

03062

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

MECANISMOS DE TRANSDUCCION DE SEÑAL DE LA
PROLACTINA EN LAS CELULAS DE LA GRANULOSA Y SU
IMPLICACION EN LA ESTEROIDOGENESIS.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
**MAESTRA EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA**

PRESENTA:

Q.F.B. ISABEL CRISTINA MENDEZ HERNANDEZ

MEXICO, D. F.

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

dcb/grad/130Jur/2004.

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ

Director General de la
Administración Escolar
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Comité Académico del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el 11 de febrero de 2004, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Maestría en Investigación Biomédica Básica de la QFB ISABEL CRISTINA MÉNDEZ HERNÁNDEZ con no. de cuenta 8309199-9 y no. de expediente 30971126 con la tesis titulada: "Mecanismos de transducción de señal de la prolactina en las células de la granulosa y su implicación en la esteroidogénesis", dirigida por el Dr. Fernando Larrea Gallo.


Presidente:	Dr. Jesús Adolfo García Sáinz
Secretario:	Dr. Fernando Larrea Gallo
Vocal:	Dr. Enrique Pedernera Astegiano
Suplente:	Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza
Suplente:	Dr. Ali Halhalí Bagdad

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

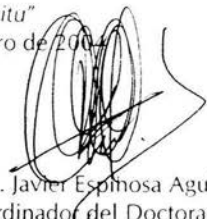
Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F., 24 de febrero de 2004



Dr. Edmundo Lamoyi Velázquez
Responsable en la Entidad
Académica



Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Coordinador del Doctorado
en Ciencias Biomédicas

c.c.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría del Dr. Fernando Larrea y con el apoyo del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) con la beca para estudios de Maestría con número de becario 113989.

DEDICATORIAS

Con admiración y respeto,
a mis amados padres Graciela y Efraín,
por su amor y su apoyo.

A mi querido esposo Carlos,
por su cariño, su apoyo y su estímulo
incondicionales.

A mis hijos **Karla y Daniel** que han sido un estímulo constante
para alcanzar mis metas.

A mi querido hermano Efraín, por su
ejemplo de constancia y excelencia y a
Chelita, Efra e Isabel, con cariño.

A mis compañeros y amigos del laboratorio Rocío, Elena, Lorenza, Cecilia,
Euclides, Mayel, Angélica, por su amistad, por su apoyo, por todo lo que
he aprendido de ellos y por hacer el trabajo más agradable.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán por apoyar la formación de profesionales e investigadores.

Al Departamento de Biología de la Reproducción de este Instituto por las facilidades otorgadas para hacer posible la realización de este trabajo de tesis.

Al Dr. Fernando Larrea por su tutoría y su paciencia en todos estos años de formación profesional.

Al comité tutorial, el Dr. Horacio Merchant Laríos, el Dr. Alejandro García Carrancá y el Dr. Fernando Larrea, por su tiempo y asesoría.

Al NIDDK por los reactivos donados para la realización de los diferentes análisis.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo financiero y la beca otorgada con núm. de becario 113989.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad de obtener un posgrado.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	4
I. COMUNICACIÓN CELULAR	4
II. LA PROLACTINA	5
1. Generalidades	5
2. Mecanismo de acción de la prolactina	6
A. El receptor de la prolactina	6
B. La vía dependiente de las cinasas de tirosina	10
C. La vía dependiente de proteína cinasa C	11
III. EL OVARIO	12
1. Las hormonas gonadotróficas y el ovario	12
2. Las hormonas esteroides. Los estrógenos	13
3. La prolactina y el ovario	15
OBJETIVOS	18
HIPÓTESIS	19
MATERIALES Y MÉTODOS	20
1. Bioensayo de aromatización en células de la granulosa (GAB)	20
2. Radioinmunoanálisis específico de estradiol	22
3. Radioinmunoanálisis específico de AMPc	25
4. Análisis estadístico	27
RESULTADOS	28
1. Regulación de la síntesis de estradiol y efectos sobre el AMPc en cultivos primarios de células de la granulosa	28
2. Efectos de la PRL en la síntesis de estradiol mediada por la FSH en las células de la granulosa	30
3. Efecto de anticuerpo anti-receptor de PRL en la síntesis de estradiol y AMPc en las células de la granulosa estimuladas con FSH u 8 Br-AMPc	30

4. Efectos de la activación de la proteína cinasa C en la síntesis de estradiol mediada por activadores de cinasas de proteína A en las células de la granulosa	32
5. Participación de las proteínas Gi en el efecto inhibitorio de la PRL en la esteroidogénesis en las células de la granulosa.....	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	48
BIBLIOGRAFÍA	49

RESUMEN

La hiperprolactinemia ha sido descrita como una de las causas de infertilidad y alteraciones a nivel gonadal tanto en hombres como en mujeres. Aunque la mayoría de las veces esta condición es tratable, aún se desconocen los mecanismos por los que la prolactina (PRL) ejerce sus efectos sobre el sistema reproductivo. A nivel del eje hipotálamo-hipofisario, la PRL inhibe la secreción de las gonadotropinas hipofisarias, mientras que a nivel gonadal, inhibe directamente la esteroidogénesis ovárica. La interacción de la PRL con receptores membranales acoplados a cinasas de tirosina es el paso inicial en su mecanismo de acción. Con la finalidad de explicar el mecanismo de transducción de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la hormona foliculo estimulante, se estudiaron sus efectos a diferentes niveles de la vía de señalización dependiente de AMPc utilizando el bioensayo de aromatización en células de la granulosa. Los resultados del presente estudio permiten establecer que el mecanismo de acción de la PRL implica procesos relacionados tanto con la activación de receptores acoplados a cinasas de tirosina como con aquéllos acoplados a proteínas G y a proteína cinasa C (PKC). Previo a la generación de AMPc, la PRL interfiere a nivel de las proteínas G estimuladoras, de las proteínas G inhibitorias y de la adenilato ciclasa. Posterior a la generación de AMPc, la PRL y la PKC inhiben de manera similar la esteroidogénesis. Finalmente, los resultados de este estudio permiten establecer mecanismos de regulación de la PRL a través de la comunicación de receptores acoplados a cinasas de tirosina con aquéllos acoplados a proteínas G.

INTRODUCCIÓN

I. COMUNICACIÓN CELULAR

Las células animales contienen una maquinaria compleja que les permite responder a diversos estímulos o señales provenientes tanto de las mismas (comunicación autocrina) como de otras células (paracrina o endocrina). La comunicación entre las células se lleva a cabo mediante estímulos que pueden ser de muchas clases como proteínas, péptidos pequeños, nucleótidos, esteroides, ácidos grasos e incluso gases disueltos como el óxido nítrico. Los organismos multicelulares están expuestos a múltiples señales provenientes de su medio ambiente que pueden actuar en diversas posibles combinaciones para finalmente producir un efecto biológico. De esta manera, las células se comunican entre sí y comunican hacia el interior de la célula el mensaje. La maquinaria celular está constituida por receptores de naturaleza proteínica, proteínas que unen a nucleótidos de guanina, enzimas, segundos mensajeros y otras proteínas que interaccionan para transmitir las señales intracelulares.

Independientemente de la naturaleza de la molécula señal o ligando, la célula blanco responde por medio de un receptor específico. Las hormonas que actúan de manera endocrina, son secretadas por células especializadas hacia la circulación sanguínea, utilizando esta vía como medio para llegar a las células blanco distribuidas en los diferentes tejidos del organismo. Las células blanco responden de acuerdo a sus características específicas; esto depende tanto de los receptores que expresan como del estadio de desarrollo en el que se encuentran. En otras palabras, la célula responderá al medio ambiente dependiendo de los receptores y de la maquinaria intracelular que posee, misma que

integra e interpreta la información que recibe. De esta manera se explica por qué diferentes tipos celulares responden de diferente manera a un mismo estímulo.

