

EFECTO DE LA HORMONA LIBERADORA DE TIROTROFINA (TRH) EN LA SECRECIÓN DE PROLACTINA DE DECIDUA HUMANA*

Drs. *Carmen Romero O.^{1**}, Ximena Campos F.^{1**}, Hernán E. Lara P.^{2**}*

¹Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital Clínico J. J. Aguirre, Universidad de Chile. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas de la Universidad de Chile

**Bioquímicos

RESUMEN

Para prevenir el Síndrome de Distress Respiratorio (RDS), se ha usado el tratamiento conjunto de betametasona y hormona liberadora de tirotrófina (TRH). La TRH actuaría indirectamente sobre la producción del surfactante pulmonar, estimulando la secreción de hormonas tiroideas; otra vía para incrementar el surfactante pulmonar es induciendo la secreción de PRL Prolactina (un potente estimulador de la secreción del surfactante pulmonar) desde la hipófisis o de otros tejidos que secreten PRL (como se ha descrito previamente para la decidua).

El objetivo de este trabajo fue estudiar el efecto de diferentes dosis de TRH en la secreción de PRL por el tejido corión-decidua y caracterizar las formas bioactivas de PRL secretada por dicho tejido.

Veinte placentas de embarazos normales (38-41 semanas), obtenidas por parto normal o cesáreas, fueron recolectadas en el Departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. Explantes de tejido corión-decidua secretaron PRL en condiciones basales, con una secreción máxima de la hormona a las 24 horas de incubación. Se encontró un aumento significativo ($p < 0,05$) en la secreción de PRL con $1,5 \times 10^{-6}$ M de TRH, el cual fue debido principalmente a un aumento significativo ($p < 0,05$) de la forma little del PRL bioactivo.

Estos resultados sugieren que una de las maneras en que TRH acelere la madurez pulmonar fetal podría ser aumentando la secreción de PRL por el tejido decidual; esta hormona podría pasar rápidamente al líquido amniótico para activar la producción del surfactante pulmonar del feto.

SUMMARY

Respiratory Distress Syndrome (RDS) is the main cause of early neonatal death and one of the most important causes of mortality during the first year of life. Treatment with thyrotropin-releasing hormone (TRH) which acts indirectly on lung surfactant production by stimulating thyroid hormone secretion, is one method used to prevent this disorder (RDS). Another way to increase lung surfactant is to induce prolactin (PRL) secretion (a potent stimulator of lung surfactant secretion) from the pituitary gland or from other PRL secreting tissue (as has been described for decidual tissue).

The objective of this work was to study the effect of different doses of TRH on PRL secretion by human choriondecidua tissue and to characterize the bioactive forms of PRL it secretes.

Twenty placentas from normal pregnancies (38-41 weeks), obtained through normal deliveries and cesarian sections, were collected at the Department of Obstetrics and Gynecology Clinical Hospital, University of Chile. Explants of choriodecidua tissue secreted PRL in basal conditions with a maximum secretion of the hormone at 24 hours of incubation. A significant increase ($p < 0,05$) of PRL secretion with 1.5×10^{-8} M of TRH was observed, which was mainly related to a significant increase ($p < 0,05$) of the little PRL bioactive form.

These results suggest that one of the ways TRH might accelerate fetal lung maturity could be by increasing PRL secretion by decidual tissue. This hormone might pass quickly to the amniotic fluid activate production of fetal lung surfactant.

KEY WORDS: *TRH, Choriodecidua, PRL, Respiratory distress syndrome*

INTRODUCCION

El síndrome de Distress respiratorio (RDS) es principal causa de muerte neonatal prematura y una de las causas más importantes de mortalidad durante el primer año de vida. Cuando el embarazo debe ser interrumpido antes de la fecha de término, debido a problemas de salud materna o bien por ruptura prematura de membranas es muy importante acelerar la madurez pulmonar para alcanzar niveles óptimos de surfactante pulmonar antes del parto.

