

Valoración de las fracciones libre y unida resultantes de la interacción de la prolactina con sus receptores específicos

B. Pérez-Villamil y J. G. López del Campo

Servicio de Endocrinología, Metabolismo y Nutrición
Hospital Clínico de San Carlos
28040 Madrid

(Recibido el 28 de enero de 1985)

B. PEREZ-VILLAMIL and J. G. LOPEZ DEL CAMPO. *Studies of Bound and Unbound Prolactin Fractions After Interaction with their Specific Receptors*. Rev. esp. Fisiol., 42 (2) 161-170. 1986.

Binding of either «cold» or ^{125}I -PRL to their specific receptors (fraction after centrifugation at 15,000 and 100,000 $\times g$) obtained from late pregnant rat liver, pre- and post-dissociation with MgCl_2 , has been studied. Binding was higher with cold hormone (Δ 21.63 %) than with ^{125}I -PRL. Similarly, binding to the 100,000 $\times g$ fraction was also higher than to the 15,000 $\times g$ one. Dissociation by MgCl_2 improved binding to the 100,000 $\times g$ fraction (Δ 17.27 %), while reduced the 15,000 $\times g$ fraction binding (∇ 11.71 %), underlying the impurity of the latter fraction. Control studies with rLH, rFSH, hACTH, insuline, glucagon and hGH evidenced the specificity of the preparation to bind lactogenic hormones. Binding increases with PRL and receptor concentration, reaching equilibrium between bound PRL/unbound PRL. An amount of PRL unable to bind to the receptor is always present. Even with high receptor concentrations (3,500 $\mu\text{g}/0.1$ ml) there is still about 25 % of unbound PRL. When re-incubating this previously unbound PRL with a fresh receptor preparation identical to the one used in the first incubation, a similar proportion of bound PRL/unbound PRL is obtained. These results suggest the existence of a heterogeneity in the receptor preparation.

Key words: Prolactin, Receptors.

La prolactina (PRL) interacciona con los receptores específicos situados en la membrana citoplásmica (14, 25), que también reconocen a la hormona de cre-

cimiento (GH) y al lactógeno placentario (22). El mecanismo que se desencadena tras la unión PRL-receptor no comienza con la activación de la adenil-ciclasa y la producción de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc), como ocurre con la mayoría de las hormonas proteicas (24), sino que parece que se desarrolla un proceso de endocitosis por el que el receptor

* Trabajo realizado con ayuda de la Comisión Asesora de Investigación Científica y Técnica (n.º 1090).

engloba a la PRL y se internaliza (7). Así, por medio de técnicas de inmunohistoquímica (29) y de autorradiografía (5, 23), se demuestra la existencia de receptores de PRL en el interior de la célula tanto en estructuras vacuolares como en el aparato de Golgi (4), pero aún no está claro si estos receptores internos son producto de una formación *in situ* (1) o si proceden de los de la membrana citoplasmática. La PRL modula positivamente sus propios receptores (11, 20), y su afinidad por los mismos es de 10^9 M^{-1} (10, 24), produciéndose una unión en parte irreversible (28), en la que la hormona no se altera tras la formación del complejo PRL-receptor. Es de destacar que una gran cantidad de PRL, tras ser incubada con el preparado de receptores (fracción microsomal) no se liga a los mismos y, por tanto, se puede medir en el sobrenadante después de la centrifugación (16). Se ha descrito que tanto la PRL hipofisaria como la plasmática constan de varias formas con diferentes pesos moleculares que le prestan la propiedad de su heterogeneidad y la diferente capacidad de unión a los receptores (18).

En este trabajo se expone el desarrollo de una técnica que permita el estudio de la unión PRL-receptor y los factores que influyen en la misma, centrando la atención principalmente en la fracción de PRL que no se une al receptor.

Material y Métodos

Se utilizan ratas Wistar de 3 meses de edad, preñadas, manteniéndose en un período de 14 h luz/10 h oscuridad. En el día 21.º de gestación son decapitadas e inmediatamente después se extrae el hígado, que se introduce en suero fisiológico a 4°C.