II. LA PROLACTINA

1. Generalidades

La prolactina humana (hPRL) es una proteína de cadena sencilla constituida por 199 aminoácidos, tiene un peso molecular de 23.5 kDa y se sintetiza principalmente en la glándula hipofisaria (1). Las células productoras de la PRL en la hipófisis se denominan lactotrofos y pertenecen al grupo de células acidófilas del lóbulo anterior. La PRL se sintetiza en forma de pre-prolactina en el retículo endoplásmico y es hidrolizada para dar origen a la hormona madura (2,3). Variantes moleculares de la PRL se han descrito como producto de modificaciones postraduccionales (4) previas a su secreción, tales como la hidrólisis del péptido señal, la oxidación de residuos de cisteína para la formación de puentes disulfuro y la glicosilación, además de otras modificaciones secundarias al procesamiento alternativo del ARN mensajero o modificaciones que ocurren en la circulación (4).

La síntesis y secreción de la PRL están reguladas bajo un sistema dual que implica procesos de estimulación e inhibición mediante mecanismos de naturaleza neuroendocrina, autocrina y paracrina. El principal mecanismo de regulación de la funcionalidad de los lactotrofos hipofisarios lo ejerce el hipotálamo a través del sistema portal hipotálamo-hipofisario, siendo la dopamina el principal factor involucrado y de naturaleza inhibitoria (5).

La PRL es una hormona que ejerce diversas acciones dentro de los procesos fisiológicos en mamíferos, aves y anfibios (6). En los mamíferos,

esta hormona realiza un papel esencial en la preservación de estas especies, ya que participa en la provisión de nutrientes de la madre al producto, prepara a la glándula mamaria y estimula su actividad secretora. La PRL también colabora en la regulación de la funcionalidad de los gametos en la vida reproductiva de los mamíferos y participa en otros aspectos de relacionados con el sistema inmunológico y en el equilibrio de agua y sales entre otras funciones.

2. Mecanismo de acción de la prolactina

La PRL es considerada en la actualidad como una hormona que ejerce diversos efectos en el metabolismo, la osmorregulación y la reproducción, entre otros. De hecho, se han reconocido más de 300 funciones en diferentes especies de vertebrados (7). Desde que fue identificada en primates como una hormona diferente a la hormona del crecimiento (GH), la PRL ha sido establecida como un factor importante de regulación de la función reproductiva en el humano.

El paso inicial en el mecanismo de acción de la PRL, al igual que la mayoría de las hormonas proteínicas, es su unión a receptores específicos de membrana y se encuentra distribuido en las células de diversos órganos y tejidos blanco.

A. El receptor de la prolactina

El receptor de la PRL (RPRL) es una proteína transmembranal, específico y de alta afinidad (7). El gene que codifica para el RPRL humano está localizado en el cromosoma 5 y contiene en su estructura 10 exones (8). El transcrito primario en diferentes especies sufre empalmes alternativos dando origen a la formación de diversos productos del RPRL o isoformas, que difieren en tamaño y en estructura primaria en su región intracelular (9-11). Estas isoformas, de acuerdo a su tamaño, se denominan como receptor corto, intermedio y largo (7), y se ilustran en la figura 1.

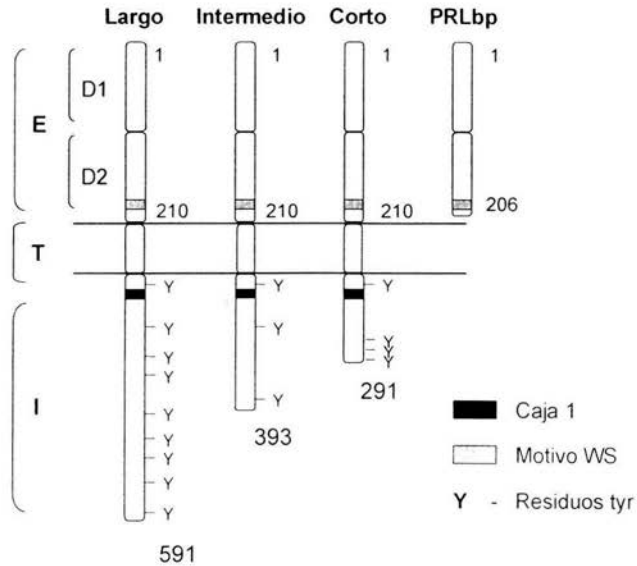


Figura 1. Isoformas del receptor de prolactina (RPRL)

En la rata, la especie mejor estudiada, el receptor largo contiene 591 aminoácidos, el corto 291 y el intermedio 393 (Fig. 1) (7). Este último sólo se encuentra presente en la membrana de la línea celular derivada de linfoma de la rata llamada Nb2, sistema ampliamente utilizado para evaluar la actividad biológica de la PRL por su dependencia hormonal para proliferar (12). Además de los receptores anclados en la membrana, también se han identificado isoformas solubles denominadas proteínas solubles unidoras de PRL (PRLbp), desconociéndose todavía si representan el producto de empalmes alternativos y/o de rupturas proteolíticas de la proteína de membrana (13). Los receptores de membrana están conformados por tres regiones de acuerdo a su localización celular: el dominio extracelular (E), el dominio transmembranal (T), que atraviesa una sola vez la membrana, y la región citoplásmica o

dominio intracelular (I), siendo la región extracelular idéntica en todos los receptores (14) (Fig. 1).

El RPRL pertenece a la superfamilia de receptores de diversas citocinas como, del factor estimulador de colonias de granulocitos, el factor estimulador de colonias de granulocitos macrófagos y de la GH, entre otros (15,16). Todos estos receptores de membrana contienen en su estructura regiones de aminoácidos altamente conservadas tanto en el dominio extracelular como en el intracelular. En el dominio intracelular, por ejemplo, se encuentra una región denominada caja 1 (14). Esta región está próxima a la membrana y es rica en residuos de prolina, confiriendo al receptor el plegamiento adecuado para ser específicamente reconocida por moléculas de transducción de señal, como la cinasa de tirosina JAK-2 (17). Además, en el dominio extracelular se encuentran dos subdominios, D1 y D2, y una secuencia o motivo WS que son también rasgos característicos en esta familia de receptores (18) (Fig. 1).

El RPRL requiere para su activación de la dimerización secuencial (19), en la que al menos dos regiones de la molécula de la PRL están implicadas en la unión de la hormona al receptor y se denominan sitio 1 y sitio 2 (Fig. 2). El proceso de dimerización consiste en la interacción del sitio 1 de la PRL con una molécula de RPRL que conlleva a la formación de un complejo inactivo $H_1:R_1$ (una hormona : un receptor). El establecimiento de este complejo parece ser un pre-requisito para la interacción del sitio 2 de la PRL con otra molécula de RPRL, y en consecuencia formar un complejo trimérico $H_1:R_2$, constituido por una hormona y un homodímero del receptor (20,21).

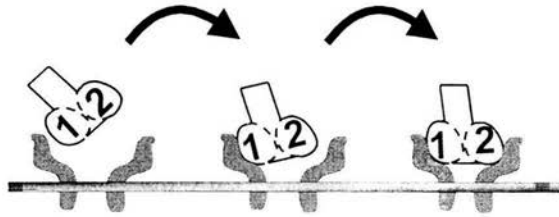


Figura 2. Dimerización del RPRL

El RPRL se encuentra ampliamente distribuido en la mayoría de las especies de vertebrados. La expresión de las formas larga y corta del receptor está en función del estado fisiológico del individuo; por ejemplo en la rata, varía de acuerdo al ciclo estral, el embarazo y la lactancia (22,23). La presencia diferencial de las formas del RPRL, es decir, que exista en mayor o menor proporción una forma u otra, es una manera de regulación de las diversas funciones biológicas de la hormona. En el ovario de la rata, la forma larga del receptor ha sido detectada durante la maduración folicular y el desarrollo del cuerpo lúteo, por lo que se ha sugerido que el receptor largo está implicado en la esteroidogénesis y el reclutamiento de los folículos, mientras que la forma corta está presente en la luteólisis o degeneración del cuerpo lúteo (18).

De esta manera, todas las acciones de la PRL resultan de la interacción de la hormona con su receptor. Esto conduce a la activación de una cascada de eventos intracelulares en la que están implicadas fosforilaciones en residuos de tirosina, serina y/o treonina de proteínas que sirven como sustrato de diversas enzimas, y por ende en la activación e inactivación de proteínas como factores de transcripción que ocurren

dentro de la células como parte del proceso de señalización que resultan en determinados efectos biológicos.