La administración de corticoides acelera la maduración pulmonar fetal en humanos y otras especies, este tratamiento ha sido usado clínicamente para prevenir el RDS (1). Aunque el uso de corticoides disminuye la incidencia y severidad del RDS, esta terapia tiene algunas limitaciones (2), debido a una respuesta tardía (después de las 48 horas) y a los efectos laterales de los corticoides en algunos embarazos patológicos, por tal motivo, este procedimiento tiene una eficiencia limitada (1). En efecto, se ha demostrado que la administración de betametasona a mujeres embarazadas entre las 24 y 28 semanas de gestación, no reduce la incidencia del RDS (3). Para solucionar estos problemas, una nueva terapia de combinación hormonal se implementó para lograr la madurez pulmonar fetal dentro de las 48 horas (4, 5). Esta terapia está basada en la administración de hormona liberadora de tirotrófina (TRH) junto con betametasona. Mientras betametasona induce la biosíntesis de enzimas involucradas en la producción de surfactante pulmonar, la TRH aumenta la secreción de TSH desde la hipófisis fetal, seguido por un aumento de las hormonas tiroideas (T_3 y T_4), las que inducen la síntesis del surfactante del pulmón fetal (6, 7, 8, 9).

Además de estos efectos, la conocida acción de TRH sobre la secreción de Prolactina PRL hipofisaria y el conocido efecto de PRL sobre la maduración fetal, abre la interesante posibilidad de que parte del efecto de TRH sobre la maduración del pulmón fetal, podría ser mediada vía secreción de

PRL desde la hipófisis fetal o desde la decidua en la placenta.

Esta última posibilidad está apoyada por el hecho de que la PRL presente en el líquido amniótico es sintetizada localmente por la placenta, específicamente la decidua (10, 11, 12, 13), y por la acción de PRL sobre el crecimiento fetal, osmorregulación y madurez pulmonar fetal (14, 15, 16, 17). Además, estudios *in vitro* con tejido de pulmón fetal han confirmado un aumento en la secreción de surfactante pulmonar inducida por Prolactina PRL (6, 18), y este efecto puede ser mediado por receptores específicos a PRL presentes en membranas de pulmón fetal (15).

Para documentar este potencial mecanismo de acción de TRH en el tratamiento del RDS, es necesario demostrar que TRH puede inducir un aumento en la secreción de PRL por la decidua. El presente estudio está enfocado para estudiar dicho objetivo, así como también analizar la heterogeneidad molecular de PRL secretada por la decidua ya que se ha demostrado la importancia de las propiedades fisiológicas de las diferentes formas moleculares de PRL (19, 20, 21).

MATERIAL Y METODOS

Obtención y preparación del tejido

Dieciocho placentas de embarazos normales (38-41 semanas) obtenidas por parto normal o cesárea fueron recolectadas en el departamento de Obstetricia y Ginecología del Hospital Clínico de la Universidad de Chile. En algunos casos se obtuvo tejido decidual puro mediante raspado uterino al final del parto. Las placentas fueron recolectadas en suero fisiológico frío y el tejido corión-decidua fue separado manualmente de las membranas placentarias. El tejido fue lavado tres veces con solución Hank's balanceada (HBSS) con la adición de antibióticos (100 mg de penicilina, 20 mg de gentamicina y 100 mg de streptomycin por litro, Gibco) y 0,35 g de NaHCO_3/L a pH 7,4. Los tejidos

corion-decidua, amnios y decidua fueron cortados en trozos de 100 mg a 200 mg cada uno.

El presente trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital Clínico de la Universidad de Chile.

Incubaciones de explantes de placenta

Trozos de tejidos (100 mg a 200 mg) fueron incubados en 5 ml de medio de cultivo M-199 libre de suero (Sigma Chemical Co.) suplementado con penicilina (100 mg), gentamicina (20 mg) y estreptomycin (100 mg) (Gibco) por litro conteniendo 2,2 g de NaHCO_3 y 1 g BSA por litro, con pH 7,4. Para estudiar la secreción de PRL basal, los explantes fueron incubados en duplicado por 72 horas en un baño de agua a 37° C en una atmósfera de 95% O_2 y 5% CO_2 . Después de las dos horas de preincubación se cambió el medio de cultivo y luego cada 24 horas. Para estudiar el efecto de TRH en la secreción de PRL del tejido decidual, las incubaciones se realizaron en presencia de $0,3 \times 10^{-8}$ M, $1,5 \times 10^{-8}$ M y 3×10^{-8} M (1,5 y 10 ng/ml) de TRH (pGlu-His-Pro-Amide, Sigma Chemical Co) a 37° C durante las primeras 24 horas. Al final del experimento, el medio de cultivo fue centrifugado y separado para remover cualquier remanente de tejido y luego almacenado a -20° C hasta que la PRL fue medida por enzimoanálisis (EIA) con método y reactivos de la Organización Mundial de la Salud.

