

## PADRONISATION BIOLOGIQUE DE LA PROLACTINE

PAR

JOSÉ R. VALLE

Suivant les instructions de l'Organisation d'Hygiène de la Société des Nations (1) et disposant de l'étalon international de la Prolactine envoyé au professeur Thales Martins par le professeur A. S. Parkes, de Londres, nous avons eu l'opportunité d'essayer sur nos pigeons l'activité de cette hormone préhypophysaire. Cette standardisation doit être faite, chez nous, avec un soin particulier, car nous ne possédons pas, actuellement, des pigeons sélectionnés et même, à une certaine époque, nous n'avons pu disposer de quelques animaux d'âge connu. En plus de ces inconvénients il faut remarquer que nos pigeons domestiques, en général, vivent dans des conditions physiques peu satisfaisantes; il suffit de dire que près de 80%, de ceux que nous avons eu, étaient infectés naturellement par *Hemoproteus columbae*.

L'un des premiers soins pour la vérification de l'activité de l'hormone lactogénique préhypophysaire est l'emploi de pigeons adultes, des deux sexes, et hors de la période d'incubation, puisque la méthode se base sur l'augmentation du poids des bourses latérales du jabot. Cette nécessité exige l'isolement préalable, au moins durant un mois, ou bien, l'examen des conditions des engluviés avant de commencer le traitement. A cause de la loi de la variation, surtout quand on emploie des animaux de groupes hétérogènes, comme dans le cas présent, il faut opérer sur le plus grand nombre possible de pigeons pour chaque dose essayée. Riddle (2) a démontré que la variation individuelle des réponses peut être de 1 à 6, même en faisant abstraction du facteur racial.

Dans ce travail, nous exposons minutieusement la méthode suivie dans notre Laboratoire et nous donnons les résultats obtenus avec l'étalon international. Pour des motifs indépendants de notre volonté nous n'avons pu employer que 4 ou 5 pigeons pour chaque dose étudiée. Les dosages ont été réalisés en plein été, avec la température moyenne ambiante de 28° C.

## MÉTHODE ET RÉSULTATS

### 1. Sélection des pigeons

Des pigeons adultes de 270 à 320 gr. de poids sont fistulés, suivant la technique décrite dans un travail antérieur (3) et, lorsque l'inspection des engluviés est négative, on les isole dans des cages individuelles. Dans le cas d'inspection positive, c'est-à-dire quand nous rencontrons épaissement, plissage ou sécrétion au niveau des bourses latérales du jabot, les pigeons sont rejetés temporairement. Quelquefois, l'inspection n'est pas suffisante pour décider s'il y a ou s'il n'y a pas de réaction positive, comme par exemple tout au début de la période d'incubation; alors, le frottis de la muqueuse, comme nous avons eu l'occasion de le décrire (4), sera la preuve décisive. Avec frottis positif l'animal est écarté. Cependant, lorsque l'inspection est négative mais le frottis révèle la présence d'une ou d'autre gouttelette de graisse colorée par le Sudan III, le pigeon peut être utilisé. Nous avons vérifié que, parfois, le frottis est positif, même durant l'isolement. Il est probable que cette "positivité", vue la sensibilité du test, dépend de l'équilibre entre les gonades et l'hypophyse. Dans le cas de l'isolement, il y aurait baisse des hormones sexuelles et décharge conséquente de prolactine, influant sur les propres engluviés. Dans un travail récent, Morató Manaro (5) a démontré que la castration est accompagnée de frottis positifs. Il conviendra donc d'employer le pigeon dès qu'il est fistulé et choisi.

Y aurait-il avantage à n'employer que les mâles, ou bien les femelles? Nous n'avons pas observé des différences, ni qualitatives, ni quantitatives, dans les réponses de pigeons à l'hormone lactogénique suivant le sexe. On agira de bon aloi, cependant, si on détermine le sexe des pigeons choisis et si on laisse de côté les femelles aux ovaires développés, surtout si on a présente à l'esprit l'action antagonique des oestrogènes sur la réponse à la prolactine (Folley et White) (6).

En résumé, la sélection des pigeons se fait par le poids (270-320 gr.) et par l'inspection négative des bourses latérales du jabot. Les femelles dont les ovaires pèsent plus d'un gramme ne doivent pas être employées.