B. La vía dependiente de las cinasas de tirosina

La estimulación hormonal del RPRL conduce a la fosforilación de residuos de tirosina de diversas proteínas intracelulares (24), incluyendo el propio receptor. La utilización de inhibidores de TK bloquean los efectos anabólicos y mitogénicos de la PRL en la línea celular de linfoma Nb2 (25). La JAK2, que pertenece a la familia de las Janus cinasas, se identificó como la TK acoplada constitutivamente al RPRL (26-29). La activación de la JAK2 por el RPRL sucede rápidamente por la estimulación hormonal y la posterior dimerización del receptor, eventos que han sido demostrados en diversos sistemas como la línea celular Nb2 (26,27), la glándula mamaria (28) y el hígado (29), entre otros.

Una vez activada la JAK2, fosforila tanto al RPRL como a sí misma (27). Los residuos de tirosina fosforilados son reconocidos por otras proteínas intracelulares que contienen en su estructura dominios de homología a Src no catalíticos denominados SH2 y SH3. Entre estos se encuentran los factores de transcripción STAT (transductores de señal y activadores de la transcripción), específicamente STAT 1 y STAT 5 (30), el Grb2 y la fosfolipasa C- γ que activa la vía de fosfolípidos de inositol, entre otros (7). Las proteínas STAT fosforiladas se dimerizan y se translocan al núcleo e interactúan con elementos de respuesta situados en las regiones promotoras de genes blanco. La PRL también actúa sobre la vía de las cinasas activadas por mitógeno o MAPK que son inducidas por la cascada Grb2/SOS/Ras/Raf/MAPK que participan en la proliferación celular (7).

Los fosfolípidos de inositol de membrana como el fosfatidil inositol, intervienen en la señalización de receptores asociados a TK. La activación de la fosfolipasa C- γ genera dos productos de la hidrólisis de fosfolípidos

de inositol de membrana: el inositol trifosfato que libera calcio intracelular del retículo endoplásmico y el diacilglicerol que activa a PKC.

C. La vía dependiente de proteína cinasa C

Las proteína cinasa C (PKC) son proteínas que fosforilan a substratos intracelulares en residuos de serina/treonina, proceso dependiente de calcio (31). Se conocen 8 isoformas de la PKC y al menos 4 son activadas por el diacilglicerol generado por la activación de la fosfolipasa C- γ . En sistemas *in vitro*, los efectos del diacilglicerol pueden ser mimetizados por ésteres del forbol como el PMA o TPA (tetradecanoil forbol acetato) que interactúan con la PKC y la activan directamente. Una vez activada, la PKC fosforila diversas proteínas blanco y modifica la transcripción de genes específicos a través de la fosforilación de proteínas reguladoras que, a su vez, activan o inactivan factores de transcripción (32). La PKC está implicada en las vías de señalización de los receptores asociados a TK y de los receptores acoplados a proteínas G y en una amplia variedad de procesos celulares tales como la diferenciación, la mitogénesis, la regulación a la baja de receptores, la modulación de canales iónicos y la expresión de genes de respuesta rápida como *c-fos* y *c-jun* (33).

Diferentes sistemas celulares como los astrocitos, el hígado, neuronas tuberoinfundibulares y la glándula mamaria han sido modelos de estudio de la participación de la PKC en la vía de señalización de la PRL (34-37). Sin embargo, falta por estudiar el efecto de la PRL a través de la activación de la PKC en otros sistemas relacionados con el área reproductiva, en donde se ubican preferentemente los efectos biológicos de esta hormona.

III. EL OVARIO

El ovario o gónada femenina es un órgano con diversos compartimentos y con propiedades biológicas diferentes. Dentro de las acciones principales del ovario se encuentran: el desarrollo de un óvulo fertilizable maduro (ovocito secundario maduro) y la síntesis de hormonas esteroides o esteroidogénesis. Estas importantes funciones son estimuladas por diversos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, como las gonadotrofinas hipofisarias que son secretadas de manera cíclica. A su vez, las hormonas esteroides ováricas por un mecanismo de retroalimentación negativa, modulan la secreción de las gonadotrofinas y de esta manera, el ovario desempeña su papel en el mantenimiento del ciclo reproductivo.

El ovario cuenta con diversos componentes celulares, que están presentes de acuerdo al estado de desarrollo y del ambiente hormonal. Entre ellos, se encuentran las células de la granulosa, las células de la teca y las células intersticiales. Las células de la granulosa recubren al ovocito primario (célula germinal que se encuentra detenida en la primera división meiótica) y conforman al folículo, siendo el sitio donde se lleva a cabo la síntesis de los estrógenos.

1. Las hormonas gonadotróficas y el ovario

La función hormonal y reproductiva de las gónadas en los mamíferos están controladas, en parte, por las hormonas hipofisarias que se unen a receptores específicos en el ovario y el testículo para regular la gametogénesis (formación de gametos) y la esteroidogénesis (síntesis de hormonas esteroides). Estas acciones son ejercidas por las gonadotrofinas hipofisarias: la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH). La síntesis y secreción de ambas hormonas

por los gonadotropos hipofisarios están reguladas por la hormona liberadora de gonadotropinas o GnRH de origen hipotalámico.

La maduración de los folículos ováricos se caracteriza por una serie de estadios secuenciales: la iniciación, el crecimiento, la selección, la ovulación y la luteinización. En este proceso, las hormonas hipofisarias y gonadales desempeñan un papel importante sobre el folículo seleccionado para la ovulación, que se transforma de un folículo primordial a un folículo preovulatorio (38).

La FSH actúa sobre las células de la granulosa del ovario para promover el desarrollo folicular temprano, mientras que la LH participa en el desarrollo tardío del folículo, la ruptura del folículo preovulatorio y la liberación del óvulo (39). Con el progreso de la maduración folicular, las células de la granulosa se luteinizan, y sintetizan la progesterona (hormona esteroide) bajo el estímulo directo de la LH (39).

Además de los efectos que la FSH y la LH ejercen en la proliferación y la maduración de las células de la granulosa, existen otros relacionados con la síntesis de las hormonas esteroides (40), como es el caso de la biotransformación de andrógenos a estrógenos (41). Las células de la teca interna de los folículos preovulatorios sintetizan los precursores, androstendiona y testosterona, bajo la influencia de la LH, que son biotransformados a estrógenos por acción de la FSH en las células de la granulosa.

2. Las hormonas esteroides. Los estrógenos

Las células de la granulosa constituyen el origen celular de los estrógenos ováricos como la estrona y el estradiol. La biosíntesis de los estrógenos por las células de la granulosa requiere de la cooperación de las células de la teca. La participación de estos dos tipos celulares y de las dos gonadotropinas, la FSH y la LH, en la biosíntesis de los estrógenos

ováricos, sustenta el modelo de dos células/ dos gonadotrofinas (Fig. 3) (42). Este mecanismo involucra las acciones que por separado llevan a cabo la FSH y la LH en la regulación de la biosíntesis de los estrógenos. La síntesis de la enzima citocromo P450 aromatasa (CYP450 aromatasa) por las células de la granulosa es inducida por la acción de la FSH (40). Esta enzima actúa sobre los andrógenos (42-44) aromatizando el anillo A de la molécula. La testosterona y la androstendiona, producto de síntesis de las células de la teca por acción de la LH sirven de precursores para la biosíntesis de estrona y estradiol (42,43) (Fig. 3).

