

# ACCIÓ DEL FOTOPERÍODE SOBRE EL CONTINGUT DE LES CÈL·LULES PRODUCTORES DE PROLACTINA DE LÍPIDS HEPÀTICS I SOBRE L'ACTIVITAT EN UN OSTEÒICTI EURIHALI \*

per  
MANUEL CARRILLO i SÍLVIA ZANUY \*\*

Institut d'Investigacions Pesqueres, Passeig Nacional, s/n., Barcelona

## INTRODUCCIÓ

Les cèl·lules productores de prolactina ocupen la major part de la *Pars Distalis* Rostral (P.D.R.) de la glàndula hipòfisi dels teleostis. Es tenyeixen de vermell amb l'eritrosina de tetracrom de Herlant i del Cleveland-Wolf, i executen una important funció en l'osmoregulació dels peixos<sup>13</sup>. Això no obstant, l'hormona de prolactina és una de les més versàtils pel fet que són molts els seus efectes sobre els vertebrats (vegeu NICOLL, 1974). Fa deu anys<sup>3</sup> es descrigueren al voltant de cent tipus d'activitats distintes d'aquesta hormona, i des de llavors se n'han afegit moltes més. Algunes d'aquestes activitats són, per exemple, la pèrdua o el guany de greixos, l'activitat locomotora, l'efecte antigonadotrop, la inhibició de la metafase, la migració de la sargantana cap a l'aigua, la secreció del pap dels coloms, etc. Totes aquestes accions presenten distints components temporals<sup>28, 29</sup>.

Una de les evidències més feaents de l'existència de ritmes endocrins circadians en els teleostis ha estat l'observació de variacions circadianes de la resposta de greixatge pel tractament exogen amb prolactina en diverses espècies<sup>11, 15, 24, 26, 27, 28, 29, 30</sup>. Més específicament, injeccions administrades en les primeres hores del fotoperíode induïren catabolisme lipídic. En canvi injeccions administrades unes quantes hores després, estimularen l'acumulació de greixos.

\* Treball realitzat en el Oceanic Institute (Hawaii, USA), amb l'ajuda d'una beca de la *Comisión de Intercambio Cultural entre España y los Estados Unidos de América* i una «grant» de la *Noyes Foundation*.

\*\* Adreça actual: Institut d'Aqüicultura de Torre de la Sal, Ribera de Cabanes, Plana Alta (País Valencià).

Actualment, existeixen algunes evidències que indiquen que tant en el plasma com en la glàndula hipofisària, les hormones adenohipofisàries varien amb periodicitat circadiana. S'han descrit ritmes diaris de la secreció de prolactina en l'hàmmster<sup>16</sup>, rates<sup>4, 7, 12, 17, 31</sup> i en l'home (SASSIN *et al.*, 1973). De manera general, en les espècies esmentades, les concentracions hipofisàries de l'hormona foren més altes de nit que de dia.

En els teleostis s'han descrit ritmes diaris de la concentració plasmàtica de prolactina: en el peix daurat *Carassius auratus*<sup>22</sup>, en el salmó *Oncorhynchus nerka*<sup>23</sup> i en la llisa *Mugil cephalus*<sup>34</sup>. Mitjançant bioassaig fou descoberta l'existència d'un cicle circadià del contingut de prolactina hipofisària en *Fundulus similis*<sup>11, 33</sup>. No fa encara gaire, BATTEN & BALL<sup>1</sup> han observat canvis circadians en l'activitat de les cèl·lules de prolactina de la hipòfisi de *Poecilia latipinna* mantinguda en aigua dolça.

El treball present analitza les variacions circadianes de les cèl·lules de prolactina en peixos que foren sotmesos a diferents règims de fotoperíode. També es descriuen les variacions diàries dels lípids totals hepàtics.

## MÈTODES

### a) Peixos

Els exemplars de *Tilapia mossambica* foren capturats en els estanys d'Haleiva i en els canals de Hawaii-Kai, a l'illa de Oahu (Hawaii, USA) a principis del mes de maig de 1976. Durant dues setmanes, els peixos foren mantinguts en grans dipòsits de PVC (1,5 m<sup>3</sup>) dotats d'aigua dolça en circuit obert, amb abundant airejament i sotmesos a un fotoperíode de 12 HL/12 HF. Després foren dividits en dos grans grups: l'un exposat a fotoperíodes llargs (15 HL/9 HF) i l'altre a fotoperíodes curts (9 HL/15 HF); durant un mes. La temperatura al llarg de tot l'experiment fou de 22-23°C. Els peixos foren alimentats *ad libitum* amb pinso compost fabricat a l'O.I. Cada tres hores, i durant un període de 24, se sacrificaren sis peixos per seccionament de l'espina dorsal. Se n'enregistrà el pes total (P) i la longitud total (L), per calcular l'índex de condició (IC). S'utilitzà la fórmula  $IC = P/L^3 \times 100$ , així com el pes de la gònada.

