactogenic hormone: the primary structure of porcine hormone. *Int J Pept Protein Res* 1976;8:205-24.
16. Lehrman SR, Lahm H, Miedel MC, Hulmes JD, Ch Li. Primary structure of the equine pituitary prolactin. *Int J Pept Protein Res* 1988;31:544-54.
17. Martinat N, Huet J-C, Nespoulus C, Combanous Y, Pernollet JC. Determination of the primary and secondary structures of the dromedary (*Camelus dromedarius*) prolactin and comparison with prolactins from other species. *Biochim Biophys Acta* 1991;1077:339-45.
18. Noso T, Swanson P, Lance VA, Kawauchi H. Isolation and characterization of glycosylated and non-glycosylated prolactins from alligator and crocodile. *Int J Pept Protein Res* 1992;39:250-7.
19. Watahiki M, Tanaka M, Masuda N, Sugisaki K, Yamamoto M, Yamakowa W. Primary structure of chicken pituitary prolactin deduced from the cDNA sequence: conserved and specific amino acid residues in the domains of the prolactins. *J Biol Chem* 1989;264:5535-9.
20. Smith CR, Norman MR. Prolactin and growth hormone: molecular heterogeneity and measurement in serum. *Ann Chim Biochem* 1990;27:542-50.
21. Sinha YN. Prolactin variants. *Trends Endocrinol Metab* 1992;3:100-6.
22. Swennen D, Poncelet AC, Dekkali B, Rentier-Delrue F, Martial JA, et al. Structure of the tilapia (*Oreochromis mossambicus*) prolactin I gene. *DNA Cell Biol* 1992;11:673-84.
23. Lewis UJ, Singh RPN, Sinha YN, Vanderlaan WP. Glycosylated human prolactin. *Endocrinology* 1985;116:359-63.
24. Walker AM. Phosphorylated and nonphosphorylated prolactin forms. *Trends Endocrinol Metab* 1994;5:195-200.
25. Kohli R, Chadla N, Muraldhor K. Presence of tyrosine-o-sulfate in sheep pituitary prolactin. *FEBS Lett* 1988;242:134-43.
26. Nyberg F, Roos P, Isakson O. Isolation of rat pituitary prolactin isohormones differing in charge, size and specific immunological activity. *Prep Biochem* 1982;12:153-73.
27. Mitra I. A novel cleaved prolactin in the rat pituitary. I. Biosynthesis, characterization and regulatory control. *Biochem Biophys Res Commun* 1980;95:1750-9.
28. Laemmli UK. Cleavage of the structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227:680-5.
29. Tobwin H, Staelin H, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to Nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:4350-4.
30. Thorell JL, Johannsson BG. Enzymatic iodination of polypeptides with I<sup>125</sup> to high specificity. *Biochem Biophys Acta* 1971;251:362-66.
31. Laboratory Manual LKB 2117 Multifor II: electrophoresis system. Bromma: Produkter AB, 1986:146-53.
32. Posner BI, Kelly PA, Friesen HG. Induction of a lactogenic receptor in the liver: Influence of the estrogens and the pituitary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1974;71:2407-15.
33. Santana S, Cabrera OV, Valdés RM. Caracterización de sitios receptores para prolactina en hígados de ratas embarazadas. I. Optimización del ensayo de radiorreceptores. *Rev Cubana Invest Biomed* 1990;9:305-18.
34. Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949;51:660-5.
35. Carlson HE, Markoff E, Lee DW. On the nature of serum prolactin in two patients with macroprolactinemia. *Fertil Steril* 1992;56:78-87.
36. Larrea F, Méndez I, Escorza A, Veayra F, Cariño C, Cravioto MC. Prolactin size variants during

- pregnancy in women with ovulatory hyperprolactinemia: characterization by isoelectric focusing and lectin affinity chromatography. *Eua. J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1992;44:91-6.
37. Andino NA, Bidot C, Valdés M. Chromatographic pattern of circulating prolactin in ovulatory hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 1985;44:600-6.
  38. Levay-Young CS, Nicoll CS. Biological and immunological characterization of cleaved and 16 k forms of rat prolactin. *Endocrinology* 1988;122:2892-8.
  39. Sinha YN, DePaolo LV, Haro LS, Singh RPN, Jacobsen BP, Scott KE. Isolation and biochemical properties of four forms of glycosylated porcine prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 1991;80:203-8.
  40. Hoffman T, Penel C, Ronin C. Glycosylation of human prolactin regulates hormone bioactivity and metabolic clearance. *J Endocrinol Invest* 1993;16:807-11.
  41. Young KH, Buhi WC, Horseman N. Biological activities of glycosylated and non-glycosylated forms of prolactin. *Mol Cell Endocrinol* 1990;71:155-62.
  42. Campier J, Claustrat B, Harthe C, Chevalier P, Touillas J. Concanavalin A-bound and -unbound prolactin in normal and hyperprolactinemic rats. *J Endocrinol* 1992;134:27-32.
  43. Kolhi R, Chadha N, Muralidhar K. Are sheep and buffalo prolactins sulfated? *Biocem Biophys Res Commun* 1987;149:515-22.
  44. Pankov YA, Butnev VY. Multiple forms of pituitary prolactin, a glycosylated form of porcine prolactin with enhanced biological activity. *Int J Peptide Protein Res* 1986;28:113-23.
  45. Cabrera OV, Chape A, Rodríguez JC, Machado AJ, Larrea FG. Differential effects of glycosylated and non-glycosylated porcine prolactin on estradiol and progesterone secretion by rat granulosa cells in culture. *Arch Med Res* 1998;29:13-9.
  46. Atkinson PRL, Seely JE, Klemcke HG, Hughes JP. Receptor binding and Nb2 cell mitogenic activities of glycosylated vs unglycosylated porcine prolactin. *Biochem Biophys Res Commun* 1988;155:1187-93.
  47. Frigeri LG, Lewis LJ, Teguh K, Lewis UK. Glycosylation abolishes an in vitro insulin-like action of prolactin. *1986;134:764-9*.
  48. Markoff E, Sigel MB, Lacour N, Seavey BK, Friesen HG, Lewis UJ. Glycosylation selectively alters the biological activity of prolactin. *Endocrinology* 1988;123:1303-6.
  49. Jerry DJ, Griel LC, Jr, Kavanaugh JF, Kensinger RS. Binding and bioactivity of ovine and porcine prolactins in porcine mammary tissue. *J Endocrinol* 1991;130:43-51.

Recibido: 9 de mayo de 2000. Aprobado: 9 de junio de 2000.

Lic. *Víctor Cabrera Oliva*. Instituto Nacional de Endocrinología, Zapata y D, El Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba. CP 10400.