### 2. Modus operandi

Les pigeons sélectionnés sont divisés en groupes de 3 à 5 et injectés, soit au muscle pectoral (essais préliminaires), soit sous la peau, au dos (étalon), avec la même dose quotidienne de prolactine: dans 0,5 cc. de véhicule aqueux

alcalin. On fait 4 injections (4 x 0,5 cc.) et les pigeons sont sacrifiés 24 heures après la dernière dose, c'est à dire 96 heures après le début du traitement. Chaque jour au moment de l'injection, on procède à l'inspection des engluviés et on prend note des observations: — négative, ± congestion, + congestion et épaissement, ++ épaissement et plissage, +++ épaissement, plissage et sécrétion (crop-milk). En principe, avec l'emploi de préparations actives, on fait le frottis seulement 24 et 48 heures après le début de l'expérience. Il est clair qu'on peut dispenser le frottis lorsque l'inspection est positive.

À l'autopsie on pèse les thyroïdes, les gonades et les bourses latérales du jabot, libérées de la graisse dorsale et des sécrétions. Le poids moyen de chacun de ces éléments est compté avec le poids moyen final des pigeons du groupe respectif. En somme, toutes les valeurs rencontrées sont calculées pour des pigeons de 300 gr. poids corporel, que nous avons adopté comme base pour la facilité des comparaisons.

### 3. Poids normal des engluviés

Pour mesurer les effets d'une préparation donnée de Prolactine, par la méthode de la pesée des bourses latérales du jabot, il est nécessaire avant tout d'en obtenir la valeur moyenne normale et ses variations extrêmes. Au cours de nos expériences nous avons pesé les engluviés de 26 pigeons fistulés normaux, 12 mâles et 14 femelles, et nous avons obtenu le poids moyen de 746 mgr. Dans les différents groupes la plus basse moyenne a été de 618 mgr. et la plus haute de 940 mgr. Comme valeur moyenne calculée pour les pigeons de 300 gr. de poids corporel nous pouvons admettre 820 mgr.. Une question doit être discutée ici. La canule d'ébonite appliquée à la paroi musculo-cutanée, sur la ligne moyenne du jabot, bien qu'elle ne provoque pas des réactions étendues, ne nuit-elle pas à la pesée des engluviés? Il y a toujours, il est vrai, un épaissement cicatriciel autour de la canule, mais, si ce n'est des cas rares, son extension est limitée et n'arrive pas jusqu'à la zone de réaction des bourses latérales. Lorsque la surface stimulée s'étend jusqu'aux bords de la blessure alors l'objection compte, mais cela n'arrive que rarement. Même pour les grandes doses, la surface de la muqueuse, qui s'épaissit extraordinairement, atteint à peine la zone de fixation de la canule. D'ailleurs, tous les pigeons étant dans des conditions expérimentales identiques, les résultats peuvent être comparables.

Riddle (2) donne comme poids normal des engluviés 250 mgr. pour 100 gr. de poids corporel, c'est à dire, la moyenne de 750 mgr. pour des pigeons de 300 gr. Ce nombre, peu inférieur au nôtre, signifie à peine que normalement nous avons pratiqué l'incision sur une surface plus étendue.

## 4. Essais préliminaires

Les essais préliminaires des effets de l'hormone lactogénique sur nos pigeons ont été faits principalement avec la préparation 7 Pr B, obtenue d'hypophyses bovines par la méthode de Bates et Riddle (7) et l'amicale collaboration du Dr. H. W. Rzeppa.

Avec cette préparation nous avons confirmé que l'emploi de la voie sous-cutanée est préférable à celui de la voie intramusculaire (Bates) (8). Le tableau No. 1 est élocidatif :

TABLEAU No. 1  
INFLUENCE DE LA VOIE D'ADMINISTRATION

Nombre de pigeons	Poids moyen à l'autopsie (gr.)	Préparation et dose	Voie d'administration	Poids moyen des engluviés (mgr.)	Poids moyen des thyroïdes (mgr.)	Unité pigeon par mgr. (*)
4	290	10 mgr. 7 PrB	intramusculaire	2525	26.5	3.0
3	276	»	sous-cutanée	3050	26.6	8.6
3	286	5 mgr. 7 PrB	intramusculaire	1556	22.0	1.3
3	276	»	sous-cutanée	2326	21.6	5.3

(\*) Calcul selon la table de Riddle (Sex and Int. Secret. 2.<sup>a</sup> ed. p. 1102).