### b) Anàlisi

El fetge, extret immediatament, fou congelat amb nitrogen líquid; es pesà tot seguit i es col·locà en la solució cloroform-èter-metanol (1:1:1) a fi d'efectuar l'extracció dels lípids totals d'acord amb el mètode proposat per DE VLAMING *et al.*<sup>11</sup>

c) *Histologia*

Les glàndules hipofisàries foren fixades en el líquid de Halmi, incloses en parafina i seccionades a 4  $\mu$ . S'utilitzaren els mètodes habituals de tinció del TCH, CW, PAS, associat a l'Orange-G o a l'hematoxilina de plom<sup>6, 25</sup>. Es mesuraren els diàmetres més gran i més petit de 40 nuclis elegits a l'atzar en cinc dels sis animals de cada grup i es calculà la superfície nuclear (SN). Es considera que la secció nuclear s'aproxima a una el·lipse ( $SN = a/2xb/2x$ ). El nombre de nuclis per unitat de superfície o índex nuclear (IN), es calculà comptant el nombre de nuclis en 60 àrees (un camp = 666  $u^2$ ) seleccionades a l'atzar, de les quals es trobà el valor mitjà. Es tingueren molt en compte algunes característiques citològiques com granulació, nuclis picnòtics, etc.

d) *Estadística*

Els valors obtinguts es compararen entre si mitjançant les anàlisis de la variació i regressió linear i les mitjanes individuals mitjançant la t de STUDENT.

## RESULTATS

La Pars Distalis de la glàndula hipofisària de *T. mossambica*, es divideix en dues zones: la Rostral (PDR) i la Proximal (PDP). En aquesta darrera trobem tres tipus cel·lulars: les cèl·lules secretores d'ACTH, les de prolactina i unes cèl·lules de forma estrellada que no tenen funció secretora<sup>21</sup>. Les cèl·lules de prolactina omplen la major part de la PDR, el seu citoplasma conté nombroses granulacions eritrosinòfiles, especialment tractant-se d'animals mantinguts en aigua dolça i essent les úniques cèl·lules acidòfiles d'aquest lòbul.

En la figura 1 es poden apreciar els resultats obtinguts. Hom hi trobà un ritme circadià molt marcat de la superfície (SN) i de l'índex nuclear (IN) de les cèl·lules de prolactina en peixos adaptats a fotoperíodes llargs. La superfície nuclear dels peixos sacrificats a les 2.30 hores i a les 5.30 hores foren significativament diferents de la superfície nuclear registrada a les 20.30 hores ( $p < 0,01$ ,  $p < 0,001$ , respectivament). Una cosa semblant s'esdevingué amb els valors de l'índex nuclear. D'acord amb aquestes dades, la primera estimulació important s'esdevingué més tard, en la fase obscura, vuit hores després d'haver apagat els llums. Les cèl·lules de prolactina aparegueren hipertrofiades, amb un nuclèol prominent, cosa que suggeria una activitat secretora durant aquelles hores.



Immediatament després de l'encesa dels llums (a les 5.30 hores), les cèl·lules de prolactina també aparegueren estimulades. Després, fins i tot s'hi observaren nuclis pignòtics, cosa que indicava un esgotament funcional d'aquestes cèl·lules.

La figura 2 presenta els canvis diaris de l'IN i de la SN d'aquestes mateixes cèl·lules en peixos aclimatats a fotoperíodes curts. La SN assolí un màxim en els peixos sacrificats a la 1.30 hores. Aquest valor fou significativament diferent dels valors observats a les 19.30 ( $p < 0,05$ ). L'IN, en canvi, presentà diferències significatives a les 19.30 ( $p < 0,001$ ); 22.30 ( $p < 0,001$ ); 7.30 ( $p < 0,02$ ) i 16.30 ( $p < 0,02$ ). Una altra vegada, la primera estimulació important de les cèl·lules de prolactina es presentà vuit hores després d'apagar els llums (1.30 hores). Aquestes cèl·lules aparegueren menys granulades que en els animals sacrificats a les 16.30, 22.30, 13.30 i 16.30, cosa que suggeriria un possible alliberament de l'hormona a aquesta hora del dia.

A les 14.30 hores, les cèl·lules de prolactina encara apareixien estimulades; no així, en canvi a les 7.30. Una segona punta dels valors de la SN de les cèl·lules de prolactina es presentà a les 10.30, immediatament després de l'encesa dels llums. Aquest valor fou significativament més gran que en els peixos sacrificats a les 19.30 hores ( $p < 0,05$ ) i 22.30 ( $p < 0,05$ ); l'IN de la mateixa hora fou significativament diferent del dels exemplars sacrificats a les 7.30 hores ( $p < 0,01$ ); 16.30 ( $p < 0,05$ ); 19.30 ( $p < 0,01$ ) i 22.30 ( $p < 0,01$ ).