Heterogeneidad molecular de PRL decidual

Para estudiar la heterogeneidad molecular de PRL secretada por el tejido decidual, al final de las 24 horas de incubación, el medio de cultivo fue cromatografiado en una columna de sephadex G-100, como ha sido descrito previamente (19, 21), usando buffer fosfato 0,1 M pH/4 como buffer de elución. Fracciones de 0,4 ml fueron recolectadas y en cada fracción se midió PRL usando un EIA para PRL de la Organización Mundial de la Salud. El coeficiente de variación interensayo para el EIA de PRL fue de 12%.

Los resultados de la secreción de PRL basal de las incubaciones del amnios, decidua y corion-decidua después de las 2, 24, 48 y 72 horas son expresadas en ng de PRL secretadas por 100 mg de tejido húmedo (promedio y error estándar de doce experimentos y cada experimento se realizó en duplicado). El amnios fue usado como control negativo para la secreción de PRL. Los resultados del efecto de TRH en la secreción de PRL son

expresados como ng de PRL secretados por 100 mg de tejido húmedo (promedio y el error estándar de seis experimentos y cada experimento fue realizado en duplicado).

El análisis estadístico fue realizado usando análisis de varianza (ANOVA) y Turkey's Multiple Comparison Test. Un $p < 0,05$ fue considerado como significativo.

RESULTADOS

Secreción de PRL decidual

Se encontró un aumento significativo en la secreción de PRL basal a las 24 horas de incubación en el tejido corion-decidua y decidua pura (raspado uterino) como se muestra en la Figura 1. La secreción de PRL del corion-decidua aumentó tres veces y el aumento en la secreción de PRL decidual aumento en 4,7 veces. La secreción de PRL basal a las 48 horas rotomó a valores obtenidos al comienzo del experimento para ambos tejidos.

Efecto de TRH en la secreción de PRL decidual

El efecto de TRH en la secreción de PRL del tejido corion-decidua fue examinado a las 24 horas (tiempo máximo de secreción de PRL basal) de tratamiento, usando $0,3 \times 10^{-8}$ M, $1,5 \times 10^{-8}$ M y 3×10^{-8} M de TRH, obteniéndose un aumento significativo desde los $0,3 \times 10^{-8}$ M de TRH. Se usó tejido corion-decidua porque era el tejido de más fácil manejo y debido a que también se encontró un aumento en la secreción de PRL similar al encontrado en tejido decidual puro. La cantidad de PRL secretada por las diferentes dosis de TRH fue ex-

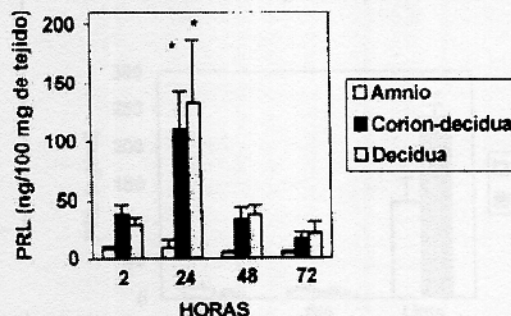


Figura 1. Secreción de PRL basal de tejidos corion-decidua, amnios y raspado uterino (decidua pura). Los resultados son expresados como ng de PRL secretada por 100 mg de tejido (Promedio \pm ESM) de 12 experimentos. El amnios fue usado como control negativo (*) = $p < 0,05$.

presada como ng de PRL/100 mg de tejido. La secreción promedio de PRL por efecto de TRH fue de $177,1 \pm 49$ ng ($p < 0,05$) y $186,3 \pm 57$ ng ($p < 0,05$) y $197,1 \pm 47$ ng ($p < 0,01$) con 0,3; 1,5 y 3×10^{-8} M respectivamente (Figura 2).

Heterogeneidad molecular de PRL decidual

La heterogeneidad molecular de PRL secretada por el tejido corion-decidual se muestra en la Figura 3. Se observan tres formas moleculares de PRL secretada por el tejido corion-decidual, la forma big-big, big y little. El perfil de la heterogeneidad molecular de PRL decidual es similar a la heterogeneidad molecular de PRL encontrado en plasma después de ser cromatografiado en Sephadex G-100 (19, 20, 21). Las proporciones de las diferentes formas moleculares de PRL decidual fueron: $8,7 \pm 2,2\%$ de big-big, $5,9 \pm 1,1\%$ de big y $84,1 \pm 2,0\%$ de little. Aunque TRH no cambió la distribución de las diferentes formas moleculares de PRL decidual encontrada en los controles (tejidos corion-decidual incubados sin TRH) como se observa en la Figura 3, sin embargo, TRH produce un aumento evidente en la cantidad total de PRL secretada por el tejido corion-decidual, principalmente debido a un incremento de la fracción de PRL little.