Productos. La lactoperoxidasa fue obtenida de Calbiochem Laboratories; la PRL humana y ovina proceden del

National Institute of Health (N.I.H.) (NIAMDD 4-PRL-1-6 humana y P-S-12 ovina; la hormona de crecimiento (GH) humana del N.I.H.; hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) del N.I.H., lo mismo que la adrenocorticotropina (ACTH) humana; el glucagón de Laboratorio Novo y la insulina porcina de Laboratorios Nordisk.

Marcaje de la hormona. Se realiza mediante la técnica de iodación enzimática con lactoperoxidasa (27) modificando los tiempos de oxidación y la concentración de oxidante: se mezclan 25 μl de PRL (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ con CO_3NH_4 0,01 M) con 25 μl de tampón fosfato 0,05 M, pH 7, se añade 0,5 mCi de I^{125} , 10 μl de lactoperoxidasa (1 mg/ml) y 10 μl de H_2O_2 (5 μl de H_2O_2 al 30 % en 75 ml de H_2O). Al cabo de 5 min se vuelve a añadir 5 μl de lactoperoxidasa y 5 μl de H_2O_2 y después de otros 5 min, se añade 1 ml de tampón Tris 0,025 M, pH 7,6.

La purificación se realiza mediante separación en gel de Sephadex G-100 (columna de $30 \times 1 \text{ cm}$) eluyendo con el mismo tampón y se recogen fracciones de 1 ml en tubos conteniendo Tris al que se le ha añadido BSA al 1 % (seroalbúmina bovina).

Extracción de receptores del tejido. Se realiza una homogeneización del tejido y dos posteriores purificaciones mediante centrifugación según técnica de POSNER *et al.* (21). Para ello, primero se limpia el hígado de grasa perihepática, se pesa y, troceado, se introduce en una solución de sucrosa 0,3 M (5 ml/g de tejido).

Se homogeneiza con un Polytron PT-10 durante 1 min, y a continuación se procede a una 1.ª centrifugación que se realiza a $15.000 \times g \times 20 \text{ min}$ (centrífuga Sorvall RC-2, rotor SS-34); el precipitado se resuspende (2 g de tejido inicial

por 1 ml de Tris 0,025 M pH 7,6) mediante un homogeneizador tipo Potter.

El sobrenadante se somete a una segunda centrifugación a $100.000 \times g \times 1$ h (Ultracentrífuga Damon IEC/IB 60 rotor SH-110) y el nuevo precipitado se resuspende por medio de un homogeneizador Potter (1 ml del mismo tampón por gramo de tejido). Se distribuye en alícuotas y se determina el contenido de proteínas por el método de LOWRY *et al.* (18), utilizando como estándar BSA, dado que la cantidad de receptores es directamente proporcional a la de proteínas. Todo el proceso se realiza a 4°C .

Para eliminar la PRL que estaba unida al receptor en el momento del sacrificio del animal, se incuba el preparado de receptores con Cl_2Mg 5 M a 4°C , durante 1-2 h, tras las cuales se elimina el Cl_2Mg , lavando con Tris-BSA 0,1 % y centrifugando a 16.000 rpm $\times 20$ min, descartando el sobrenadante. El precipitado se resuspende en Tris-BSA 0,1 %, conservando la concentración inicial.

RRA (radiorreceptor ensayo). Por duplicado se incuban 200 μl de tampón Tris, 100 μl de receptores (100-250 μg por 0,1 ml de proteína) 100 μl de PRL ovina o humana (h-PRL y o-PRL tienen el mismo % unión) marcada con I^{125} (60.000-100.000 cpm) y 100 μl de PRL humana en cantidades variables que van desde 0 a 1.000 ng/ml, para configurar una curva estándar.

La preparación se deja durante 18-20 h a temperatura ambiente, se «lava» con 3 ml de tampón a 4°C y se centrifuga a $3.000 \times g$ durante 45 min, tras lo cual se aspira el sobrenadante y se determina la radiactividad del precipitado en un contador gamma.