Les figures 3 i 4 suggereixen una correlació positiva entre la SN de les cèl·lules de prolactina i els nivells de lípids totals en el fetge, en animals mantinguts tant en fotoperíodes curts com en llargs (coeficients de determinació  $r^2=0,60$ ;  $a_0=0,40$ ;  $a_1=0,03$ ;  $r^2=0,74$ ;  $a_0=0,23$ ;  $a_1=0,03$ , respectivament).

Si comparem els valors de la SN de les cèl·lules de prolactina tant en els animals aclimatats a fotoperíodes curts com a llargs, es pot observar que els valors més alts corresponen als peixos aclimatats a fotoperíodes llargs. Les anàlisis de la variació confirmen aquesta observació ( $F=29,07$ ;  $df_1=1$ ;  $df_2=66$ ).

La cosa contrària es confirma si comparem els lípids totals hepàtics en ambdós fotoperíodes (fig. 6) ( $F=26,8$ ;  $df_1=1$ ;  $df_2=82$ ). En la figura 7 es pot veure que els peixos mantinguts en fotoperíodes curts presenten valors més uniformes de l'índex de condició (IC) que els peixos mantinguts en fotoperíodes llargs ( $F=8,64$ ;  $df_1=1$ ;  $df_2=94$ ).

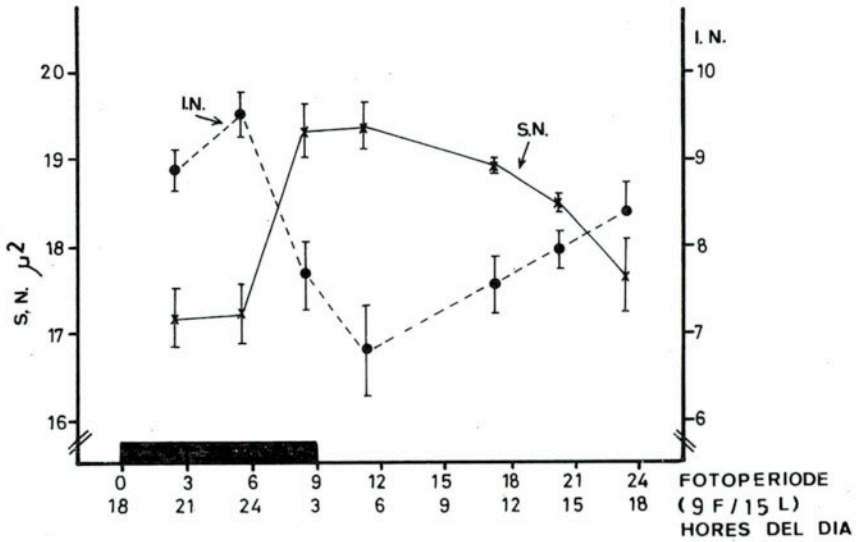


FIG. 1. — Variació diària de la superfície nuclear (SN) i de l'índex nuclear (IN) de les cèl·lules de *Tilapia mossambica*. Mostres agafades cada tres hores durant un període de 24 hores. Els peixos foren aclimatats a fotoperíode llarg (15 HL/90 HF). ATZ significa «Arbitrary Zeitgeber Time»; F és l'apagat dels llums i la barra horitzontal negra significa el període d'obscuritat.

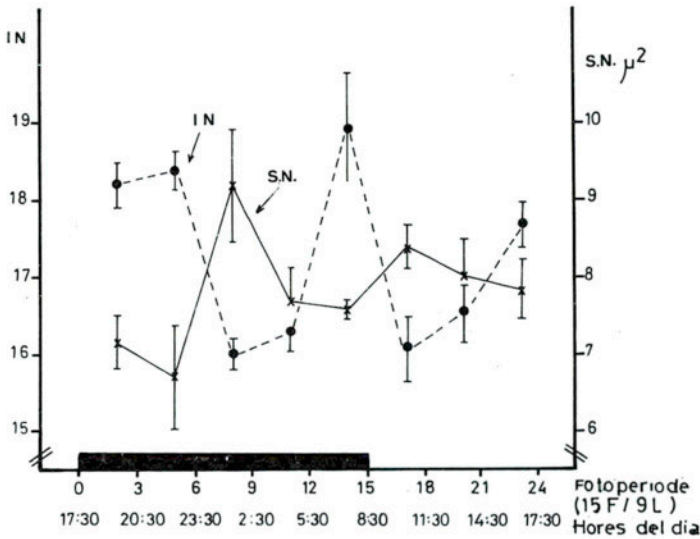


FIG. 2. — La mateixa llegenda que la figura anterior. Els animals s'aclimataren a fotoperíode curt (9 HL/15 HF).

