

EFFECTO DE SECRECIONES DE PARS TUBERALIS DE LA ADENOHIPOFISIS SOBRE LA LIBERACION DE PROLACTINA DESDE PARS DISTALIS

MARTHA LAFARQUE, LILIANA OLIVEROS, LUIS AGUADO

Laboratorio de Biología de la Reproducción (LABIR), Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis

Resumen El presente trabajo aporta evidencias que indican que factores producidos por la pars tuberalis (PT) afectan la liberación de prolactina desde la pars distalis (PD). Para determinar el efecto de las secreciones al medio de cultivo de células de la PT bovina sobre células dispersas de PD de rata, se trabajó con estas últimas tanto en incubaciones de 30 minutos, como en superfusiones continuas en columnas. Cuando se utilizó medio de cultivo de la totalidad de las células de la PT, se requirieron 9 µg de proteína total para la máxima estimulación de la liberación de prolactina. En cambio, cuando se empleó el correspondiente a las fracciones del 50-60% de un gradiente de Percoll, sólo se requirieron 4 µg de proteína total. Con una purificación parcial en Sephadex G 50 de ese medio, se logró el mismo efecto con 80 ng de proteína total. El principio activo tendría un tamaño molecular superior a los 30 kDa. Los resultados obtenidos permiten proponer, al menos para las células prolactotropas, a la PD como el órgano efector de algunas secreciones de la PT.

Abstract *Effect of adenohipophyseal pars tuberalis secretions on pars distalis prolactin liberation.*

Evidences presented indicating that factors produced by the pars tuberalis (PT) affect the prolactin liberation by the pars distalis (PD). The effect of the secretion products of bovine PT cells in culture medium was checked on dispersed PD cells of rats. PD cells were assayed in incubations of 30 minutes and superfusion experiments. When medium was obtained from total PT cells, the addition of 9 µg of protein was needed to reach the major stimulation of prolactin liberation. However, when the medium from 50-60% Percoll gradient fractions was used, only 4 µg of total protein were required. The partial purification of such medium by Sephadex G50 produced the same effect on the liberation of prolactin by PD cells with 80 ng of total protein. The active factor/s should have a molecular weight higher than 30 kDa. The results obtained suggest, at least for the prolactotrophic cells, that PD could be the effector organ for some of the secretory product(s) of PT.

Key words: adenohipophysis, pars distalis, pars tuberalis, prolactin

Los estudios ultraestructurales realizados en la pars tuberalis (PT) de la adenohipófisis (AH) de mamíferos han revelado la existencia de al menos dos tipos de células, las no glandulares (foliculares) y las glandulares (secretoras). Estas últimas, de acuerdo a estudios inmunocitoquímicos, han sido subdivididas en células similares a las presentes en la pars distalis (PD) y en células secretoras que no se encuentran en ninguna otra región de la AH, excepto en la PT, que son consideradas como las células específicas de PT¹⁻³. La PT anteroventral de ovino, presenta una población enriquecida de gonadotropos inmuno-reactivos a LH, subunidad beta de LH, TSH, GH, beta endorfina, prolactina y ACTH, cuyo número y distribución es similar en distintos estados endocrinos como el anestro y la ovariectomía. En

contraste, pocos gonadotropos han sido detectados en las regiones anterodorsal y posterior de la PT⁴.

La localización anatómica de la PT y la presencia de canales intercelulares en la misma, la comunican con el líquido cefalorraquídeo del espacio subaracnoideo, por un lado, y con el espacio perivascular del plexo primario del sistema porta, por otro. Por lo tanto, la PT se relacionaría con el hipotálamo vía humoral⁵. Estos hechos han planteado el interrogante de que la PT pueda ser moduladora de la actividad de la PD. A su vez, la PT es receptora de la melatonina secretada desde la glándula pineal. Al respecto cabe señalar que durante el ciclo reproductivo en mamíferos estacionales y no estacionales, se producen cambios morfológicos, como también en la actividad secretoria de la PT, con modificación de la expresión de receptores de melatonina. Ha sido sugerido, por lo tanto, que las células de la PT estarían involucradas en la transmisión del estímulo fotoperódico al sistema endocrino^{6,7}.