RAA (ensayo de absorción a receptores). El porcentaje de unión de PRL estándar «fría» (sin marcar con I^{125}) al receptor se determina incubando por duplicado durante 18-20 h 300 μl de pre-

parado de receptores con 300 μl de PRL estándar. Las concentraciones que se utilizan tanto de PRL como de receptores se especificarán en cada experimento. Se centrifuga a $3.000 \times g \times 30$ min, y en el sobrenadante se halla la concentración de PRL existente, por medio de radioinmunoensayo (RIA), midiéndose así la cuantía de PRL que no se unió al receptor, y que denominamos «fracción libre» o «PRL no unida».

Resultados

Porcentaje de unión PRL-receptor. Se estudia el porcentaje de unión de receptores de las fracciones de centrifugación con 15.000 y $100.000 \times g$, antes y después de disociar la PRL propia del tejido (con Cl_2Mg 5 M) que continúa unida al receptor después del proceso de extracción. Se utilizan 500 $\mu\text{g}/0,1$ ml del preparado de receptores que se incuban, por un lado con PRL estándar «fría» (50 ng/ml), y por otro con 87.000 cpm de PRL- I^{125} (equivalente a 45 ng de PRL

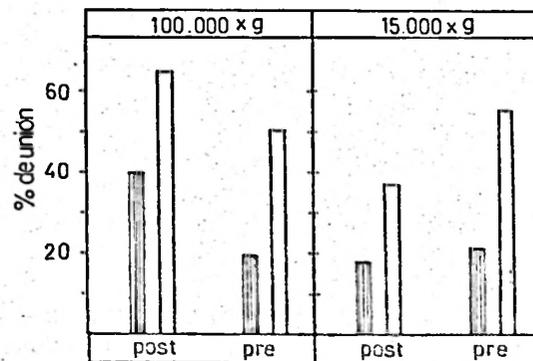


Fig. 1. Diferencias en los porcentajes de unión entre la utilización de hormona fría (50 ng/ml) □ o marcada (87.000 cpm) ▨.

En la parte izquierda están representados los correspondientes a los receptores (500 $\mu\text{g}/0,1$ ml) de la fracción de $100.000 \times g$ y en la derecha los de la de $15.000 \times g$, dentro de cada uno de ellos se distingue entre pre- y post-disociación con Cl_2Mg 5 M.

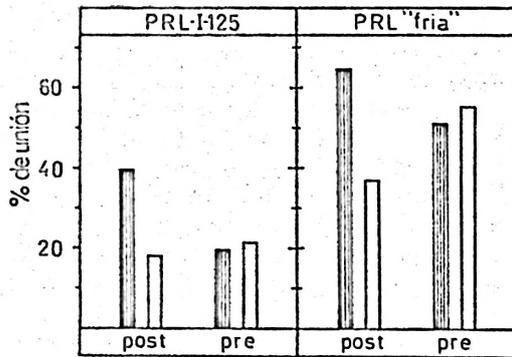


Fig. 2. Diferencia entre los porcentajes de unión de los receptores ($500 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$) de la fracción de $100.000 \times g$ \blacksquare y la de $15.000 \times g$ \square .

En la mitad izquierda están representados los correspondientes a la PRL-I¹²⁵ (87.000 cpm) y en la derecha los de la PRL fría (50 ng/ml) y en cada uno de ellos se distingue pre- y post-disociación con Cl_2Mg 5 M .

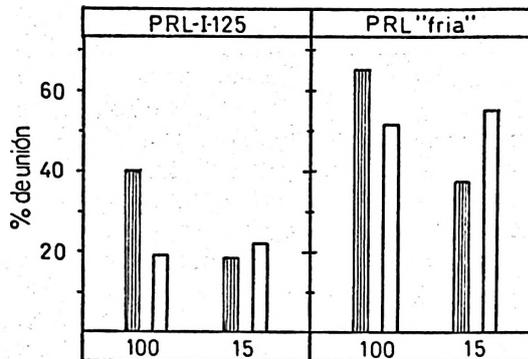


Fig. 3. Efecto de la disociación con Cl_2Mg sobre los porcentajes de unión, pre-disociación \square y post-disociación \blacksquare .