El incremento de PRL little por TRH fue estadísticamente significativo, determinado por el área total bajo la curva de PRL obtenida de los eluidos de la columna, como se observa en la Figura 4, encon-

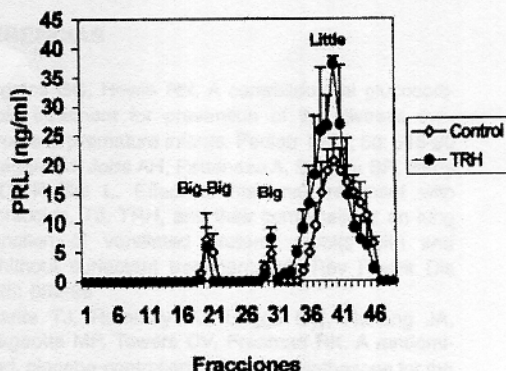


Figura 3. Heterogeneidad molecular de PRL decidual. Los explantes de corion-decidual fueron incubados por 24 horas sin TRH y con $1,5 \times 10^{-8}$ M de TRH (dosis que produce la máxima secreción de PRL). A los medios de cultivos se les realizó una cromatografía en columna de Sephadex G-100. Los resultados fueron expresados como ng/ml de PRL (Promedio \pm ESM de cuatro experimentos) de cada una de las fracciones eluidas, donde se observan las formas big-big, big y little de PRL decidual.

trándose un aumento significativo ($p < 0,05$) en la concentración de PRL little por efecto de TRH (238 ± 16 ng/ml) con respecto a la concentración de PRL little en los controles ($128 \pm 28,4$ ng/ml).

DISCUSION

En este trabajo hemos encontrado que TRH en las condiciones y concentraciones usadas es efectivo en aumentar la secreción de PRL en explantes de tejido corion-decidual. Debido a que TRH en concentraciones fisiológicas aumenta la secreción de PRL decidual, sugeriría que este efecto podría

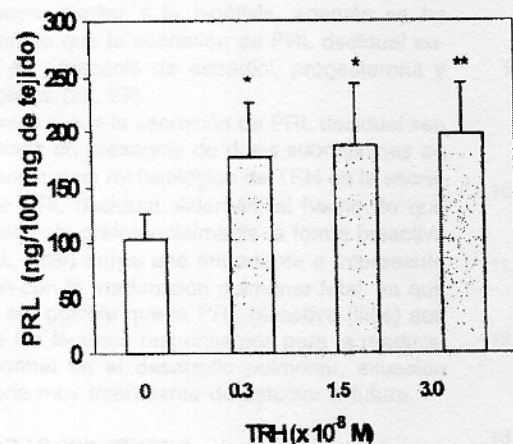


Figura 2. Efecto de TRH en la secreción de PRL del tejido corion-decidual. Los resultados son expresados como ng de PRL secretada por 100 mg de tejido (Promedio \pm ESM) de 6 experimentos. El control representa las incubaciones del tejido sin TRH (*) = ($p < 0,05$).

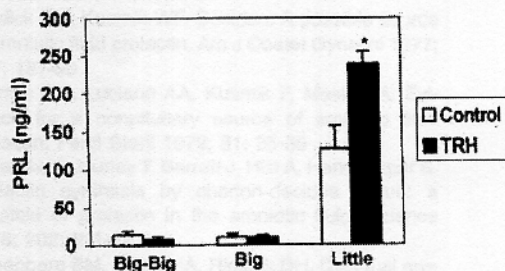


Figura 4. La concentración de cada una de las formas moleculares de PRL decidual secretada durante las 24 horas de incubación sin TRH (control) y con $1,5 \times 10^{-8}$ M de TRH. Los resultados fueron expresados como ng/ml de PRL (Promedio \pm ESM) de 4 experimentos (*) = ($p < 0,05$).

tener una importancia fisiológica relevante durante la maduración pulmonar.