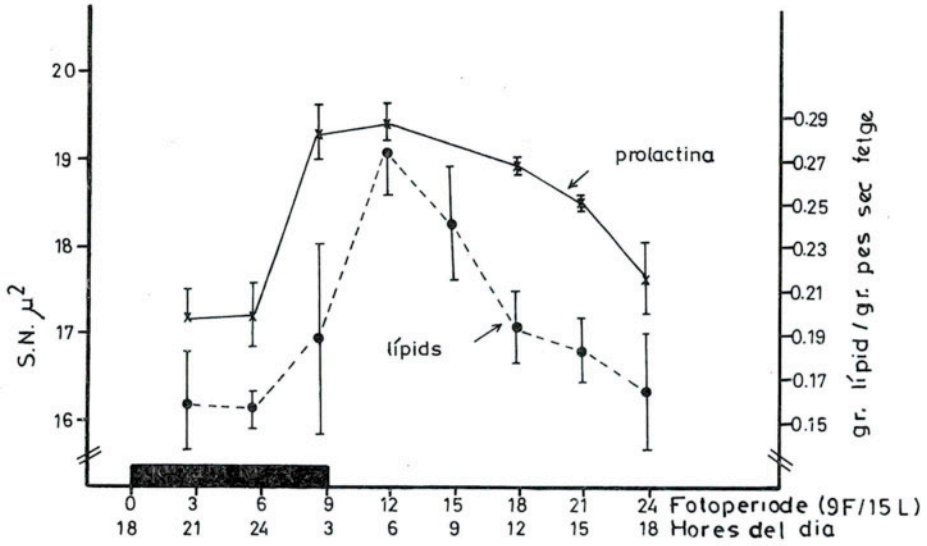


FIG. 3.— Variació dels lípids totals del fetge i de la superfície nuclear (SN) de les cèl·lules de prolactina de *Tilapia mossambica* aclimatada a fotoperíode llarg.

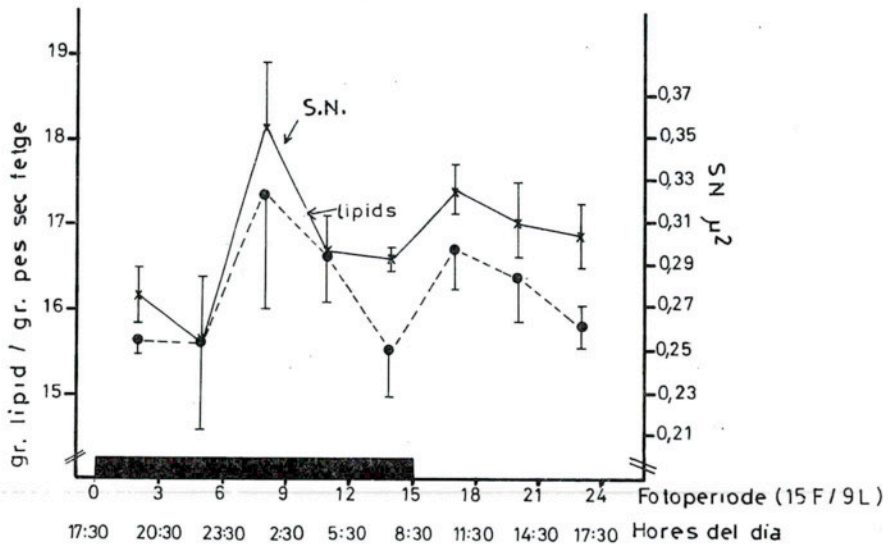


FIG. 4.— La mateixa llegenda de la fig. 3. Els peixos s'aclimataven a fotoperíode curt.

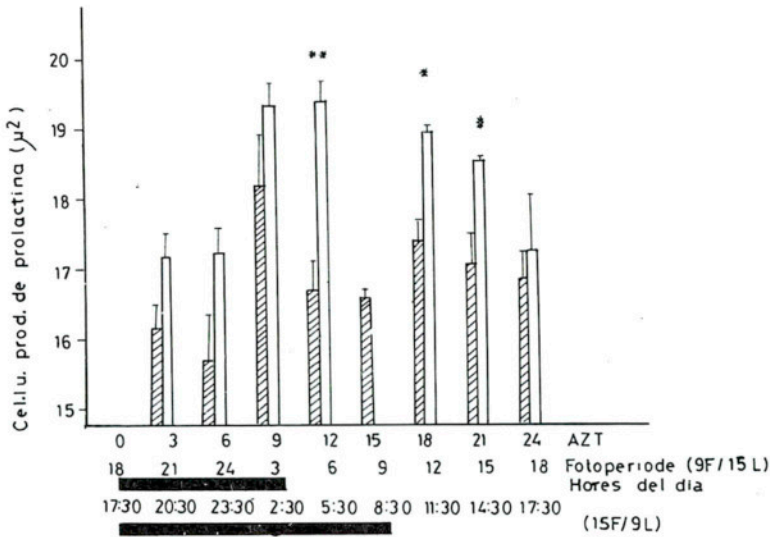


FIG. 5. — Efecte del fotoperíode llarg (barres blanques) i del fotoperíode curt (barres ratllades) sobre les cèl·lules de prolactina. Els histogrames representen la mitjana del canvi de la superfície nuclear d'aquestes cèl·lules. Les mitjanes expressen s' + l'error estàndard. N.S. diferència no significativa entre el fotoperíode curt i el llarg.