En la parte izquierda están representados los correspondientes a la PRL marcada (87.000 cpm) y en la derecha los de la PRL fría (50 ng/ml) y dentro de cada uno de ellos los valores que se encuentran en la fracción de 100.000 y de $15.000 \times g$.

según actividad específica del marcado). El porcentaje de unión de la PRL estándar «fría» a los receptores es mayor (Δ medio $21,63 \%$) que el de la PRL-I¹²⁵, tanto si las incubaciones se realizan con la fracción de $15.000 \times g$ como con la de $100.000 \times g$, no influyendo tampoco la incubación previa del preparado de receptores (pre o post-disociación) con Cl_2Mg (fig. 1).

La fracción de $100.000 \times g$ liga más (Δ medio $25,07 \%$) que la de $15.000 \times g$, sólo si estos receptores han sufrido el proceso previo de disociación con Cl_2Mg . En las incubaciones que no se han sometido al proceso de disociación, se observa que tanto la PRL «fría» como marcada se une algo menos a la fracción de $100.000 \times g$ (∇ medio $3,91 \%$) que a la de $15.000 \times g$ (fig. 2).

El proceso de disociación con Cl_2Mg aumenta el porcentaje de unión (Δ medio $17,27 \%$) en la fracción de $100.000 \times g$ y lo disminuye (∇ medio $11,71 \%$) en la de $15.000 \times g$, tanto si se utiliza PRL «fría» como PRL marcada (fig. 3).

Especificidad de los receptores de PRL y competencia con otras hormonas. Con el fin de valorar el desplazamiento de una curva estándar de PRL con diferentes hormonas, se hace un RRA (PRL humana) y a diferentes replicados de la curva estándar se le añade $100 \mu\text{l}$ de las distintas hormonas: GH humana (20 ng/ml) LH y FSH ($41,67 \text{ ng}/0,1 \text{ ml}$), ACTH humana (10 ng/ml), insulina porcina ($50 \mu\text{U/ml}$) y glucagón (20 ng/ml), los resultados muestran que la GH es la única hormona que desplaza la PRL unida al receptor (fig. 4), indicando que estos receptores son específicos para hormonas lactogénicas.

Tiempo de incubación. Se realiza un RAA en el que, por sextuplicado, se incuban 47 ng/ml de h-PRL estándar con receptores de la fracción de $100.000 \times g$ post-disociación, cuyas concentraciones van desde 54 a $3.500 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$. El primer duplicado se centrifuga a las 16 h , el segundo a las 24 h , y el tercero a las 36 h , y se mide por RIA, la PRL exis-

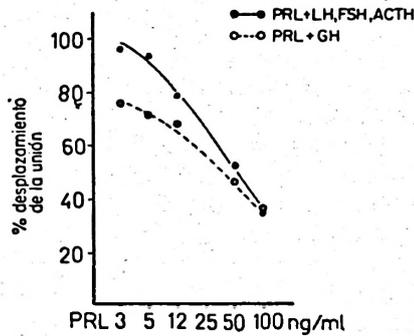


Fig. 4. Especificidad de los receptores de PRL. A cada punto de la curva estándar se añaden 100 μ l de diferentes hormonas \bullet — \bullet PRL+LH y FSH, + ACTH, + insulina, + glucagón \bullet --- \bullet PRL+GH. En abscisas se representa la cantidad de PRL en escala logarítmica y en ordenadas el porcentaje del desplazamiento de la unión en escala decimal.

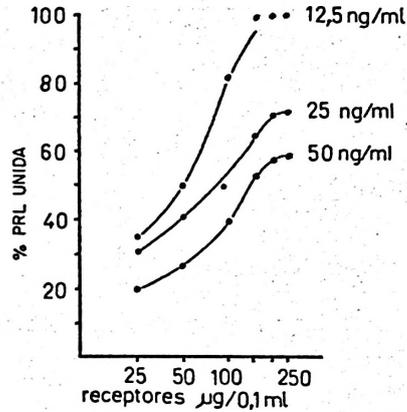


Fig. 6. Influencia de la PRL y de los receptores sobre los porcentajes de unión. Incubaciones realizadas a distintas concentraciones de PRL y concentraciones crecientes de receptores expresadas en escala logarítmica.

tente en el sobrenadante. De los resultados destaca que el tiempo de incubación debe ser mayor de 16 h, pero no necesariamente mayor de 24 h, transcurridas las cuales el porcentaje de unión de PRL al receptor no aumenta significativamente. Asimismo se observa que persiste como