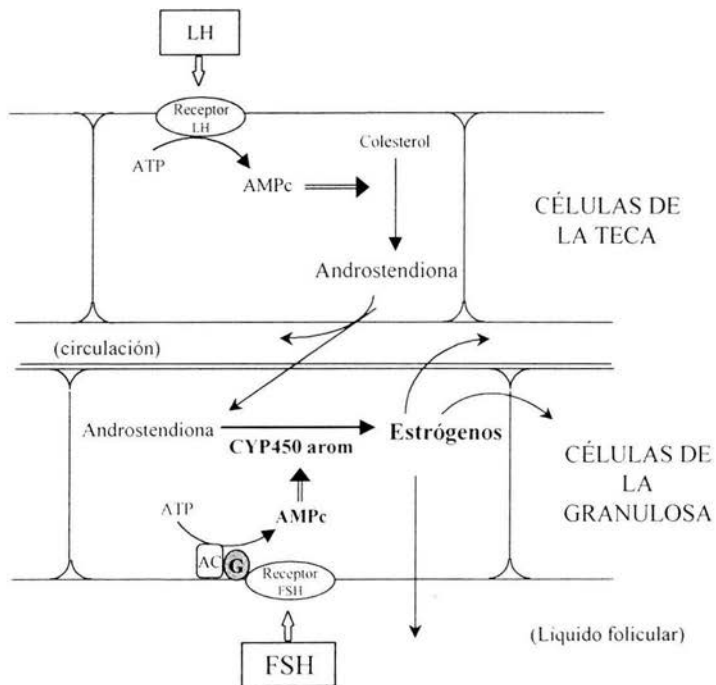


Figura 3. Biosíntesis de los estrógenos ováricos. Modelo de dos células/dos gonadotrofinas. (Dibujo basado en el modelo de la ref. 41)

Como se ilustra en la Figura 3, el mecanismo de acción de la FSH requiere de la unión de la hormona con su receptor membranar que está presente en las células de la granulosa e involucra la participación de la enzima adenilato ciclasa (AC) (45). El receptor de la FSH es de tipo siete pasos transmembranales y está acoplado a proteínas Gs (46,47) (Fig. 4). En el proceso de la aromatización, la activación de las proteínas Gs acopladas al receptor de la FSH conduce a la activación de la adenilato ciclasa cuya acción es convertir el ATP (adenosín trifosfato) en AMP cíclico o AMPc (adenosín monofosfato cíclico) (Fig. 4). El AMPc generado activa a la proteína cinasa A o PKA. La PKA por su parte, activa la transcripción del gen de la CYP450 aromatasa (46), previa fosforilación de los factores de transcripción CREB que reconocen sitios específicos en la región reguladora del gen denominados CRE (elementos de respuesta a AMPc) (Fig. 4).

Este modelo representa el mecanismo de regulación de la esteroidogénesis ovárica por las gonadotrofinas; sin embargo, existen otras hormonas hipofisarias que participan en la funcionalidad del ovario, como la prolactina.

3. La prolactina y el ovario

En el ovario, la PRL actúa como una hormona luteotrófica, es decir, promueve la formación y acción del cuerpo lúteo, tanto en los roedores como en otras especies (7). En los roedores, la PRL regula la expresión de los receptores para las gonadotrofinas en las células lúteas y provoca el aumento de los receptores para la LH durante la luteinización folicular. La PRL ejerce una acción luteolítica en la rata lo que significa que también participa en la regresión lútea durante el ciclo estral normal. También estimula la producción de progesterona directamente en las células de la granulosa y lúteas de la rata (48), pero a altas dosis y en células inmaduras de la granulosa inhibe la síntesis de progesterona (49).

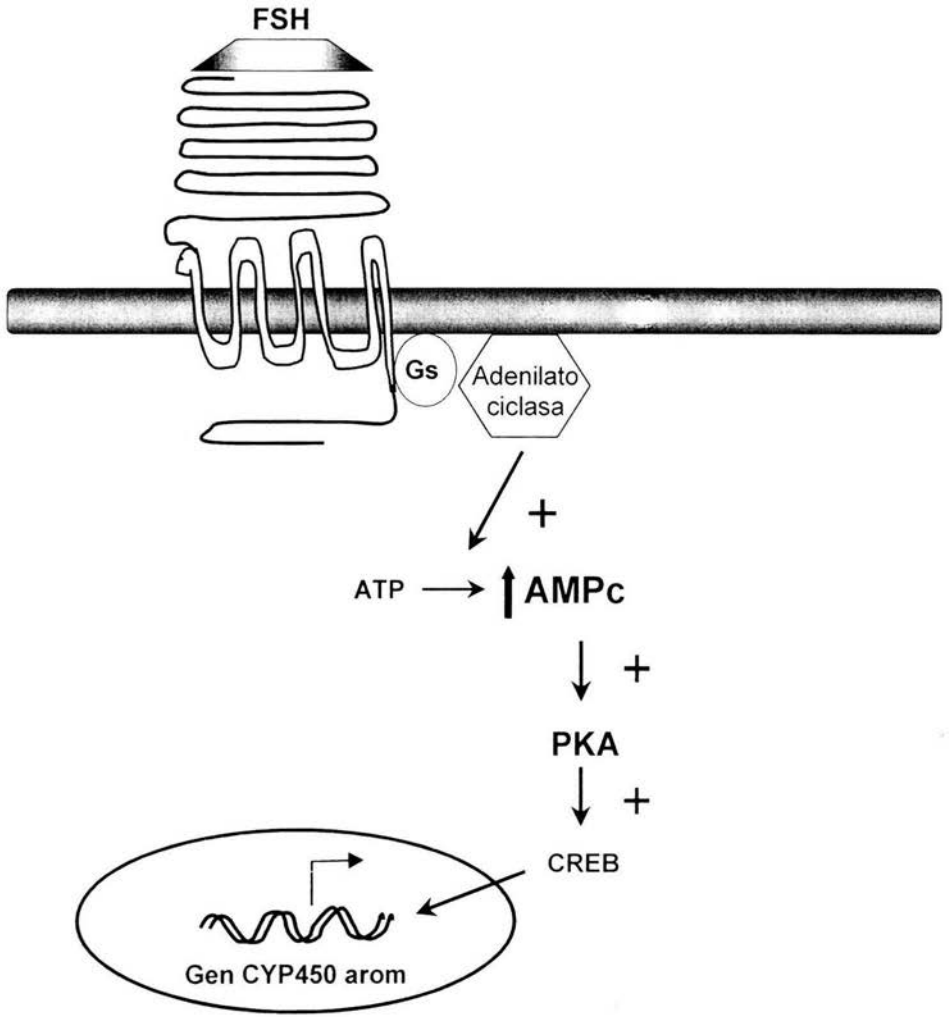


Figura 4. Mecanismo de transducción de señal de la FSH en la esteroidogénesis ovárica.

El aumento en las concentraciones circulantes de la PRL o hiperprolactinemia resulta en la inhibición de la actividad de las neuronas hipotalámicas que sintetizan a la hormona reguladora de gonadotrofinas (GnRH) (50) afectando los patrones de secreción pulsátil de las gonadotropinas hipofisarias y por lo tanto la síntesis y secreción de hormonas esteroides por el ovario. La PRL tiene también efectos a nivel ovárico. En cultivos de células de la granulosa, la presencia de la PRL inhibe, de manera dependiente de la dosis, la producción de progesterona (49) y la síntesis de estrógenos inducida por la hormona foliculo estimulante (48,51). Esta acción es a través de inhibir los efectos de la FSH sobre la actividad de la CYP450 aromatasa (51,52). Este efecto es reversible cuando la PRL es removida del medio de cultivo. Se ha sugerido que dicho efecto se inicia con la unión de la PRL a su receptor desencadenando eventos intracelulares que conducen a cambios en la esteroidogénesis, ya que la PRL es inocua en células sonicadas (52). De hecho, se ha demostrado que la PRL inhibe la expresión del RNA mensajero de la CYP450 aromatasa inducida por la FSH o por un activador de la adenilato ciclasa como la forskolina (53). A este respecto, se ha sugerido que la PRL actúa posterior a la generación de AMPc inducido por la FSH, ya que la PRL inhibe la actividad de la aromatasa estimulada por un análogo sintético del AMPc, el dibutilil AMPc (52). Sin embargo, no se ha descartado la posibilidad de que el sitio de acción de la PRL en las células de la granulosa sea previo a la generación del AMPc, o bien posterior al receptor de la FSH e incluso sobre el propio receptor.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Establecer las vías de transducción de señal implicadas en los efectos de la prolactina sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la hormona folículo estimulante en cultivo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Establecer y validar el bioensayo de células de la granulosa de rata para el estudio de la aromatización de andrógenos en presencia de diferentes estímulos de la vía de la proteína cinasa A.
2. Evaluar la participación de la proteína cinasa C en el efecto inhibitorio de la prolactina sobre la síntesis de estradiol y de AMPc inducidos por la hormona folículo estimulante en células de la granulosa mantenidas en cultivo.
3. Analizar la participación de las proteínas G dependientes de la toxina del cólera y de la toxina pertussis en el efecto inhibitorio de la PRL en la síntesis de estradiol y de AMPc en células de la granulosa mantenidas en cultivo.
4. Investigar la posible comunicación entre la de vía de señalización de los receptores acoplados a TK y las vías de señalización de los receptores acoplados a proteínas G en la regulación de la esteroidogénesis en las células de la granulosa mantenidas en cultivo.