Si bien se especula que la secreción/es de las células específicas de la PT es una glicoproteína, la naturaleza

Recibido: 19-VIII-1997

Aceptado: 12-XI-1997

Dirección postal: Dr. Luis Aguado, Laboratorio de Biología de la Reproducción, Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional de San Luis, Chacabuco y Pedernera, 5700 San Luis, Argentina. Fax (0652)30224-25835

de este factor/es es aún desconocida, como así también la función precisa de la PT en los vertebrados⁹.

El objetivo del presente trabajo es verificar si las secreciones de las células de PT pueden influenciar la actividad de las células de la PD. Se ha investigado esta hipótesis utilizando experimentos de cultivos primarios de células de PT bovina y midiendo el efecto de la secreción de las mismas sobre la liberación de prolactina por células dispersas de PD de rata.

Material y métodos

Animales de experimentación

Se trabajó con la PD de ratas adultas macho, de la cepa Holtzman (200-220 g), que fueron mantenidas en condiciones controladas de luz y temperatura, con ciclos de 12 hs luz - 12 hs oscuridad, 22-24°C, con alimento y agua a voluntad. Las PT fueron aisladas de novillos, a partir de muestras obtenidas del matadero local.

Reactivos

El medio de cultivo 199, penicilina, estreptomycin, nistatina, tripsina, colagenasa, albúmina bovina sérica (fracción V), inhibidor de tripsina y DNasa fueron provistos por Sigma Chemical Co., Saint Louis, MO, USA. El kit de prolactina fue provisto por NIADDK, Bethesda, MD, USA. ¹²⁵I fue generosamente cedido por LARLAC, Mendoza. Todos los otros reactivos utilizados fueron de grado analítico y provistos por Laboratorio Merck, Argentina.

Cultivo de células de pars tuberalis

Las PT de bovinos fueron disecadas cuidadosamente a partir del tallo neural de las hipófisis respectivas bajo microscopio estereoscópico. Las PT fueron disgregadas en medio 199, adicionado con tripsina 0,25%, a 37°C, con agitación continua, durante 30 minutos. El tejido fue repetidamente pasado a través de pipeta Pasteur siliconada. La reacción fue detenida con el agregado de 0,2 mg/ml de inhibidor de tripsina. La suspensión celular fue centrifugada a 100 x g por 10 minutos a 4°C. El pellet de células fue lavado con medio 199 adicionado con 2% de penicilina, 3% de estreptomycin y 0,04% de nistatina. La viabilidad celular fue determinada por el test de exclusión del Azul Tripán, siendo del orden del 90%. Las células fueron cultivadas a razón de 2 x 10⁶ células/ml. Luego de realizar dos cambios de medio cada 24 hs, las células fueron cultivadas durante 48 hs. El líquido de cultivo fue mantenido a -70°C hasta su utilización.

Gradiente discontinuo de Percoll

Las células de la PT bovina fueron disgregadas con tripsina y cultivadas por 24 hs. Luego fueron sembradas en un gradiente discontinuo de Percoll (30, 40, 50, 60, 80%) a partir de una solución madre, dilución 1:10 con solución salina balanceada de Hanks, utilizando tubos de 12 ml⁹ que fueron centrifugados a 400 x g por 15 minutos a 4°C. Una vez determinada la viabilidad de las células recuperadas de cada fracción de Percoll, se cultivaron 2 x 10⁶ células/ml por 48 hs. El líquido de cultivo fue utilizado para estimular las células de la PD de rata.