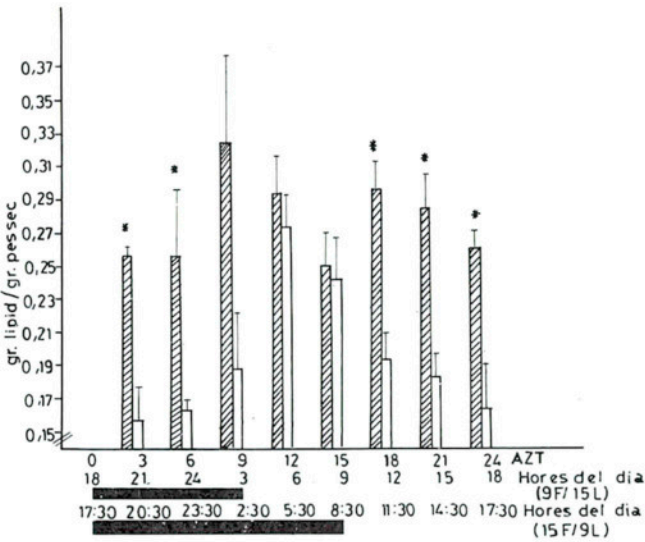


FIG. 6. — Efecte del fotoperíode llarg (barres blanques) i del fotoperíode curt (barres ratllades) sobre el contingut total de lípids hepàtics. La mateixa llegenda que a la figura anterior.

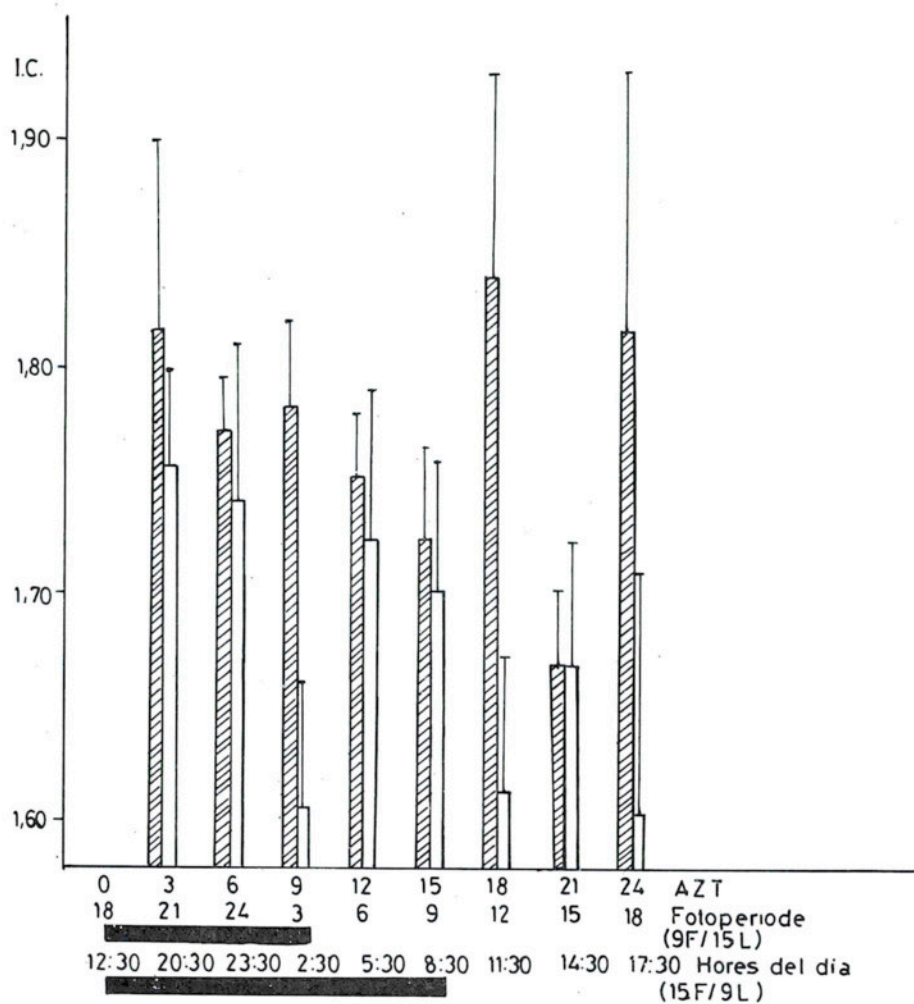


FIG. 7.— Efecte del fotoperíode llarg (barres blanques) i del fotoperíode curt (barres ratllades) sobre l'Índex de Condició de *Tilapia mossambica*. La mateixa llegenda que a la fig. 5.