La prolactina ejerce su efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la hormona folículo estimulante a través de la participación de las proteínas G estimuladoras y las proteínas G inhibitorias, así como de la activación de la proteína cinasa C, lo que implica un mecanismo de comunicación entre los receptores acoplados a TK y aquéllos acoplados a proteínas G.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Bioensayo de aromatización en células de la granulosa (GAB)

Reactivos:

Se utilizaron dos preparaciones de elevada pureza de prolactina (PRL) humana hipofisaria (NIDDK-hPRL-RP-2) y de hormona folículo estimulante (FSH) humana hipofisaria (NIDDK-hFSH-I-SIAFP-2), donadas por el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). Ambas preparaciones estaban libres de hormona luteinizante, hormona estimulante de tiroides, hormona de crecimiento, además de FSH en la preparación de PRL y de PRL en el caso de la preparación de FSH. El anticuerpo anti-receptor de PRL de rata (U5) fue donado por el Dr. Paul Kelly (INSERM, París, Francia). El anticuerpo anti-PRL de rata (NIDDK-anti-rPRL-S-9) fue donado por el NIDDK. El dietilestilbestrol, la 4-androstendiona (4-androsten-3,17-diona), la 1-metil-3-isobutil-xantina (MIX), el 8-bromo adenosín 3',5'-monofosfato cíclico (8-Br-AMPC), el dimetilsulfóxido (DMSO), el tetradecanoil forbol acetato (TPA) y la forskolina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA). La calfofostina C y la toxina del cólera se obtuvieron de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). El Medio Mc Coy 5a modificado, la L-glutamina, el azul tripán, y la mezcla de antibióticos en solución de penicilina-estreptomicina se obtuvieron de Gibco BRL (Grand Island, NY, USA), la GnRH (LHRH) se obtuvo de Hoescht (Frankfurt, Alemania).

Metodología del bioensayo:

Se emplearon ratas hembras de la cepa Wistar inmaduras, de 19 a 21 días de edad, mantenidas bajo un régimen de luz/obscuridad de 12/12 hr

y con alimento y agua a libre demanda. Con la finalidad de estimular la proliferación celular de las células ováricas, las ratas se implantaron subcutáneamente en la región dorsal con cápsulas de silástic de 10 mm de largo y 1.5 mm de diámetro interno conteniendo aproximadamente 10mg de dietilestilbestrol y se mantuvieron con el implante durante 4 días. Posteriormente, las ratas se sacrificaron por dislocación cervical, los ovarios se extrajeron, se descapsularon y las células de la granulosa se obtuvieron por punción folicular con aguja fina en medio Mc Coy pH = 7.4. Posteriormente, las células se disgregaron y se homogenizaron con una pipeta de transferencia y se lavaron una vez con medio Mc Coy centrifugando a 200 x g por 10 min a temperatura ambiente. Las células de la granulosa se mantuvieron en cultivo de acuerdo al método estandarizado por Jia y Hsueh (54) en placas de 24 pozos de 16 mm de diámetro (Nunclon, Roskilde, Denmark) conteniendo 1.5×10^5 células viables (cuantificadas por tinción vital con azul tripán) en cada pozo, en un volumen final de 0.5 ml. Las células se cultivaron en medio Mc Coy 5a complementado con 4 mM de L-glutamina, 0.125 μ M de dietilestilbestrol, 1.25 μ M de 4-androstendiona como precursor androgénico para la aromatización, 0.15 μ M de MIX como inhibidor de la fosfodiesterasa y la mezcla de antibióticos 100 UI/ml de penicilina y 0.1 mg/ml de estreptomina. Las células se incubaron en presencia o ausencia de los estímulos hormonales y farmacológicos correspondientes.

Estímulos hormonales y farmacológicos:

Los estímulos se añadieron a los pozos de cultivo inmediatamente después de la siembra de las células. Las células se estimularon con activadores de la vía de la proteína cinasa dependiente de AMPc o PKA a diferentes niveles. A nivel del receptor con dosis crecientes de FSH humana, a nivel de proteínas G con un activador constitutivo de las proteínas Gs, la toxina del cólera, a nivel de la adenilato ciclasa con un

activador directo, la forskolina o directamente añadiendo un análogo no hidrolizable de AMPc, el 8Br-AMPc.

El efecto de la PRL en la esteroidogénesis inducida por estos activadores de la PKA se evaluó coestimulando las células con diferentes dosis de PRL y FSH, forskolina u 8Br-AMPc. La participación de la PKC en el mecanismo de acción de la PRL se evaluó preincubando las células por 30 min con un inhibidor específico de la PKC, la calfofostina C (previamente activada por 30 min en presencia de luz), y posteriormente estimulando con FSH y PRL o TPA como control.

Así mismo, se evaluó el efecto de activadores de la proteína cinasa dependiente de calcio o PKC en la acumulación de AMPc y en la esteroidogénesis inducida por los activadores de la PKA. Las células se coestimularon con un activador directo de la PKC, el TPA, o un activador conocido de la PKC a nivel de receptor, la GnRH en presencia de FSH, forskolina u 8Br-AMPc.

Finalmente, la participación de las proteínas Gi en el efecto de la PRL se evaluó añadiendo un inhibidor de estas proteínas, la toxina pertussis, en presencia de PRL y FSH. Las células se incubaron por 72 hr a 37°C, 95% de aire y 5% de CO₂, en ambiente húmedo.

Al final de la incubación, se cuantificó el contenido de 17β-estradiol en el medio de cultivo y el contenido total de AMPc por radioinmunoanálisis específico. Todas las incubaciones se llevaron a cabo por triplicado de pozo y los experimentos se repitieron por lo menos tres veces.

2. Radioinmunoanálisis específico de estradiol

Reactivos:

El estradiol (E₂) marcado con tritio ([2,4,6,7-³H]estradiol) con una actividad específica de 90 Ci/mmol se obtuvo de Amersham, Life Science

(Buckinghamshire, England). La resina LH-20, el carbón activado, el dextrán, el POPOP, el PPO, el timerosal y la gelatina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA). Los fosfatos de sodio NaH_2PO_4 y Na_2HPO_4 , el NaCl, el tolueno y el metanol se obtuvieron de JT Baker (México). La curva estándar de 17β -estradiol y el anticuerpo anti- 17β -estradiol fueron donadas por The Matched Reagent Programme of the Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction de la Organización Mundial de la Salud (Geneve, Switzerland).

Metodología del radioinmunoanálisis de E_2 :

El 17β -estradiol secretado por las células al medio de cultivo se cuantificó por radioinmunoanálisis específico. Las muestras se cuantificaron por duplicado y los resultados se expresaron en ng/pozo de E_2 . La sensibilidad del radioinmunoanálisis de E_2 fue de 6.4 pg/tubo y los coeficientes de variación intra e interanálisis fueron de 6 y 11%, respectivamente. Las muestras se procesaron de acuerdo al protocolo del programa de reactivos de la Organización Mundial de la Salud.