Preparación de células dispersas de pars distalis

Las células fueron dispersadas de acuerdo al método usado por Spinedi y Negro-Vilar, 1983¹⁰. Brevemente, las ratas fueron sacrificadas por decapitación y una vez extraídas, cada PD fue seccionada en 4 partes y colocada en 1 ml de medio 199, pH 7,4, conteniendo 0,2% de colagenasa, en un baño termostático a 37°C, con corriente 95% O₂ - 5% CO₂ y agitación, por 30 minutos. El tejido fue repetidamente pasado (30 - 50 veces) a través de una pipeta Pasteur siliconada. Tres minutos antes de finalizar la incubación, fueron agregados 0,1 mg/ml de DNasa para disgregar totalmente los cúmulos celulares. La suspensión fue centrifugada a 100 x g por 10 minutos a 4°C. El pellet celular fue lavado con medio 199 suplementado con 0,25% albúmina bovina sérica, 20 mg/l de penicilina y 30 mg/l de estreptomycin. Una vez centrifugadas, las células fueron resuspendidas en dicho medio para ser utilizadas en experimentos de incubación y superfusión.

Estimulación de células dispersas de pars distalis

Las células, a razón de 1 x 10⁵ por tubo, fueron estabilizadas por 6 hs en 0,5 ml de medio 199, a 37°C, en estufa de cultivo. A continuación, el medio fue descartado y reemplazado por 0,45 ml de medio fresco al que se adicionó 50 µl de líquido proveniente del cultivo de células de PT bovina, conteniendo una concentración adecuada de proteína, de acuerdo al diseño del experimento. Luego de incubar 30 minutos en baño termostático a 37°C, con corriente de 95% O₂ - 5% CO₂ y agitación, los tubos fueron centrifugados y el sobrenadante fue mantenido a -70°C hasta la determinación de prolactina. La hormona liberada por las células de la PD incubadas sólo con medio 199 fue considerada como valor control. La concentración de proteínas fue determinada por el método de Lowry et al.¹¹

Superfusión de células dispersas de pars distalis

Se recurrió a 2 x 10⁵ células para su suspensión en Biogel P2 (200 - 400 mesh), prehidratado con medio de cultivo 199, a 4°C, por 12 hs y utilizado como relleno de una columna de 10 x 0,5 cm adosada a una bomba peristáltica y a un colector de fracciones. La columna fue estabilizada con medio de cultivo suplementado con 0,25% de albúmina, 20 mg/l de ácido ascórbico y antibióticos, con un flujo de 0,75 ml/min durante 40 minutos. La recolección del eluido se llevó a cabo por 10 minutos previo a realizar la estimulación, colectando las fracciones cada 2 minutos. A continuación, las células se estimularon con KCl 28 mM y se colectaron fracciones por 20 minutos. Luego, las células se lavaron con medio de cultivo 199 y se estimularon con distintas concentraciones de proteína del líquido de cultivo de PT. Las fracciones eluidas se conservaron a -70°C hasta la determinación de prolactina.

RIA de prolactina

La prolactina fue dosada por RIA de doble anticuerpo. La hormona fue radioiodinada según el método de la cloramina T¹², purificada por pasaje a través de columna de Sephadex G⁷⁵. La sensibilidad del ensayo osciló entre 0,3 - 0,5 µg/l y los coeficientes de variación inter ensayo fueron menores al 8%. Los resultados se expresaron en términos de preparaciones de referencia de rata RP-3 del NIH y se refirieron como ng de hormona/ml de medio. Al determinar prolactina en el líquido de cultivo de células de PT bovina como control de reacción cruzada, el ensayo dio negativo.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media \pm error estándar, considerándose significativamente diferentes para un valor de $p < 0,05$ y fueron analizados mediante el test de Student. Cuando se hicieron comparaciones entre más de dos medias, se empleó el test ANOVA, una vía, seguido del test de Tukey.

Resultados

El efecto de la estimulación de las células de la PD de rata con el líquido proveniente del cultivo de la totalidad de células de la PT bovina se muestra en la Fig. 1. La concentración de prolactina liberada fue proporcional a la concentración de proteína del líquido de cultivo de PT, obteniéndose la máxima liberación de prolactina a partir de 9 μ g de proteína.