## DISCUSSIÓ

Les diferències trobades en la SN i l'IN i en diversos aspectes citològics de les cèl·lules de prolactina al llarg del dia indiquen que en *T. mossambica* aclimatada a diferents fotoperíodes, existeixen ritmes circadians en l'activitat d'aquestes cèl·lules.

Sembla que el temps en què aquestes cèl·lules apareixen més actives és vuit hores després d'haver apagat el llum en ambdós fotoperíodes (15 HL/9 HF i 9 HL/15 HF) i immediatament després de mitja nit (1.30 i 2.30 hores, respectivament). La segona activació cel·lular coincideix immediatament després de l'encesa dels llums. En els animals mantinguts a fotoperíodes llargs fou pel matí, aviat, a les 5.30, i en els animals mantinguts a fotoperíodes curts fou cinc hores més tard (10.30).

Els valors més baixos de la SN de les cèl·lules de la prolactina s'observaren a les darreres hores de la fase lluminosa, però especialment en la primera meitat de la fase obscura d'ambdós fotoperíodes. Sembla, doncs, enraonat, creure que l'activitat de les cèl·lules de prolactina pot estar condicionada pel fotoperíode. L'apagament i l'encesa dels llums poden ser els principals sincronitzadors d'aquesta activitat cel·lular, sobretot l'apagament dels llums, ja que la principal activació de les cèl·lules de la prolactina sempre aparegué vuit hores després d'haver apagat els llums i sense que la longitud del fotoperíode no importés gens.

Aquests resultats coincideixen amb els trobats per LEATHERLAND *et al.* en *Oncorhynchus nerka*<sup>23</sup>, en el qual els valors més baixos de la prolactina plasmàtica es presentaren en les darreres hores de la fase lluminosa (11 L/13 F) i els més alts s'observaren en la segona meitat de la fase obscura (des de les 3 a les 6 hores). Els nostres resultats estan també en una concordança estreta amb els trobats en *Carassius auratus*, en el qual els nivells de prolactina plasmàtica presentaren puntes a les 9 i a les 24 hores<sup>22</sup>. L'activitat biològica de la prolactina hipofisària en *Fundulus similis* varià de manera significativa amb l'hora del dia i fou més alt durant la fase obscura. Descendí fins a un valor mínim cap a la meitat del període lluminós<sup>11</sup>. De manera similar la «irrupció» de prolactina en les rates és evident cap a la meitat o al final de la fase obscura<sup>11, 15, 24, 26, 27, 28, 29, 30</sup>. Així i tot s'ha trobat un ritme circadià diferent en les cèl·lules de prolactina de *Poecilia latipinna*. En aquesta espècie, el màxim de síntesi es registrarà des del migdia cap a la nit en animals pescats en aigua dolça<sup>1</sup>.

És conegut el fet que en els vertebrats superiors, el teixit adipós és el principal lloc d'emmagatzemament dels greixos, però, sobretot, en vertebrats inferiors, aquest emmagatzemament també té lloc en el fetge<sup>8, 14</sup>. Recentment, PARDO i DE VLAMING<sup>32</sup> han demostrat que el metabolisme dels lípids en el fetge de *Notemigonus crysoleucas* és influït per la prolactina

i que la seva resposta varia amb l'aclimatació dels peixos i amb l'hora del dia en què el fetge és extret i incubat. En *Tilapia*, la variació diària dels lípids hepàtics totals coincideix amb els canvis de l'activitat de les cèl·lules de prolactina en fotoperíodes curts i llargs, fet que suggereix algun tipus de control del metabolisme lipídic per la secreció hormonal de les cèl·lules esmentades. A més, les cèl·lules de prolactina dels animals adaptats a fotoperíodes llargs estigueren més estimulades que les dels animals subjectes a fotoperíodes curts, mentre que s'esdevingué el contrari en els nivells més alts que els exemplars subjectes a fotoperíodes llargs. En aquest experiment, el fotoperíode llarg pretenia simular les condicions de primavera-estiu, i el curt, la condició de tardor-hivern. MEIER i els seus col·laboradors<sup>15, 24, 26, 27, 28, 29, 30</sup> demostraren que la prolactina dels mamífers tenia un efecte molt marcat sobre la deposició dels lípids en *Fundulus grandis* i en *F. chrysotus*, amb una variació diària de la resposta a la citada hormona. DE VLAMING i SAGE<sup>10</sup> i DE VLAMING *et al.*<sup>11</sup> demostraren que el greixatge en *F. similis* és regulat pel fotoperíode, més específicament, els fotoperíodes curts afavoreixen l'acumulació dels lípids i els fotoperíodes llargs estimulen el seu buidament. Això està d'acord amb els resultats obtinguts en *Tilapia*. Probablement, la prolactina és implicada en els fenòmens de greixatge d'aquesta espècie com a resposta als canvis del fotoperíode.