El procedimiento consistió en lo siguiente: se incluyó la preparación de una curva estándar utilizando el E_2 no radiactivo o frío. Se preparó la dosis más concentrada de 204.8 pg/ml de E_2 en sol. amortiguadora de fosfatos para radioinmunoanálisis de esteroides o SAFRE (0.02M de NaH_2PO_4 , 0.08 M de Na_2HPO_4 , 0.15 M de NaCl, 0.01% de timerosal y 0.1% de gelatina, pH 7.2) y se incubó a 37°C por 30 min. A partir de esta concentración se prepararon diluciones crecientes (1/2) del estándar cuyas dosis fueron de 6.4 a 204.8 pg/500 μl y se añadieron 500 μl de cada dosis a los tubos de reacción. Como antígeno se utilizó el E_2 marcado con tritio o $^3\text{H}\text{-E}_2$ ([2,4,6,7- ^3H] estradiol) previamente purificado en una columna de intercambio iónico con resina LH-20 (de 50 cm de alto x 1 cm

de diámetro) y eluido con una solución tolueno-metanol 85:15. El $^3\text{H-E}_2$ purificado se evaporó con N_2 , se resuspendió en SAFRE y ajustando la concentración a 10,000 cpm/100 μl se incubó a 37°C por 30min y posteriormente se añadieron 100 μl a cada tubo de reacción. El anticuerpo anti-17 β -estradiol liofilizado se resuspendió en 10ml de SAFRE quedando diluido 1/10. Los medios de cultivo obtenidos se diluyeron 1/20 en SAFRE y se cuantificaron por duplicado en el radioinmunoanálisis. A cada tubo de reacción se agregaron 400 μl de SAFRE, 100 μl de la muestra diluida 1/20, 100 μl de $^3\text{H-E}_2$ (10,000 cpm) y 100 μl de anticuerpo (dilución final 1/70). En los tubos correspondientes a la curva estándar se añadieron 500 μl de cada dosis en lugar de SAFRE y muestra. El análisis incluyó dos tubos de cuentas totales conteniendo 100 μl de $^3\text{H-E}_2$ (10,000 cpm); dos tubos de uniones no específicas (UNE) conteniendo 600 μl de SAFRE y 100 μl de $^3\text{H-E}_2$ (10,000 cpm) y dos tubos de uniones totales (Uo) conteniendo 500 μl de SAFRE, 100 μl de $^3\text{H-E}_2$ (10,000 cpm) y 100 μl de anticuerpo.

Los tubos con las mezclas se incubaron por 18 hrs a 4°C. Posteriormente, a cada tubo de reacción se agregaron 200ml de carbón-dextrán frío (0.625% de carbón activado y 0.062% de dextrán en SAFRE) manteniendo en agitación constante y se incubaron a 4°C por 30 min exactamente. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 2,000 x g por 15 min a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron en viales de centelleo y se agregaron 5ml de líquido de centelleo (0.01% de POPOP y 0.45% de PPO en tolueno). Los viales se agitaron vigorosamente por 15 seg y se dejaron reposar por una hora. La cantidad de radiactividad unida al anticuerpo se determinó en un contador de centelleo líquido (Packard) con una eficiencia para tritio del 68%.

En la curva estándar se interpolaron los valores de las muestras desconocidas, utilizando el programa matemático A5.2 (por P. R. Edwards, 1988) de la Organización Mundial de la Salud, que graficó la

curva y la calibró por un modelo de cuatro parámetros logísticos (pendiente, unión total, unión no específica y ED₅₀).

3. Radioinmunoanálisis específico de AMPc

Reactivos:

El Na¹²⁵I se obtuvo de Amersham, Life Science (Buckinghamshire, England). El adenosin 3',5'-monofosfato cíclico, el tirosil metil éster de 2'-O-monosuccinil adenosin 3',5'-monofosfato cíclico, la trietilamina, el anhídrido acético, la DEAE celulosa, la cloramina T, el bisulfito de sodio (metabisulfito de sodio), el acetato de sodio y la albúmina sérica bovina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo. USA). El anticuerpo anti-AMPc se obtuvo de Calbiochem (La Jolla, CA, USA).

Metodología del radioinmunoanálisis de AMPc:

El contenido total de AMPc se determinó en las células y el medio de cultivo por radioinmunoanálisis específico. Las muestras se cuantificaron por duplicado y los resultados se expresaron en pmol/pozo de AMPc. La sensibilidad del radioinmunoanálisis de AMPc fue de 40 fmol/ml y los coeficientes de variación intra e interensayo fueron 6 y 12%, respectivamente. El radioinmunoanálisis se realizó de acuerdo al protocolo proporcionado por Calbiochem (La Jolla, Ca, USA) ligeramente modificado.

El procedimiento consistió en lo siguiente: se incluyó la preparación de una curva estándar utilizando el AMPc no radiactivo o frío (adenosin 3',5'-monofosfato cíclico). Se preparó un stock con una concentración de 1 μmol/ml en agua bidestilada. Esta preparación se almacenó en alícuotas a -20°C y sirvió para preparar la dosis de 50 pmol/ml de AMPc con agua bidestilada. A partir de esta concentración se prepararon diluciones

crecientes (1/2) del estándar cuyas dosis fueron de 40 a 2,500 fmol/ml en sol. de acetato de sodio 5mM, pH 4.7. Las dosis de la curva se acetilaron para hacer más sensible el ensayo adicionando 20µL de una solución trietilamina-anhidrido acético 2:1 a un volumen de 500µl de cada dosis del estándar. Como antígeno se utilizó el tirosil metil éster 2'-O-monosuccinil adenosín 3',5'-monofosfato cíclico marcado con ¹²⁵I (AMPc-¹²⁵I). El marcaje radiactivo se hizo por el método de cloramina T descrito previamente por Hunter (55) y la reacción se detuvo con metabisulfito de sodio. El AMPc-¹²⁵I se purificó en una columna de intercambio iónico de DEAE celulosa haciendo una primera elución con sol. amortiguadora de fosfato de potasio 5 mM, pH 4.4 y una segunda elución con sol. amortiguadora de fosfato de potasio 10 mM, pH 4.4. Para el ensayo, la concentración del AMPc-¹²⁵I se ajustó a 10,000 cpm/25µl en una sol. de acetato de sodio 50mM, pH 6.1 y 0.1% de albúmina sérica bovina (ASB). El anticuerpo anti-AMPc se diluyó en sol. de acetato de sodio 50mM, pH 6.1 y 0.1% de ASB, quedando una dilución de trabajo 1/30,000. Las muestras se prepararon de la siguiente manera: al término de la incubación, los medios de cultivo junto con las células se extrajeron de las placas de cultivo y se colectaron en tubos de poliestireno de 12 x 75 mm. Las muestras obtenidas se hirvieron a 95°C por 5 min para inactivar la fosfodiesterasa y así evitar la degradación del AMPc; posteriormente, se congelaron hasta el día del análisis. Las muestras se diluyeron 1/10 en sol. de acetato de sodio 5 mM, pH 4.7 y se acetilaron para hacer más sensible el análisis. La acetilación de las muestras se hizo adicionando 20µL de una solución trietilamina-anhidrido acético 2:1 a un volumen de 500µl de la muestra diluida. Las muestras acetiladas se cuantificaron por duplicado en el radioinmunoanálisis.

A cada tubo de reacción se agregaron 50µl de la muestra acetilada, 25µl de AMPc-¹²⁵I (10,000 cpm) y 25µl de anticuerpo (dilución final 1/120,000). En los tubos correspondientes a la curva estándar se añadieron 50µl de cada dosis en lugar de muestra. El análisis incluyó dos tubos de cuentas

totales conteniendo 25 μ l de AMPc-¹²⁵I (10,000 cpm); dos tubos de uniones no específicas (UNE) conteniendo 75 μ l de sol. de acetato de sodio 5 mM, pH 4.7 y 25 μ l de AMPc-¹²⁵I (10,000 cpm) y dos tubos de uniones totales (Uo) conteniendo 75 μ l de sol. de acetato de sodio 5 mM, pH 4.7, 25 μ l de AMPc-¹²⁵I (10,000 cpm) y 25 μ l de anticuerpo. Los tubos con las mezclas se incubaron a 4°C por 18 hrs. Posteriormente, a cada tubo de reacción se agregaron 3ml de etanol al 96% frío para precipitar los complejos antígeno-anticuerpo. Finalmente, los tubos se centrifugaron a 2,000 x g por 30 min a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron y en el precipitado se cuantificó la cantidad de radiactividad unida al anticuerpo en un contador de radiaciones gamma (Packard) con una eficiencia del 80%.

En la curva estándar se interpolaron los valores de las muestras desconocidas, utilizando el programa matemático A5.2 (por P. R. Edwards, 1988) de la Organización Mundial de la Salud, que graficó la curva y la calibró por un modelo de cuatro parámetros logísticos.

4. Análisis estadístico

Cada experimento se repitió tres veces. Para comparar las respuestas entre los tratamientos, se utilizó la prueba de t de Student pareada. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $P < 0.05$.