Se ha reportado que TRH no estimula la secreción de PRL del tejido decidual (22, 23), pero estos estudios fueron realizados con explantes de tejido decidual incubados por solo cuatro horas. En nuestro estudio, el efecto de TRH en la secreción de PRL del tejido corion-decidual se encontró en explantes incubados por 24 horas, período de máxima secreción basal de PRL en tejido corion-decidual.

Una participación fisiológica de la PRL producida por el tejido corion-decidual en la inducción de la madurez pulmonar es apoyada por varias observaciones que incluyen: a) los niveles de PRL en el líquido amniótico son máximos a las 24 semanas de gestación, previo al comienzo de la producción de surfactante pulmonar por los neumocitos de tipo II en el pulmón fetal (13, 16, 17). b) La PRL producida por el tejido decidual alcanza fácilmente el fluido traqueobronquial (16), c) los fetos tragan e ingieren hasta 500 ml/día de líquido amniótico, y su tracto gastrointestinal puede transportar proteínas intactas (24, 25), presumiblemente, la PRL del líquido amniótico podría llegar a la circulación fetal vía esta ruta y así regular funciones del feto; d) bajos niveles de PRL sérica fetal han sido asociadas con un incremento del riesgo del RDS (13, 16, 18); e) PRL aumenta la síntesis de componentes del surfactante (6, 14, 18), y f) los receptores de PRL han sido identificados en tejido de pulmón de mono (15).

Los resultados de este trabajo demuestran que el tejido decidual responde a TRH secretando PRL de manera similar a la hipófisis, además se ha demostrado que la secreción de PRL decidual aumenta en presencia de estradiol, progesterona y andrógenos (26, 27).

Debido a que la secreción de PRL decidual sea potenciada en presencia de dosis submáximas de TRH, sugiere un rol fisiológico de TRH en la secreción de PRL decidual. Además, el hecho de que TRH estimule preferencialmente la forma bioactiva de PRL (little) surge una importante e interesante relación con la maduración pulmonar fetal, ya que podría ser posible que la PRL bioactiva (little) sea uno de los factores responsables para la maduración normal en el desarrollo pulmonar, situación que sería muy interesante de estudiar a futuro.

AGRADECIMIENTOS: Los autores desean agradecer al Profesor Dr. Víctor Ramírez y al Dr. Sergio Ojeda por la revisión crítica del manuscrito.

Este trabajo fue financiado por un proyecto del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y por Farmanuclear S.A.

REFERENCIAS

1. Liggins GC, Howie RN. A controlled trial glucocorticoid treatment for prevention of the distress syndrome in premature infants. *Pediatr* 1972; 50: 515-20
2. Ikegami M, Jobe AH, Pettenazo A, Seidner SR, Berry DD, Ruffini L. Effect of maternal treatment with corticoids, T3, TRH, and their combinations on lung function of ventilated preterm rabbits with and without surfactant treatment. *Am Rev Respir Dis* 1986; 133: 892-98
3. Garite TJ, Rummey PJ, Briggs GG, Harding JA, Nageotte MP, Towers CV, Freeman RK. A randomized, placebo-controlled trial of betamethasone for the prevention of respiratory distress syndrome at 24 to 28 weeks gestation. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 646-51
4. Devaskar U, Nitta K, Szewczyk K, Sadiq F, De Mello D. Transplacental stimulation of functional and morphologic fetal rabbit lung maturation: Effect of thyrotropin-releasing hormone. *Am J Obstet Gynecol* 1987; 157: 460-64
5. ACTOBAT Study Group 1995 Australian collaborative trial of antenatal thyrotropin-releasing hormone (ACTOBAT) for prevention of neonatal respiratory disease. *Lancet* 1995; 345: 877-82
6. Mendelson CR, Johnston JM, MacDonald PC, Snyder JM. Multihormonal regulation of surfactant synthesis by human fetal lung in vitro. *J Clin Endocrinol Metabol* 1981; 53: 307-17
7. Umans JG, Umans HR, Szeto HH. Effect of thyrotropin-releasing hormone in the fetal lamb. *Am J Obstet Gynecol* 1986; 155: 1266-71
8. Moya F, Mena P, Foradori A, Becerra M, Insunsa A, Gormain A. Effect of maternal administration of thyrotropin-releasing hormone on the preterm fetal pituitary-thyroid axis. *J Pediatr* 1991; 119: 966-71
9. Moraga FA, Riquelme RA, López A, Moya F, Llanos AJ. Maternal administration of glucocorticoid and thyrotropin-releasing hormone enhances fetal lung maturation in disturbed preterm lambs. *Am J Obstet Gynecol* 1994; 171: 729-34
10. Riddick DH, Kusnik WF. Decidua: A possible source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 1977; 127: 187-90
11. Riddick DH, Luciano AA, Kusnik F, Maslar IA. Evidence for a nonpituitary source of amniotic fluid prolactin. *Fertil Steril* 1979; 31: 35-39
12. Golander A, Hurley T, Barrett J, Hizi A, Handwerger S. Prolactin synthesis by chorion-decidual tissue: a possible of prolactin in the amniotic fluid. *Science* 1978; 202: 311-12
13. Rosenberg SM, Maslar IA, Riddick DH. Decidual production of prolactin in late gestation further evidence for a decidual source of amniotic fluid prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 1980; 136: 681-84
14. Hamosh M, Hamosh P. The effect of prolactin on the lecithin content of fetal rabbit lung. *J Clin Invest* 1977; 59: 1002-06