Existeixen algunes evidències del fet que la secreció de prolactina varia de manera estacional i que, a més, és regulada per canvis del fotoperíode; un exemple clar n'és el de *Gasterosteus aculeatus*<sup>18, 19</sup>. En aquest peix migratori, les cèl·lules de prolactina es presenten mínimament actives a principis d'hivern (peixos capturats al mar) i molt actives durant la primavera (peixos capturats en aigua dolça)<sup>20</sup>. A més a més, BENJAMIN<sup>2</sup>, treballant amb la mateixa espècie mantinguda en aigua dolça, sense possibilitat que a l'hivern realitzés la migració al mar i subjecta als mateixos canvis estacionals del fotoperíode que aquells animals que duen a terme l'esmentada migració, demostrà que les cèl·lules de prolactina sintetitzaven i alliberaven una quantitat més gran de grànuls de secreció que a la primavera. Resultats similars foren obtinguts per CASSIFOUR i CHAMBOLE<sup>5</sup> en *Crenimugil labrosus* i *Mugil ramada*.

Finalment, en *Mugil cephalus*, les concentracions plasmàtiques de prolactina foren més elevades durant l'estiu que durant l'hivern<sup>34</sup>.

En resum, els canvis estacionals de les reserves greixoses corporals dels peixos són òbviament efectes acumulatius de la lipogènesi i la lipòlisi que es desenvolupen en un component diari.

El cronometratge de tots aquests canvis indicaria que els mecanismes d'aquests animals responen a unes claus o senyals ambientals, i en aquesta resposta hi ha implicats els mecanismes neuroendocrins. Les variacions



diàries de la lipogènesi també indicarien que les hormones lipogenètiques han de ser presents en grans quantitats a certes hores del dia o que les cèl·lules hepàtiques han de respondre amb una intensitat més gran en les hores dites o bé que ambdós mecanismes hi intervenen.

En *Tilapia mossambica*, la producció d'AMP-c pel teixit hepàtic és influenciada per la prolactina i varia amb l'hora del dia en què el teixit és extret i incubat (ZANUY i CARRILLO, en preparació).

En conseqüència, en *Tilapia mossambica*, sembla que tant la producció d'hormona com la resposta de certs òrgans varien amb periodicitat circadiana.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BATTEN, T. F. C. i BALL, J. N. — *Circadian changes in prolactin cell activity in the pituitary of teleost Poecilia latipinna in freshwater.* «Cell. Tiss. Res.», 165: 267-280 (1976).
2. BENJAMIN, M. — *Season changes in the prolactin cell of the pituitary gland of the freshwater stickleback, Gasterosteus aculeatus, form Leiurus.* «Cell. Tiss. Res.», 152: 93-102 (1974).
3. BERN, H. A. i NICOLL, C. S. — *The comparative endocrinology of prolactin.* «Recent Progr. Hormone Res.», 24: 681-720 (1968).
4. BUTCHER, R. L., FUGO, N. W. i COLLINS, W. E. — *Semi-circadian rhythm in plasma levels of prolactin during early gestation in the rat.* «Endocrinology», 90: 1125-1127 (1972).
5. CASSIFOUR, P. i CHAMBOLLE, P. — *Evolution des cellules prolactiniennes et corticotropes au cours de l'osmorégulation chez deux espèces de Mugilidae (Téléostéans marins).* «Gen. Comp. Endocrinol.», 30: 522-524 (1976).
6. CARRILLO, M. — *Histofisiologia de la glàndula hipòfisis de Spicara chryselis.* «C. V. Inv. Pesq.», 41 (2): 385-440 (1977).
7. CLARK, R. H. i BAKER, B. L. — *Circadian periodicity in the concentration of prolactin in the rat hypophysis.* «Science», 143: 375 (1964).
8. DESSAUER, H. C. — *Seasonal changes in the gross organ composition of the lizard, Anolis carolinensis.* «J. Exp. Zool.», 128: 1-12 (1955).
9. DE VLAMING, V. L. — *A diurnal rhythm in hormone effectiveness and in the pituitary content of prolactin in Fundulus similis.* «Rep. Biol. Med.», 31: 101 (1973).
10. DE VLAMING i SAGE, M. — *Diurnal variation in fattening to prolactin treatment in two cyprinodontid fishes, Cyprinodon variegatus and Fundulus similis.* «Contr. Mar. Sci. Univ. Texas», 16: 59-63 (1972).
11. DE VLAMING, SAGE, M. i TIEGS, R. — *A diurnal rhythm of pituitary prolactin activity with diurnal effects of mammalian and teleostaan prolactin on total body lipid deposition and liver lipid metabolism in teleost fishes.* «J. Fish. Biol.», 7: 717-726 (1975).
12. FREEMAN, M. E. i NEILL, J. D. — *The pattern of prolactin secretion during pseudopregnancy in the rat: a daily nocturnal surge.* «Endocrinology», 90: 29-33 (1972).
13. HOLMES, R. L. i BALL, J. N. — *The Pituitary Gland. A comparative account.* Cambridge, At the University Press (1974).
14. JONAS, R. E. E. i BILINSKI, E. — *Utilization of lipids by fish. III. Fatty acid oxidation by various tissues from sockeye salmon (Oncorhynchus nerka).* «J. Fish. Res. Bd. Canada», 21 (3): 653-656 (1964).