RESULTADOS

1. Regulación de la síntesis de estradiol y efectos sobre el AMPc en cultivos primarios de células de la granulosa

Con la finalidad de evaluar los efectos de la PRL sobre la actividad esteroidogénica de cultivos de células de la granulosa se caracterizaron los diferentes mecanismos hormonales y de señalización intracelular responsables de la síntesis de estradiol. La incubación de las células de la granulosa en presencia de diferentes concentraciones de la hormona foliculo estimulante ó FSH (Fig. 1-A) provocó, de manera dependiente de la dosis, el aumento significativo en la síntesis de estradiol secretada al medio de cultivo, así como en el contenido total de AMP cíclico (AMPc). La dosis de 5 mUI/pozo de FSH logró la máxima estimulación sobre ambos marcadores de respuesta hormonal por lo que se utilizó esta dosis estimulatoria en experimentos posteriores. De manera similar, la incubación en presencia de concentraciones crecientes de un estimulador de proteínas Gs y de la adenilato ciclasa con toxina del cólera (Fig. 1-B) y la forskolina (Fig. 1-C) respectivamente, indujo de manera dosis-dependiente el aumento significativo en el contenido de estradiol en el medio de cultivo y del AMPc total. Por otra parte, la incubación en presencia de un análogo no hidrolizable del AMPc, el 8 Br-AMPc (Fig. 1-D), resultó también en el aumento significativo dosis-dependiente del contenido de estradiol en los medios de cultivo. Estos resultados nos permiten validar al cultivo de células de la granulosa como un modelo adecuado para evaluar los efectos biológicos in vitro de la FSH, así como de los mecanismos de señalización intracelular implicados en sus mecanismos de acción sobre la esteroidogénesis ovárica.

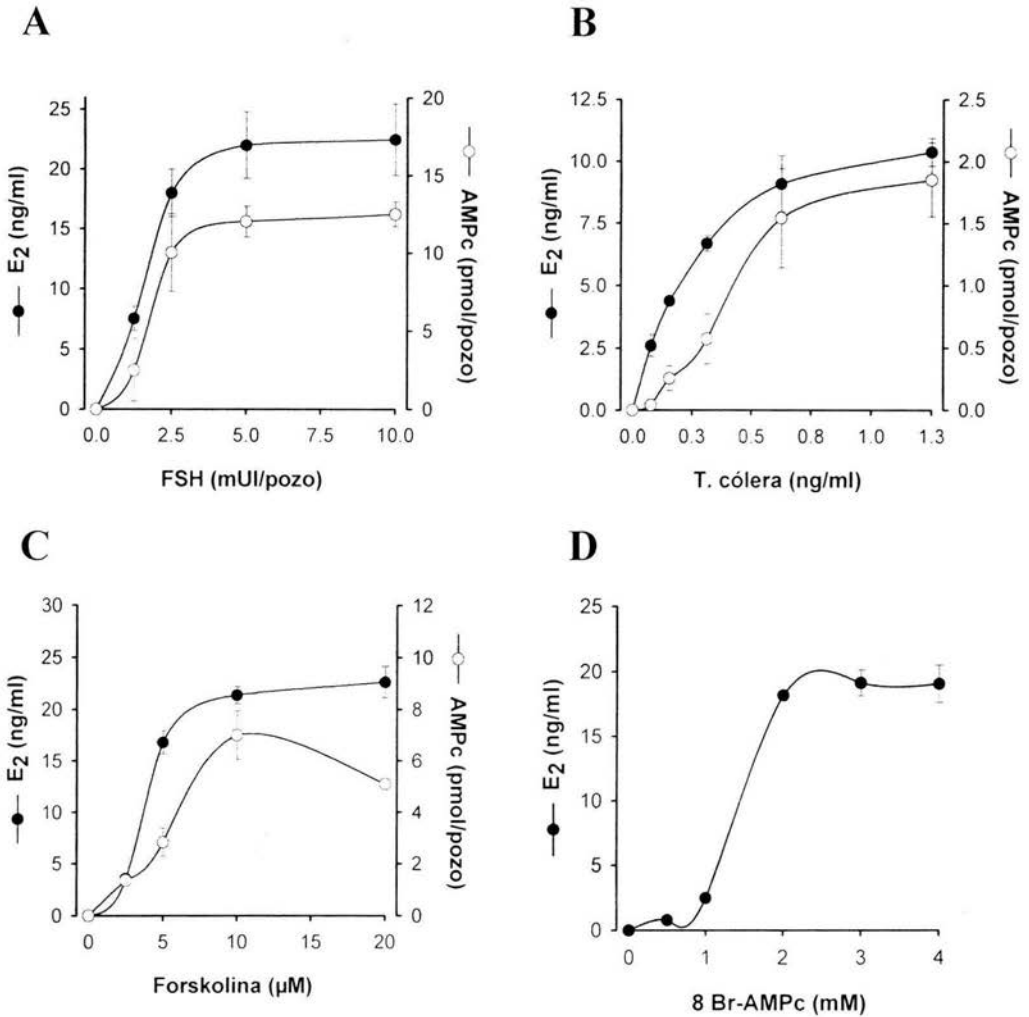


Figura 1. Efecto de la estimulación de diferentes activadores de la vía dependiente de proteína cinasa A en la síntesis de estradiol y la acumulación de AMPc en las células de la granulosa en cultivo; FSH (A), tóxima del cólera (B), forskolina (C) u 8 Br-AMPC (D). Los resultados están expresados como la media \pm DE de triplicados de pozo.

2. Efectos de la PRL en la síntesis de estradiol mediada por la FSH en las células de la granulosa

Existen informes en la literatura describiendo el efecto inhibitorio de la prolactina (PRL) en la actividad de la citocromo P450 aromatasa (enzima responsable de la aromatización o bioconversión de los andrógenos a estrógenos) en células de la granulosa mantenidas en cultivo (51,52,56); sin embargo, los mecanismos y sitios de acción de este efecto no se conocen bien en la actualidad. En la Fig. 2 se muestra el efecto de la PRL sobre la síntesis de estradiol y de AMPc en las células de la granulosa. Como puede observarse la presencia de una preparación purificada de PRL humana (hPRL) inhibió de manera significativa y dosis-dependiente la síntesis de estradiol inducida por la FSH (Fig. 2-A). De manera similar, la estimulación de la síntesis de estradiol y AMPc por la toxina del cólera (Fig. 2-B) y la forskolina (Fig. 2-C) y del estradiol por el 8 bromo AMPc (Fig. 2-D) fue inhibida en presencia de dosis crecientes de PRL humana en el medio de cultivo. Las dosis inhibitorias de la PRL al 50% (ID50) sobre la estimulación de la esteroidogénesis inducida por la FSH, toxina del cólera, forskolina y el 8 bromo AMPc fueron similares, con pequeñas variaciones dependiendo del factor estimulador: 70 ± 6 , 64 ± 3 , 78 ± 4 y 62 ± 3 ng/ml, respectivamente.

3. Efecto de anticuerpo anti-receptor de PRL en la síntesis de estradiol y AMPc en las células de la granulosa estimuladas con FSH u 8 Br-AMPc

Con la finalidad de verificar la especificidad de los efectos de la PRL a nivel del receptor, se evaluó si la adición de anticuerpo anti-receptor de PRL de rata (Ac rRPRL) mimetizaba el efecto inhibitorio de la PRL sobre