Debido a la existencia de distintas poblaciones celulares en la PT bovina, se trabajó con un gradiente discontinuo de Percoll, a fin de posibilitar la identificación de las células cuyas secreciones son responsables de la liberación de prolactina por la PD de rata. La viabilidad de las células recuperadas de cada fracción fue del 90%. La máxima liberación de prolactina por las células de PD se obtuvo con las secreciones de las células de las fracciones del 50 y 60%. Las otras fracciones no estimularon en forma significativa (Fig. 2). Debido a esos resultados, las células de las fracciones del 50 y del 60% fueron cultivadas en conjunto.

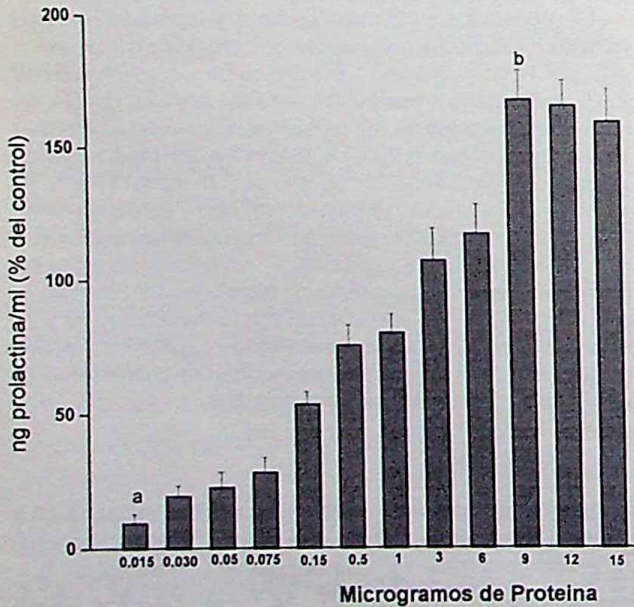


Fig. 1.- Efecto de diferentes concentraciones de proteína del líquido de cultivo del total de células de pars tuberalis sobre la liberación de prolactina por células de pars distalis. Los ng de prolactina liberados al medio por células de pars distalis sin estimular se consideran como el 100% (valor control). Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos (^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,001$).

En la Fig. 3 se muestran los datos obtenidos de la estimulación con distintas concentraciones de proteína del líquido de cultivo proveniente de las células de PT de la fracción de Percoll 50-60%. Las células de la PD respondieron a la estimulación con 4 μ g de proteína,

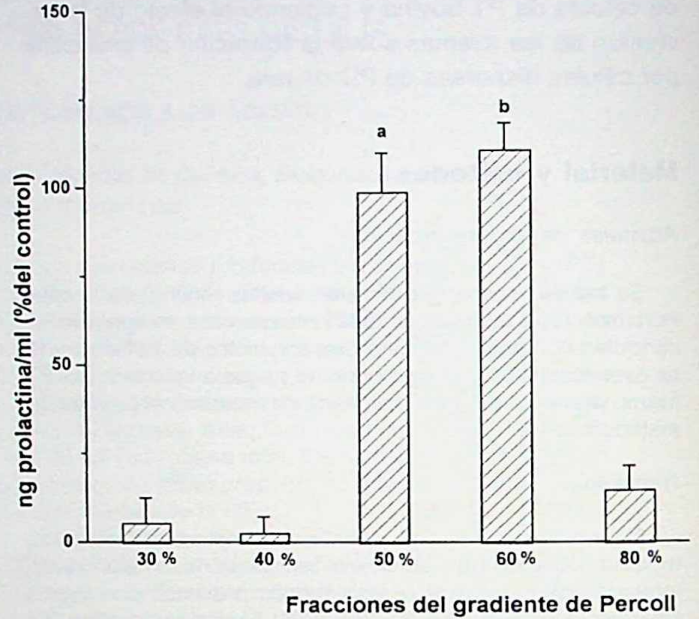


Fig. 2.- Efecto del líquido de cultivo de células de pars tuberalis separadas por gradiente de Percoll sobre la liberación de prolactina por células de pars distalis. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos (^{a, b} $p < 0,001$).