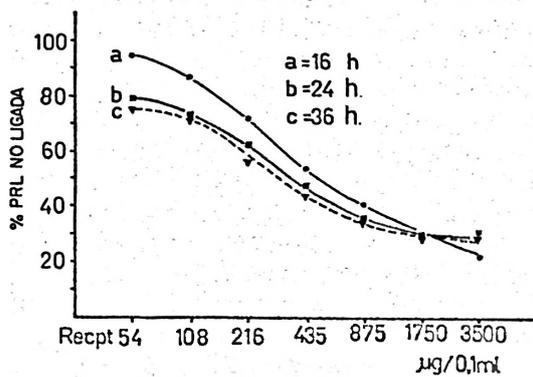


Fig. 5. Influencia del tiempo de incubación sobre el porcentaje de PRL no ligada al receptor.

Después de 16 horas \bullet — \bullet , 24 horas \square — \square o 36 horas ∇ — ∇ . En abscisas se representa la concentración de receptores en escala logarítmica.

un 25 % de PRL sin unirse a los receptores, en cualquiera de las condiciones de incubación, aunque se aumente su concentración hasta valores tan altos como 3.500 μ g por 0,1 ml (fig. 5).

Efectos por la variación de las concentraciones de receptores y PRL sobre el porcentaje de unión. Se realiza un RAA, en el que varias concentraciones de PRL estándar (3,12, 6,25, 12,5, 25 y 50 ng hPRL/ml) se incuban con distintas cantidades de receptores (fracción de 100.000 \times g post-disociación). El porcentaje de unión de la PRL a los receptores aumenta con la concentración de los mismos llegando a un equilibrio entre 150-200 μ g/0,1 ml de receptores (fig. 6).

Los valores iniciales menores de 6 ng por ml de PRL incubada no se detectan bien, debido a la dilución que sufren y a que la sensibilidad del RIA es de alrededor de 2 ng/ml en las curvas estándar propias de estos ensayos.

Capacidad de unión a receptores de la fracción de PRL que no se liga a los mismos en una incubación previa. Se

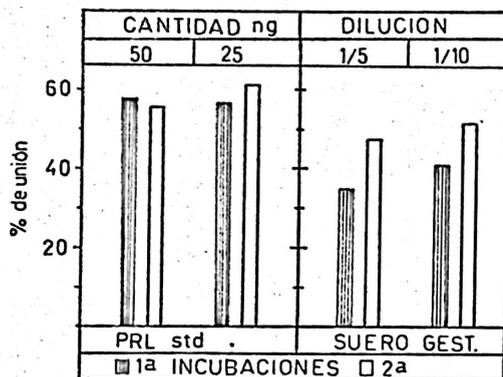


Fig. 7. Comparación de los porcentajes de unión a receptores entre 1.^o y 2.^o incubación. 1.^o incubación: 50 ó 25 ng/ml de PRL (izquierda) o de suero de gestante diluido 1/5 ó 1/10 (derecha) y receptores (300 μ g/0,1 ml) de la fracción de 100.000 \times g post-disociación. 2.^o incubación: PRL de cada uno de los sobrenadantes de la 1.^o incubación y 300 μ g por 0,1 ml de receptores frescos de la fracción de 100.000 \times g post-disociación.

realiza un RAA en el que se incuban 300 μ g/0,1 ml de receptores (fracción de 100.000 \times g post-disociación) con 50 y 25 ng/ml de hPRL estándar o con diluciones 1/5 y 1/10 de un suero de mujer gestante (PRL = 396 ng/ml), lo que constituye la primera incubación. Una alícuota del sobrenadante resultante (conteniendo la PRL no unida) se vuelve a incubar con 300 μ g/0,1 ml de receptores (segunda incubación) y se determina por RIA la cantidad de PRL de los sobrenadantes de ambas incubaciones.

Cuando se incubaba PRL estándar (figura 7, izquierda) el 57,64 % se une al receptor durante la primera incubación y el resto, 42,36 %, queda en el sobrenadante. Sin embargo, en una segunda incubación, es capaz de unirse a los receptores el 58,35 %. En el caso de incubar PRL de mujer gestante (fig. 7, derecha) ocurre un hecho similar, siendo los porcentajes más bajos que en el caso anterior (38,5 % en la primera y 49,6 % en la segunda incubación).