15. JOSEPH, M. M. i MEIER, A. H. — *Daily variations in the fattening response to prolactin in Fundulus grandis held on different photoperiods.* «J. Exp. Zool.», 178: 59-62 (1971).
16. KENT, G. C., Jr., TURNBULL, J. G. i KIRBY, A. C. — *A daily rhythm in prolactin inventing or release in hansters.* «Ass. Southeast. Biol. Bull.» 11: 48 (Abstr.) (1964).
17. KOCH, Y., CHOW, Y. F. i MEITES, J. — *Metabolic clearance and secretion rates of prolactin in the rat.* «Endocrinology», 89: 1301-1308 (1971).
18. LAM, T. J. i HOAR, W. S. — *Seasonal effects of prolactin on freshwater osmoregulation of the marine form (Trachurus) of the stickleback Gasterosteus aculeatus.* «Can. J. Zool.», 45: 509-516 (1967).
19. LAM, T. J. i LEATHERLAND, J. F. — *Effect of prolactin on freshwater survival of the marine form (Trachurus) of the threespine stickleback, Gasterosteus aculeatus, in the early winter.* «Gen Comp. Endoc.», 12: 385-394 (1969).
20. LEATHERLAND, J. F. — *Seasonal variations in the structure and ultrastructure of the pituitary of the marine form (Trachurus) of the threespine stickleback, Gasterosteus aculeatus L. I. Rostal pars distalis.* «Z. Zellforsch.», 104: 301-317 (1970).
21. LEATHERLAND, J. F., BALL, J. N. i HYDER, M. — *Structure and fine structure of the hypophyseal pars distalis in indigenous african species of the genus Tilapia.* «Cell. Tiss. Res.», 149: 245-246 (1974).
22. LEATHERLAND, J. F. i McKEOWN, B. A. — *Circadian rhythms in the plasma levels of prolactin in goldfish, Carassius auratus L.* «J. Inter. Cycle Res.», 4 (2): 137-143 (1973).
23. LEATHERLAND, J. F., McKEOWN, B. A. i JOHN, T. M. — *Circadian rhythm of plasma prolactin, growth hormone, glucose and free fatty acid in juvenile kokanee salmon Oncorhynchus nerka.* «Comp. Biochem. Physiol.», 47A: 821-828 (1974).
24. LEE, R. W. i MEIER, A. H. — *Diurnal variations of the fattening responses to prolactin in the golden topminnow, Fundulus chrysolotus.* «J. Exp. Zool.», 166: 307-316 (1967).
25. MACCONAILL, M. A. — *Staining of the central nervous system with lead-hematoxylin.* «J. Anat.», 81: 371-372 (1974).
26. MEHRLE, P. M. i FLEMING, W. R. — *The effect of early and midday prolactin injection on the lipid content of Fundulus kansae held on a constant photoperiod.* «Comp. Biochem. Physiol.», 36: 597-503 (1970).
27. MEIER, A. — *Diurnal variations of metabolic responses to prolactin in lower vertebrates.* «Gen. Comp. Endocr. Suppl.», 2: 55-62 (1969).
28. MEIER, A. — *Temporal synergism of prolactin and adrenal steroids.* «Gen. Comp. Endoc. Suppl.», 3: 499-508 (1972).
29. MEIER, A. — *Cronophysiology of prolactin in the lower vertebrates.* «Amer. Zool.», 15: 905-916 (1975).
30. MEIER, A., MARTIN, D. D. i MacGREGOR, R. — *Temporal synergism of corticosterone and prolactin controlling gonadal growth in sparrows.* «Science», 173: 1240-1242 (1971).
31. NEILL, J. D. — *Comparison of plasma prolactin levels in caudated and decapitated rats.* «Endocrinology», 90: 568-571 (1972).
32. PARDO, R. J. i DE VLAMING. — *In vivo and in vitro effects of prolactin on lipid metabolism in the Cyprinid Teleost Notemigonus crysoleucas.* «Copeia», 3: 563-573 (1976).
33. SAGE, M. i DE VLAMING. — *A diurnal rhythm in hormone effectiveness and in pituitary content of prolactin in Fundulus similis.* «Tex. Rep. Biol. Med.», 31: 101-102 (1973).
34. SPIELER, R. E. i MEIER, A. H. — *Short-term serum prolactin concentration in goldfish (Carassius auratus) subjected to serial sampling and restraint.* «J. Fish. Res. Board. Can.», 33: 183-186 (1976).