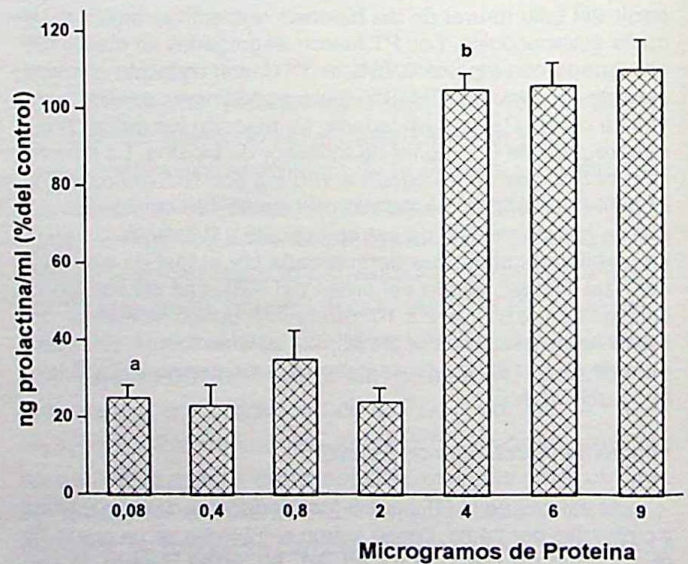


Fig. 3.- Efecto de diferentes concentraciones de proteína del líquido de cultivo de células de pars tuberalis de las fracciones 50-60% del gradiente de Percoll sobre la liberación de prolactina por células de pars distalis. Las barras representan la media \pm SEM de 4 experimentos (^a $p < 0,025$; ^b $p < 0,001$).

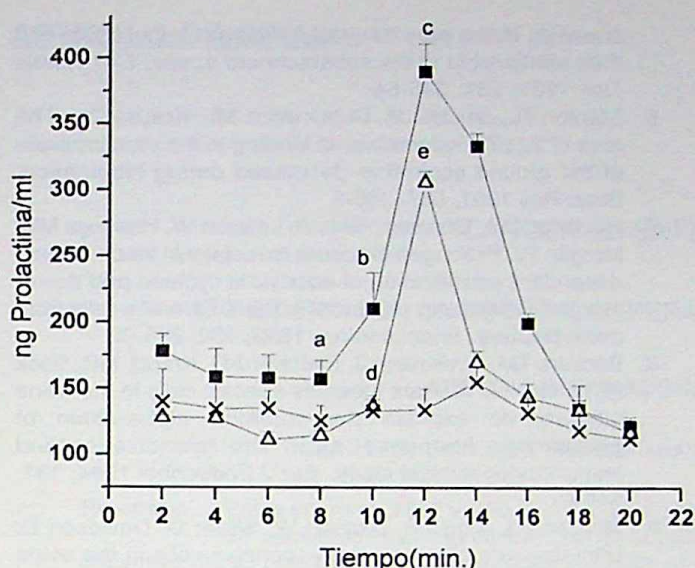


Fig. 4.- Liberación de prolactina por células de pars distalis de rata en experimentos de superfusión estimuladas con KCl 28 mM (■) y con líquido de cultivo de células de pars tuberalis bovina de la fracción 50-60% del gradiente de Percoll, 4 µg de proteína (Δ) y con su dilución 1:10 (-X-) respectivamente (a,b vs c p < 0,001; d vs e p < 0,01, de 4 experimentos).

manteniéndose la misma respuesta con concentraciones mayores. Esto sugeriría que las células del 50-60% serían las responsables de la síntesis del factor/es de PT que afecta las células prolactotropas de la PD.

Para estudiar la dinámica de la liberación de prolactina, se llevaron a cabo experimentos de superfusión (Fig. 4). La estimulación inespecífica de células de la PD con KCl mostró la mayor liberación de prolactina a los 4 minutos. La respuesta a la estimulación con 4 µg de proteína del líquido de cultivo de las células de PT 50-60% se observó también a los 4 minutos. Cuando la estimulación se realizó con una dilución 1:10, no hubo respuesta.