Discusión

La unión de la PRL a su anticuerpo específico es máxima cuando se utiliza PRL «fría». El hecho de introducir pequeñas modificaciones en la molécula de PRL, como ocurre con el proceso de la iodación, hace disminuir esta unión, conservándose gran parte de la capacidad inmunológica (3). Cuando la iodación se realiza con lactoperoxidasa (27) se daña menos la capacidad inmunológica que cuando se hace con cloramina-T. En cuanto a la actividad biológica de la PRL (en este caso la unión a sus receptores específicos), también se ha comprobado que resulta afectada en igual manera (datos no expresados en este trabajo). De este modo, el que los porcentajes de unión sean menores al utilizar PRL-I¹²³ en lugar de PRL «fría» sugiere que existe una «inactivación biológica» de parte de la PRL durante el proceso de la iodación, aunque se utilice la técnica de iodación enzimática antes referida. Se observa que la PRL se une a los precipitados obtenidos por centrifugación a 15.000 y a 100.000 \times g, siendo mayor el porcentaje de unión la fracción de 100.000 \times g (microsomal), en lo que coinciden otros autores (9, 21). Esto podría ser debido a que los receptores están asociados a fragmentos de membrana plasmática que migran en el fraccionamiento gravitatorio, principalmente con los microsomas (100.000 \times g). Otros autores han estudiado la unión de PRL a receptores utilizando homogenados completos de diversos tejidos, como genitales (2) e hígado (19) de rata, sin realizar fraccionamiento posterior por centrifugación.

El Cl_2Mg produce una desaturación de los receptores ocupados por la hormona (15). El porcentaje de unión de la PRL a su receptor aumenta después del proceso de disociación con Cl_2Mg cuando se trata de la fracción de 100.000 \times g, por lo que se puede deducir que parte de estos receptores, extraídos en las condicio-

nes expuestas del hígado de rata preñada, tenían cierta cuantía de PRL unida a ellos antes de ser tratados con el Cl_2Mg (fig. 1). Paradójicamente no ocurre lo mismo en la fracción de $15.000 \times g$, en la que el proceso de disociación disminuye el porcentaje de unión, lo cual demuestra que, en esta fracción, no hay complejo PRL-receptor específico sobre el que poder actuar como en el caso anterior, debido quizás a una mayor impureza o inespecificidad de la preparación. De ello se deduce que para nuestro propósito, es mejor fraccionar el homogeneizado mediante ultracentrifugación para obtener uniones más específicas. Estas observaciones complementan lo referido por KEENAN *et al.* (12) que relacionan la unión de la PRL a las distintas fracciones de centrifugación, con diferentes partes celulares, y asocian la fracción de $15.000 \times g$ con la unión a fracciones mitocondriales y Golgi y la de $100.000 \times g$ con unión a membranas plasmáticas y microsomas.

Los receptores de PRL han sido caracterizados en la membrana celular (26) e intracelularmente en estructuras vacuolares (24). También se ha puesto de manifiesto, mediante técnicas de autorradiografía, y corroborado con técnicas de inmunohistoquímica (29) la existencia de receptores de PRL en el aparato de Golgi (23), los cuales puede que estén producidos dentro de la célula (1) o que deriven en parte de la internalización de receptores de membrana activados tras su unión a la PRL (7), que sufren una posterior degradación en los lisosomas (4), lo que implicaría el concepto de «reciclaje» de los receptores (6, 13).

Los resultados muestran que pese a utilizarse la fracción microsomal disociada, siempre queda una cuantía de PRL que no se une al receptor, aunque se emplee una concentración suficiente de los mismos ($300 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$) e incluso se llegue a los $3.500 \mu\text{g}/0,1 \text{ ml}$ de proteína de receptor, alcanzándose un equilibrio entre PRL ligada/PRL sin ligar.