L'essai de l'extrait initial 4 Pr a démontré l'importance du poids de l'ovaire dans la variation des réponses (Tableau No. 2). La même dose de 4 Pr, qui a augmenté 3 fois le poids des engluviés de mâle avec testicules développés, n'a pas modifié le poids des bourses latérales du jabot de la femelle avec ovaire grand et oviducte très hypertrophié.

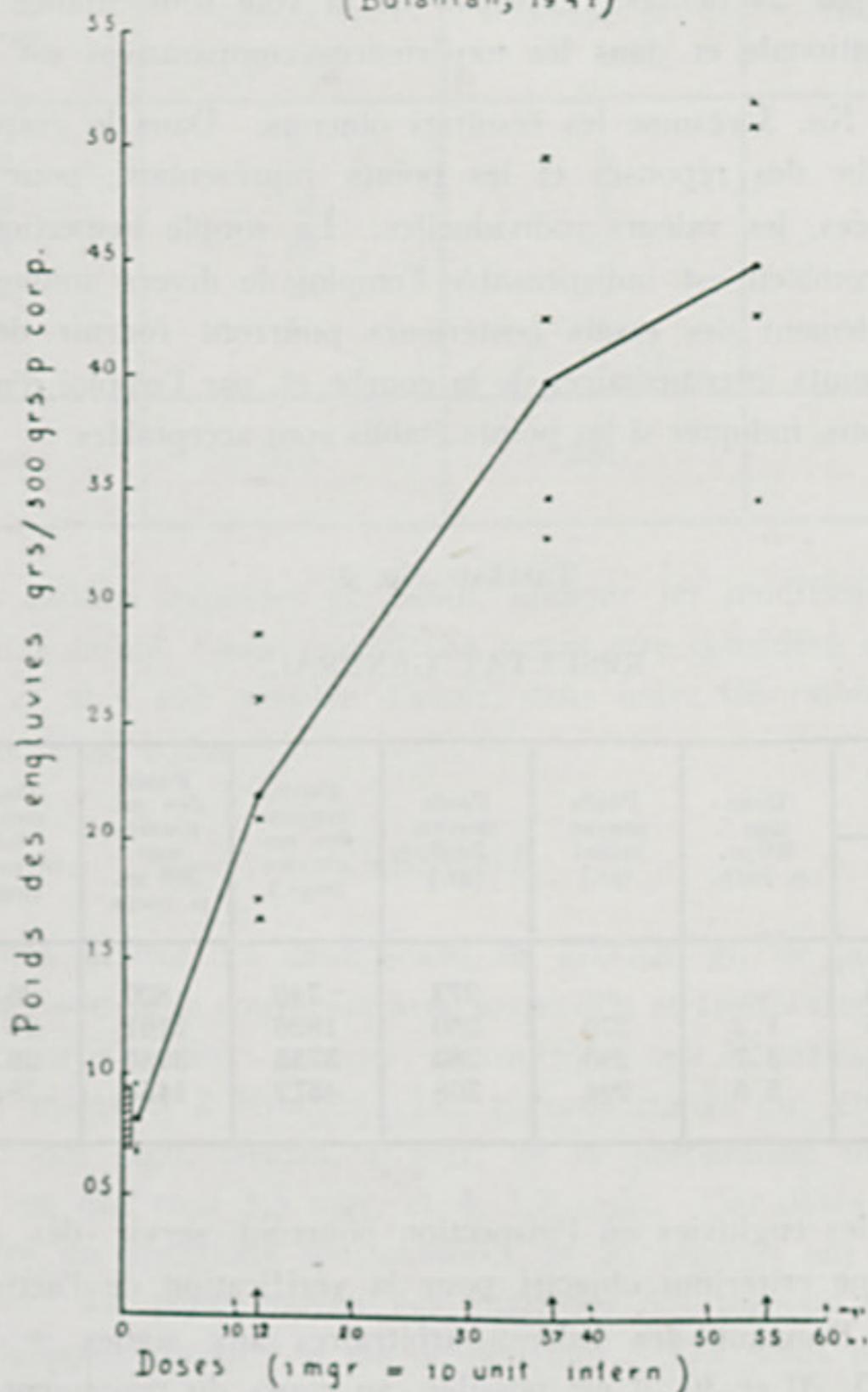
TABLEAU No. 2  
INFLUENCE DU DÉVELOPPEMENT GONADAL