Discusión

La pars tuberalis es un lóbulo de la adenohipófisis fundamentalmente formado por células glandulares propias que difieren en sus rasgos ultraestructurales de otros tipos celulares de la AH^{8, 13}. A pesar de los numerosos estudios aún no ha sido determinado el rol fisiológico y la función de las mismas.

De nuestros resultados se desprende que la secreción de la población celular total de la PT bovina posee la capacidad para estimular la liberación de prolactina por las células de la PD de rata. La separación de las células de la PT por gradiente discontinuo de Percoll, permitió identificar sólo dos fracciones de células (50 y 60%) cuyas secreciones tuvieron el mismo efecto que el

líquido proveniente de la población total. Tal efecto se produjo inclusive a concentraciones menores de proteína, lo cual pone de manifiesto la sensibilidad de las células de la PD al factor desconocido, para la estimulación de la liberación de prolactina. Es poco probable que además exista un aumento en la síntesis de prolactina porque las estimulaciones fueron realizadas en tiempos cortos, es decir, 30 minutos en los experimentos de incubación de células y menos aún en los experimentos de superfusión, en los cuales la estimulación se puso de manifiesto ya a los 4 minutos.

El efecto que observamos en la PD no sería debido a la presencia de factores hipotalámicos, porque se trabajó con células que permanecieron en cultivo el tiempo suficiente como para eliminar los terminales nerviosos presentes en la disección de PT. Por otro lado, la purificación parcial de las poblaciones celulares por gradiente de Percoll y los lavados posteriores de las células para poder eliminarlo, contribuyen a que los cultivos de PT estén exentos de factores hipotalámicos.

Los resultados mostrados evidencian un posible efecto modulador directo de la PT, al menos sobre las células prolactotropas de la PD, que estaría apoyado por los obtenidos en ovinos, en experimentos de co-cultivo de PT con PD¹⁴. Por otro lado, mediante experimentos de desconexión hipotálamo-hipófisis en carnero, Lincoln y Clarke (1994), han presentado evidencia que la modulación fotoperiódica de la secreción de prolactina podría ser independiente del control del hipotálamo, debido presumiblemente a efectos directos de melatonina sobre AH¹⁵.

La purificación parcial por Sephadex G 50 del líquido de cultivo de la PT proveniente de la fracción 50-60% del gradiente de Percoll realizada en nuestro laboratorio (datos no mostrados), hacen presumir que el factor/es responsable de la liberación de prolactina estaría comprendido en un rango de peso molecular superior a 30 kDal. A su vez, dicho factor tiene un efecto muy potente ya que estimuló a las células de la PD en concentraciones muy bajas de proteína, (80 ng), característica de otros factores liberadores o inhibidores, en relación a los 4 µg de proteína, requeridos con el líquido de la fracción celular del 50-60% del gradiente de Percoll sin pasar por Sephadex. Es importante destacar que para lograr una estimulación equivalente de liberación de prolactina con el líquido de cultivo de la totalidad de las células de la PT, se requirieron 9 µg de proteína. Recientemente, Morgan et. al¹⁶ han propuesto en ovinos una posible función reguladora de la PT sobre la expresión del gen c-fos y la liberación de prolactina por lactotropos de la PD. Ellos trabajaron con medio condicionado de PT que fue separado por ultrafiltración en dos componentes que presentaron actividad biológica, uno de tamaño molecular superior a 10 kDal, el cual mostró mayor actividad y otro,

de masa molecular entre 1-10 kDa; este factor/es desconocido fue denominado tuberalina.

A la luz de los resultados obtenidos y de la bibliografía existente podemos sugerir que alguna de las secreciones de la PT regulan la liberación de prolactina por células de la PD. Sin embargo, debido a la ubicación anatómica de la PT, no se puede descartar la posibilidad de que sus productos secretorios puedan alcanzar el espacio perivascular y/o el espacio subaracnoideo, a través de los canales intercelulares comunicantes⁵. Esto implicaría que podrían existir otros puntos de acción de las secreciones de la PT a nivel del sistema nervioso central, en condiciones *in vivo*. Al mostrar en este trabajo que determinadas células de la PT bovina secretan un factor/es no identificado que estimula la secreción de prolactina por células de la PD de rata, cabría especular que *in vivo* y en la rata, la PD sería el posible órgano blanco de la PT.