Esto no está provocado por una degradación enzimática de la PRL o de los receptores en la incubación, ya que en nuestros experimentos con inhibidores enzimáticos (benzamidina, cloroquina, fluoruro de fenilmetilsulfonilo) se comprobó que los porcentajes de unión no variaban y se seguía encontrando igual porcentaje de PRL sin ligar (datos no publicados). Tampoco se debe a una falta de especificidad de los receptores pues, del estudio realizado con diferentes hormonas para observar su influencia en el porcentaje de unión PRL-receptor, se deduce que ésta es nula o mínima, y que la única hormona capaz de competir con la PRL por su receptor es la GH, coincidiendo con otros autores (21) y demostrando la especificidad de este preparado de receptores para las hormonas lactogénicas (22). Esto explicaría que el porcentaje de unión de la PRL de suero de gestante sea más bajo, ya que este suero contiene lactógeno placentario, además de PRL, que competiría por los mismos receptores disminuyendo el número de sitios hábiles para ligar PRL. Está ampliamente descrita la heterogeneidad de la molécula de PRL (8, 17) y se podría pensar, que la existencia de una fracción de PRL constantemente no ligada al receptor, fuese debida a la propia estructura de esta porción de PRL, que presentara una forma molecular no reconocible por el mismo. Por ello se reincuba esta fracción de PRL con receptores y se observa que se une a éstos en proporción semejante a la de la PRL «total», por lo que hay que pensar que el equilibrio entre PRL ligada/PRL sin ligar, no es debido a las características moleculares de la PRL, y que existe algo en la preparación de membranas o en el proceso de unión PRL-receptor, que es el responsable de este equilibrio.

VANDER-GUGTEN (28) estudiando *in vitro* la unión de PRL a receptores ya preincubados con la misma hormona, llega a la conclusión de que el proceso

de unión PRL-receptor, en un porcentaje bastante elevado (65 %), es irreversible. Por todo lo anteriormente expuesto, se puede pensar que existen dos tipos de receptores: unos con unión irreversible que tomarían la PRL y no la devolverían al medio una vez ligada, y otros con unión reversible que liberan la PRL con facilidad, y que serían los responsables de las proporciones que encontramos entre PRL ligada/PRL sin ligar. Asimismo se podría formular la hipótesis de que estos dos tipos de receptores también pudieran corresponderse con los receptores plasmáticos y con los internalizados, pudiendo todo ello ser compatible con todos los hallazgos antes mencionados, y explicándose así el fenómeno de la fracción «PRL-no-unida al receptor».

Agradecimientos

A Dña. Concepción Sancha por el trabajo mecanográfico. Al *National Institute of Health (Bethesda Maryland, U.S.A.)* por la provisión de los kits hormonales a que se hace referencia en el texto.

Resumen

Se estudia la unión de PRL, fría y marcada con I^{125} , a receptores específicos obtenidos por homogeneización y centrifugación diferencial a 15.000 y 100.000 $\times g$ de hígado de rata preñada pre- y post-disociación con Cl_2Mg 5 M. Los porcentajes de unión son mayores (Δ 21,63 %) cuando se utiliza hormona fría que cuando se hace con PRL- I^{125} ; liga más la fracción de 100.000 $\times g$ que la de 15.000 $\times g$. Post-disociación, aumentan en la fracción de 100.000 $\times g$ (Δ 17,27 %) y disminuyen en la de 15.000 $\times g$ (11,71 %). Las incubaciones con rLH, rFSH, hACTH, insulina, glucagón y hGH demuestran la especificidad de los receptores para hormonas lactogénicas. El porcentaje de unión aumenta con la concentración de receptores y de PRL alcanzándose un equilibrio entre PRL ligada/PRL sin ligar. Siempre queda una cuantía de PRL que no se

une al receptor, aunque exista una concentración suficiente de los mismos, e incluso se llegue a concentraciones tan elevadas como de 3.500 $\mu g/0,1$ ml. Preincubando esta PRL con preparado fresco de receptores se observa que es reconocida por los mismos en proporción semejante a la de la primera vez, de lo que podría deducirse la existencia de una heterogeneidad de los receptores del preparado.