Pigeons n.	Poids à l'autopsie (gr.)	Préparation et dose	Voie d'administration	Volume injecté	Poids des engluviés (mgr.)	Poids des gonades (mgr.)
70	285	4 Pr 50 mgr.	intramusculaire	4x05cc.	650!	Ovaire 2830
99	320	»	»	»	2350	Testicule 2850
84	310	»	»	»	1950	Testicule 3700

5. Essai de la prolactine internationale

Nous avons utilisé les comprimés de 10 mgr. = 100 u. i. venus en tubes fermés et conservés depuis la fin de 1938 dans leur emballage original à la

Courbe des réponses des engluviés des pigeons adultes à l'étalon international de Prolactine (Butantan, 1941)



Notes - Les signaux (x) représentent les valeurs individuelles pour chacune des doses employées et  $\bar{x}$  sont les variations extrêmes du poids des engluviés des pigeons témoins

température de 3 à 6°. Nous avons fait 3 solutions dans de l'eau distillée, plus NaOH à 3% jusqu'à dissolution de telle manière que, après les corrections de

volume, la solution A contenait 5 u. i., la solution B 12,5 et la solution C 28,5 u. i. par cc. Le dosage ayant été calculé pour des pigeons de 300 gr., les 5 animaux du premier groupe reçurent chacun 12 u. i.; les 4 du second groupe 37 u. i. et finalement les 4 pigeons du troisième groupe 55 u. i.

Les 4 injections furent sous-cutanées, au dos, au volume de 0,5 cc. chacune, espacées par 24 heures. L'emploi de la voie sous-cutanée pour la préparation internationale et dans les expériences comparatives est obligatoire.

Le tableau No. 3 résume les résultats obtenus. Dans le graphique 1 nous voyons la courbe des réponses et les points représentant, pour chacune des doses mentionnées, les valeurs individuelles. La simple inspection du graphique démontre combien est indispensable l'emploi de divers animaux pour chaque dose. Seulement des essais postérieurs pourront fournir des éclaircissements sur les points intermédiaires de la courbe et, par l'emploi d'un plus grand nombre de pigeons, indiquer si les points établis sont acceptables.

TABLEAU No. 3

## RÉSULTAT GÉNÉRAL

Groupes	Nombre de pigeons			Dose mgr./ 300 gr. p. corp.	Poids moyen initial (gr.)	Poids moyen final (gr.)	Poids moyen des engluviés (mgr.)	Poids des engluviés mgr. 300 gr. p. corps.	Poids moyen des thyroïdes (mgr.)	Poids des thyroïdes mgr. 300 gr. p. corps.
	♂	♀	Total							
K	12	14	26	—	—	273	746	820	26.0	28.6
A	3	2	5	1.2	270	250	1826	2191	26.4	24.1
B	4	—	4	3.7	280	283	3755	3980	26.5	28.1
C	4	—	4	5.5	294	308	4572	4453	28.2	27.1

Le frottis des engluviés ou l'inspection pourront servir dès le début du traitement comme critérium objectif pour la vérification de l'activité des préparés injectés. Donnant des valeurs arbitraires aux signes  $\pm$ , +, ++ e +++, de 5, 10, 20 et 30, il est possible, au cours du traitement, de se faire peu à peu une idée de l'activité de la préparation en étude. Dans le tableau No. 4 nous voyons non seulement la coïncidence des valeurs proportionnelles aux doses, mais aussi la précocité de la réaction. Avec l'emploi de 12 u. i., à la fin de 48 heures l'inspection est pratiquement négative (10), et fortement positive (100) avec la dose de 55 u. i. Ce procédé, naturellement, fait place à une analyse plus minutieuse de l'activité des préparations employées.

TABLEAU No. 4

VALEURS ARBITRAIRES DONNÉES À L'INSPECTION DES ENGLUVIES DE 4 PIGEONS DE CHAQUE GROUPE DURANT LE TRAITEMENT AVEC L'ÉTALON INTERNATIONAL.

Heures	Groupe A 12 u.i	Groupe B 37 u.i	Groupe C 55 u.i
0	0	0	0
24	0	5	35
48	10	45	100
72	40	70	100
96	55	110	140
Total	105	230	375

Pour les raisons exposées au début, quoique les modifications proposées soient de grande utilité, l'essai quantitatif devra être considéré comme préliminaire jusqu'à ce qu'il soit possible d'avoir, dans notre laboratoire, des pigeons sélectionnés et d'âge connu.