Agradecimientos: Este trabajo ha sido subsidiado por Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de San Luis (Proyecto N° 9302) y por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PID N° 3711/92).

Bibliografía

1. Dellman H-D, Stoeckel ME, Hindelang-Gertner C, Porte A, Stutinsky F. A comparative ultrastructural study of the pars tuberalis of various mammals, the chicken and the newt. *Cell Tissue Res* 1974; 148: 313-29.
2. Gross DS. The mammalian hypophyseal pars tuberalis: a comparative immunocytochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 1984; 56: 283-98.
3. Aguado LI, Hancke JL, Rodriguez S, Rodriguez EM. Changes in the luteinizing hormone content of the rat pars tuberalis during the estrus cycle and after lesions in the preoptic area. *Neuroendocrinology* 1982; 35: 178-85.
4. Skinner DC, Robinson JE. The pars tuberalis of the ewe: no effect of season or ovariectomy on the distribution, density or presence of immunoreactive cells. *Cell Tissue Res* 1996; 248: 117-23.
5. Aguado LI, Schoebitz K, Rodriguez EM. Intercellular channels in the pars tuberalis of the rat hypophysis and their relationship to the subarachnoid space. *Cell Tissue Res* 1981; 281: 345-54.
6. Stanton TL, Siuciak JA, Dubocovich ML, Krause DN. The area of 2-(125) iodomelatonin binding in the pars tuberalis of the ground squirrel is decreased during hibernation. *Brain Res* 1991; 557: 285-8.
7. Hazlerigg DG, Gonzalez-Brito A, Lawson W, Hastings MH, Morgan PJ. Prolonged exposure to melatonin leads to time-dependent sensitization of adenylate cyclase and down-regulates melatonin receptors in parts tuberalis cells from ovine pituitary. *Endocrinology* 1993; 132: 285-92.
8. Bockers TM, Bockmann J, Fauteck J-D, Kreutz MR, Bock R, Wittkowski W. Pars tuberalis-specific cells in the ovine pituitary do express the common alpha-chain of glycoprotein hormones: an in situ hybridization and immunocytochemical study. *Eur J Endocrinol* 1994; 131: 540-6.
9. Morgan PJ, King TP, Lawson W, Slater D, Davidson D. Ultrastructure of melatonin-responsive cells in the ovine pars tuberalis. *Cell Tissue Res* 1991; 263: 529-34.
10. Spinedi E, Johnston C, Negro-Vilar A. Increased responsiveness of the hypothalamic-pituitary axis after neurotoxin-induced hypothalamic denervation. *Endocrinology* 1984; 115: 267-72.
11. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RL. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193: 265-75.
12. Hunter WM. Handbook of Experimental Immunology. In: Weir DM, editor. Oxford: Blackwell Scientific Publ. 1967, p 98.
13. Stoeckel ME, Hindelang C, Klein MJ, Poissonnier M, Félix JM. Expression of the alpha-subunit of glycoprotein hormones in the pars tuberalis-specific glandular cells in rat, mouse and guinea-pig. *Cell Tissue Res* 1994; 278: 617-24.
14. Hazlerigg DG, Hastings MH, Morgan PJ. Production of a prolactin releasing factor by the ovine pars tuberalis. *Mol Endocrinol*, 1996; 8: 489-92.
15. Lincoln GA, Clarke IJ. Photoperiodically induced cycles in the secretion of prolactin in hypothalamo-pituitary disconnected rams: evidence for translation of the melatonin signal in the pituitary gland. *J Neuroendocrinol* 1994; 6: 251-60.
16. Morgan PJ, Webster CA, Mercer JG, Ross AW, Hazlerigg AM, MacLean A, et al. The ovine pars tuberalis secretes a factor(s) that regulates gene expression in both lactotropic and nonlactotropic pituitary cells. *Endocrinology* 1996; 137: 4018-26.