Bibliografía

1. Amit, T., Barkey, R. J., Gavish, M. y Youdin, M. B. H.: *Endocrinology*, **114**, 545-552, 1984.
2. Barkey, R. J., Shani, J., Amit, T. y Barzilai, D.: *J. Endocr.*, **74**, 163-173, 1977.
3. Barkey, R. J., Shani, J., Goldhaber, G. y Barzilai, D.: *Mol. Cell Endocr.*, **23**, 105-113, 1981.
4. Conconi, M. V. y Walker, A. M.: *Endocrinology*, **114**, 725-734, 1984.
5. Costlow, M. E. y McGuire, W. L.: *Endocrinology*, **75**, 221-226, 1977.
6. Djiane, J., Houdebine, L. M. y Kelly, P. A.: *Endocrinology*, **110**, 791-795, 1982.
7. Dusanter-Fourt, I., Djiane, J., Kelly, P. A., Houdebine, L. M. y Teyssot, B.: *Endocrinology*, **114**, 1021-1027, 1984.
8. Garnier, P. E., Aubert, M. L., Kaplan, S. L. y Grumbach, M. M.: *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **47**, 1273-1281, 1978.
9. Herington, A. C., Veith, N. y Burger, H. G.: *Biochem. J.*, **158**, 61-69, 1976.
10. Herington, A. C. y Veith, N. M.: *J. Endocr.*, **74**, 323-334, 1977.
11. Hughes, J. P., Elsholtz, H. P. y Friesen, H. G.: *Endocrinology*, **111**, 702-704, 1982.
12. Keenan, E. J., Kemp, E. D., Ramsey, E. E., Garrison, L. B., Pearse, H. D. y Hodges, C. V.: *J. Urol.*, **122**, 43-46, 1979.
13. Keenan, E. J., Kase, P. A. y Thomas, J. A.: *Endocrinology*, **109**, 170-175, 1981.
14. Kelly, P. A., Posner, B. I., Tsushima, T., Friesen, H. G.: *Endocrinology*, **95**, 532-539, 1974.
15. Kelly, P. A., Leblanc, G. y Djiane, J.: *Endocrinology*, **104**, 1631-1638, 1979.
16. López del Campo, J. G. y Friesen, H. G.: *Endocrinología*, **29**, 48-49, 1982.
17. López del Campo, J. G. y Robyn, C.: «International Congress of Endocrinol-

- ogy», Hamburgo, 1976, Abstract Book. Abs. 327, pág. 134.
18. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, I. L. y Randall, R. J.: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
 19. Maes, M., De Hertogh, R., Watrin-Granger, P., y Ketelslegers, J. M.: *Endocrinology*, **113**, 1325-1332, 1983.
 20. Manni, A., Chambers, M. J. y Pearson, O. H.: *Endocrinology*, **103**, 2168-2171, 1978.
 21. Posner, B. I., Kelly, P. A., Shiu, P. C. y Friesen, H. G.: *Endocrinology*, **95**, 521-531, 1974.
 22. Posner, B. I.: *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **53**, 689-703, 1975.
 23. Posner, B. I., Bergeron, J. J. M., Josefsberg, Z., Khan, M. N., Khan, R. J., Patel, B. A., Sikstrom, R. A. y Verman, A. K.: *Recent Prog. Horm. Res.*, **37**, 539-582, 1981.
 24. Posner, B. I. y Khan, M. N.: En «Prolactin and Prolactinomas» (Tolis, G., Stefanis, C., Mountokalakis, T. y Labrie, F., eds.), Raven Press, Nueva York, 1983, pp. 9-18.
 25. Ranke, M. B., Stanley, Ch. A., Tenore, A., Rodbard, D., Bongiovanni, A. M. y Parks, J. S.: *Endocrinology*, **99**, 1033-1045, 1976.
 26. Silverstein, A. M. y Richards, J. F.: *Biochem. J.*, **178**, 743-751, 1979.
 27. Thorell, J. I. y Johansson, D. G.: *Biochim. Biophys. Acta*, **251**, 363-369, 1971.
 28. Vander-Gugten, A. A., Waters, M. J., Murthy, G. S. y Friesen, H. G.: *Endocrinology*, **106**, 402-411, 1980.
 29. Witorsch, R. J.: *J. Histochem. cytochem.*, **26**, 565-580, 1978.