### RÉSUMÉ

Des pigeons adultes des deux sexes, de 270-320 gr. de poids, fistulés en dehors de la période de la couvaison avec inspection et frottis négatifs des engluviés, ont été repartis en deux groupes: 26 contrôles, soit 12 mâles et 14 femelles; 13 traités, 11 mâles et 2 femelles. Les pigeons traités ont été subdivisés en 3 groupes: 5 ont reçu, chacun, 1 mgr. de la préparation internationale de Prolactine; 4 en ont reçu 3,5 mgr. et 4, 5,7 mgr.. Ces doses ont été réparties en 4 jours, en injections sous-cutanées, et les pigeons ont été sacrifiés le cinquième jour. Le poids moyen des engluviés des pigeons témoins, calculé par 300 gr. de poids corporel, a été de 820 mgr.. Les poids moyens dans les mêmes conditions des pigeons injectés ont été respectivement pour les doses de 12, 37 et 55 u. i.: 2191, 3980 et 4453 mgr.. Avec ces valeurs on a élaboré la courbe des réponses.

Quoique les modifications proposées soient de grande utilité, le présent essai de la préparation internationale de Prolactine sur nos pigeons devra être considéré comme préliminaire jusqu'à ce que l'emploi de pigeons sélectionnés, d'âge connu et en plus grand nombre pour chaque dose soit possible.

## RESUMO

Foi examinada a sensibilidade dos nossos pombos domésticos à preparação internacional de Prolactina fornecida pelo *National Institute for Medical Research*, Hampstead, Londres. Pombos adultos dos dois sexos, pesando de 270-320 gs., fistulados e fora do período do chôco, foram repartidos em dois grupos: 26 testemunhas, 12 machos e 14 fêmeas e 13 tratados: 11 machos e 2 fêmeas. Dos pombos tratados 5 receberam 1 mg. da preparação internacional do hormônio lactogênio pré-hipofisário; 4 receberam 3,5 mgs. e 5 receberam 5,7 mgs.. As doses foram distribuídas em 4 dias, uma injeção subcutânea diária, e os animais sacrificados no 5.º dia para a pesada das bolsas laterais do papo. Nas condições normais, isto é, nos pombos testemunhas, o peso médio das engluvias, calculado para 300 gs. de peso corporal foi de 820 mgs.. Os pesos médios das engluvias dos pombos injetados foram respectivamente para as doses de 12,37 e 55 unidades internacionais de 2191, 3980 e 4453 mgs.. Com os valores mencionados foi elaborada a curva das respostas.

Si bem que nos pareçam vantajosas as modificações propostas para a realização da prova quantitativa da Prolactina, os resultados referidos inclusive os da inspeção direta das bolsas laterais através da fístula do papo, devem ser tidos como provisórios até ser possível, entre nós, o emprêgo de pombos selecionados, de idade conhecida e em maior número para cada dose.

## RÉFÉRENCES

1. Bull. de l'Org. d'Hyg. Soc. des Nations 7:962.1938.
2. Riddle, O. — The preparation assay and actions of lactogenic hormone — Sex and Internal Secretions, Baltimore, 1939, 2e. édition, cap. XX, pp. 1088-1118.
3. Valle, J. R. — Sur l'utilisation du pigeon comme animal test d'une hormone préhypophysaire — C. R. Soc. Biol. 125:687.1937.
4. Valle, J. R. — Test de la prolactine basé sur le frottis de la muqueuse du jabot — C. R. Soc. Biol. 126:134.1937.
5. Morató Manaro, J. — Investigaciones sobre prolactin. Modificaciones al test de la paloma — Arch. de la Clin. e Instit. Endocrinologia I, 1:549-555.1940.
6. Folley, S. J. & White, P. — Response of the pigeon crop-gland to prolactin. Inhibition by oestradiol monobenzoate — Nature 140:505.1937.
7. Bates, R. W. & Riddle, O. — The preparation of Prolactin — J. Pharm. a. Exper. Therap. 55:365.1935.
8. Bates, R. W. — Methods for the assay of Prolactin — Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol. 5:191.1937.

NOTA: Este trabalho já estava sendo impresso quando tivemos conhecimento dos resultados obtidos com o padrão internacional de Prolactina por W. R. Lyons (Endocr. 28:161.1941) e J. Meites, A. J. Bergman e C. W. Turner (Endocr. 28:707.1941).

(Trabalho da Secção de Endocrinologia do Instituto Butantan. Entregue em maio de 1941. Dado à publicidade em janeiro de 1942.)