15. Josimovich JB, Merisko K, Boccella L, Tobon H. Binding of prolactin by fetal rhesus cell membrane fractions. *Endocrinology* 1977; 100: 557-61
16. Hauth JC, Parker CR, MacDonald PC, Porter JC, Johnston JM. A role of fetal prolactin in lung maturation. *Obstet Gynecol* 1978; 51: 81-85
17. Johnson JWC, Tyson JE, Mitzner W, Beck JC, Andreassen BB, London WT, Villar J. Amniotic fluid prolactin and fetal lung maturation. *Am J Obstet Gynecol* 1985; 153: 372-80
18. Pansini F, Bergamini CM, Bagni B, Luciano M, Condemi L, Bonaccorsi G, Vesce F. Studies on amniotic prolactin: chromatographic pattern and correlation with the lecithin content. *Gynecol Obstet Invest* 1989; 27: 126-29
19. Andino N, Bidot C, Valdés M, Machado AJ. Chromatographic pattern of circulating prolactin in ovulatory hyperprolactinemia. *Fertil Steril* 1985; 44: 600-03
20. Escorza F, Del Real O. Further evidence that big-big prolactin is preferentially secreted in women with hyperprolactinemia and normal ovarian function. *Fertil Steril* 1985; 44: 25-29
21. Romero C, León J, Jara R, González O. Importancia de las isoformas de prolactina sobre la función ovárica en mujeres hiperprolactinémicas. *REV CHIL OBSTET GINECOL* 1993; 58(6): 465-69
22. Golander A, Barrett J, Hurley T, Barry S, Handwerker S. Failure of bromocriptine, dopamine and thyrotropin-releasing hormone to affect prolactin secretion by human decidua tissue in vitro. *J Clin Endocrinol Metabol* 1979; 49: 787-89
23. Lee DW, Markoff E. Synthesis and release of glycosylated prolactin by human decidua in vitro. *J Clin Endocrinol Metabol* 1986; 62: 990-94
24. Abramovich DR, Garden A, Jandlal L, Page KR. Fetal swallowing and voiding in relation to hydramnios. *Obstet Gynecol* 1979; 54: 15-20
25. Wintour EM. Amniotic fluid: our first environment. *News Physiol Sci* 1986; 1: 95-7
26. Daly DC, Maslar IA, Riddick DH. Term decidua response to estradiol and progesterone. *Am J Obstet Gynecol* 1983; 145: 679-82
27. Narukana S, Kanzaki H, Inoue T, Imai K, Higuchi T, Hatayama H, Kariya M, Mori T. Androgens induce prolactin production by human endometrial stromal cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metabol* 1994; 78: 165-68

DISCUSION

Dra. C. Romero: Comenta que es importante hacer estos trabajos de tipo básicos en tejidos humanos y es factible que tengamos que dejar abierta la oportunidad para buscar otra alternativa de poder acelerar la maduración pulmonar fetal, específicamente en aquellos casos de contraindicaciones de la terapia con betametazona. Ahora queda mucho por responder, primero habría que hacer estudios básicos y ver prolactina bioactiva en pulmón de animales de experimentación y su capacidad de aumentar surfactante y también TRH. Ver con los avances tecnológicos si la prolactina little sintética se puede utilizar en aquellos embarazos que requieren adelantar la madurez pulmonar fetal.

Dra. M. Ruiz: Agradece y felicita a la Dra. Romero por la presentación.