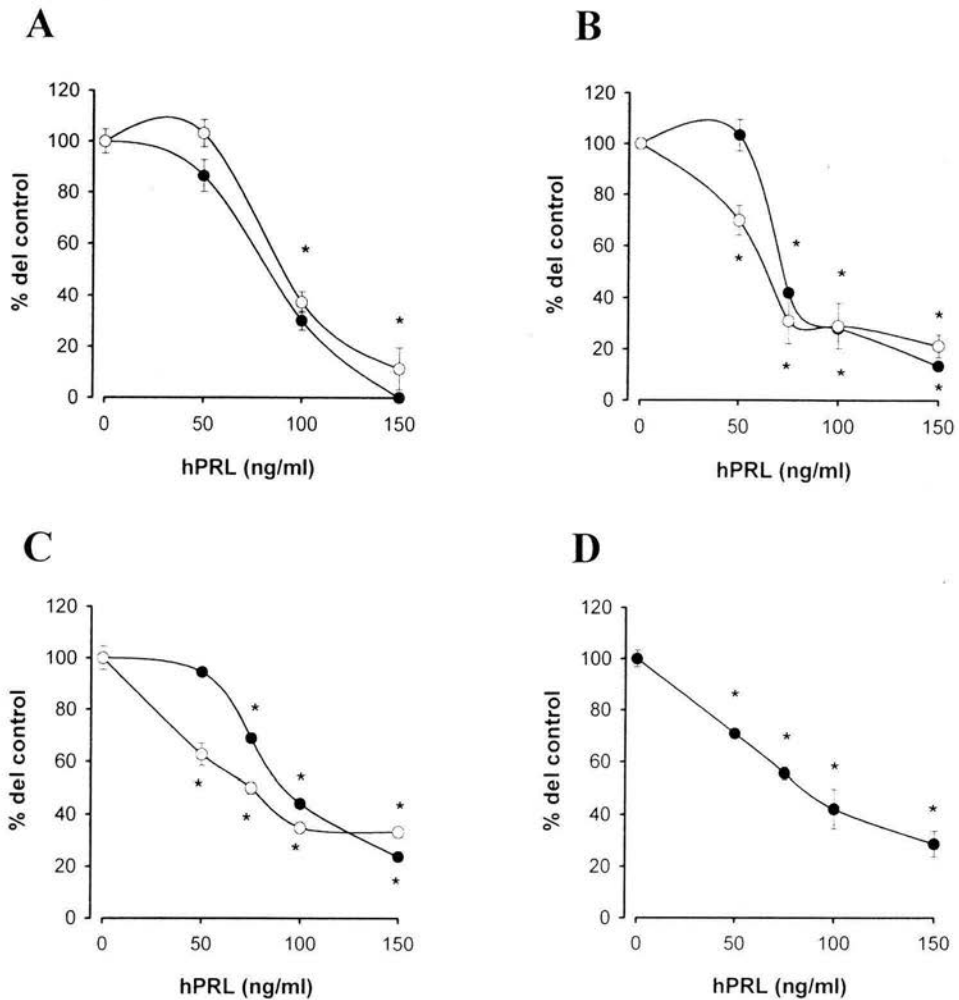


Figura 2. Efecto de concentraciones crecientes de PRL en la síntesis de estradiol (—●—) y la acumulación de AMPc (—○—) en células de la granulosa incubadas en presencia de FSH (A), toxina del cólera (B), forskolina (C) u 8 Br-AMPC (D). Los resultados están expresados como la media \pm DE de triplicados de pozo. * $P < 0.05$ vs 0 ng/ml PRL.

la síntesis de estradiol inducida por la FSH en las células de la granulosa. Este anticuerpo ha sido previamente probado y ha mostrado tener un efecto agonista en el bioensayo de células Nb2, que son dependientes de la PRL para su proliferación (57). Las células fueron cultivadas durante 72 hr en presencia de 5 mUI de FSH humana y cualquiera de los siguientes estímulos: 100 ng/ml de PRL, anticuerpo anti-receptor de PRL de rata o anticuerpo anti-PRL de rata. El anticuerpo anti-PRL de rata se utilizó como control de los efectos de una inmunoglobulina no relacionada con el receptor de PRL. Al término de la incubación se cuantificó el estradiol en el medio de cultivo y la acumulación de AMPc total. La estimulación de las células de la granulosa con el anticuerpo anti-receptor de PRL inhibió de manera significativa la síntesis de estradiol y de AMPc inducidos por la FSH, así como lo hace la adición de 100 ng/ml de PRL (Fig. 3-A). De manera paralela, cuando el 8 Br-AMPc se utilizó como inductor de la síntesis de estradiol, el anticuerpo anti-receptor de PRL produjo también un efecto inhibitorio (Fig. 3-B). Además, la adición de anticuerpo anti-PRL de rata no modificó de manera significativa la síntesis de estradiol y de AMPc inducidos por cualquiera de los activadores de la vía de la proteína cinasa A la proteína A: la FSH (Fig. 3-A) o el 8 Br-AMPc (Fig. 3-B).

4. Efectos de la activación de la proteína cinasa C en la síntesis de estradiol mediada por activadores de cinasas de proteína A en las células de la granulosa.

La activación de proteína cinasa C (PKC) en las células de la granulosa se acompaña de la inhibición de los mecanismos responsables de la estimulación de la síntesis de estradiol inducida por la FSH (58,59). Cabe señalar, que la activación tanto de cinasas de serinas/treoninas como de tirosinas constituyen eventos tempranos en la señalización intracelular de la PRL, que ocurren como consecuencia de la interacción

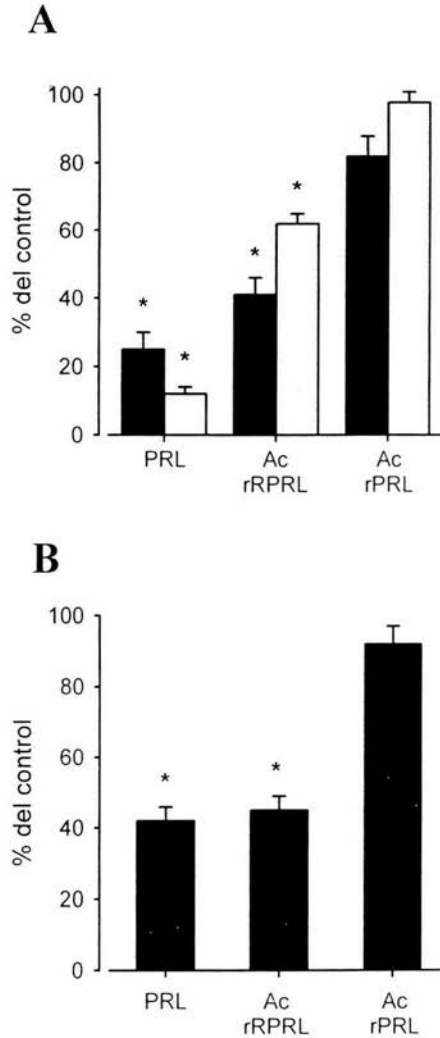


Figura 3. Efecto de 100 ng/ml de PRL y de 5 μ g de anticuerpo anti-receptor de PRL de rata (Ac rRPRL) en la síntesis de estradiol (■) y la acumulación de AMPc (□) inducidos por 5 mUI de FSH (A) ó 2 mM de 8 Br-AMPc (B) en las células de la granulosa en cultivo. Se utilizó como control la estimulación de las células con 5 μ g de anticuerpo anti-PRL de rata (Ac rPRL). Los resultados están expresados como la media \pm DE de triplicados de pozo. *P<0.05 vs 100% del control.

de esta hormona con sus receptores en los órganos blanco (26,37,60).

Con la finalidad de estudiar la asociación que existe entre la PRL con los mecanismos de activación de la PKC en relación con su efecto inhibitorio en la acción de la FSH sobre la síntesis de estradiol, se investigaron los efectos de estimuladores e inhibidores de la PKC en células de la granulosa estimuladas con FSH en presencia o ausencia de la PRL. La activación de la PKC con el TPA ocasionó la reducción significativa de estradiol en los medios de cultivo cuando se estimularon con FSH (Fig. 4-A), toxina del cólera (Fig. 4-B), forskolina (Fig. 4-C) u 8 Br-AMPC (Fig. 4-D). La estimulación con TPA inhibió de manera similar la acumulación en los medios de cultivo del AMPc inducido por FSH (Fig. 4-A) o toxina del cólera (Fig. 4-B), con excepción de los cultivos estimulados con la forskolina (Fig. 4-C). Otro activador conocido de la PKC, que se une a receptores acoplados a proteínas Gq, es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) (61). La GnRH, además de activar a la PKC, inhibe la esteroidogénesis en las células de la granulosa (62,63), por lo que también se utilizó para estimular el sistema celular. La GnRH inhibió significativamente la síntesis de estradiol y de AMPc inducidos por la FSH (Fig. 5-A), forskolina (Fig. 5-B) u 8 Br-AMPC (Fig. 5-C).

Con la finalidad de estudiar si estos efectos se encuentran asociados con la actividad inhibitoria de la PRL en la síntesis de estradiol, se llevaron a cabo incubaciones en presencia de un inhibidor específico de la actividad de PKC, la calfofostina C, en cultivos estimulados con FSH en presencia de PRL o TPA. La presencia de calfofostina C restauró de manera dosis dependiente el efecto de la PRL (Fig. 6-A) y del TPA (Fig. 6-B) sobre la síntesis de estradiol y la generación de AMPc inducidos por la FSH en las células de la granulosa.

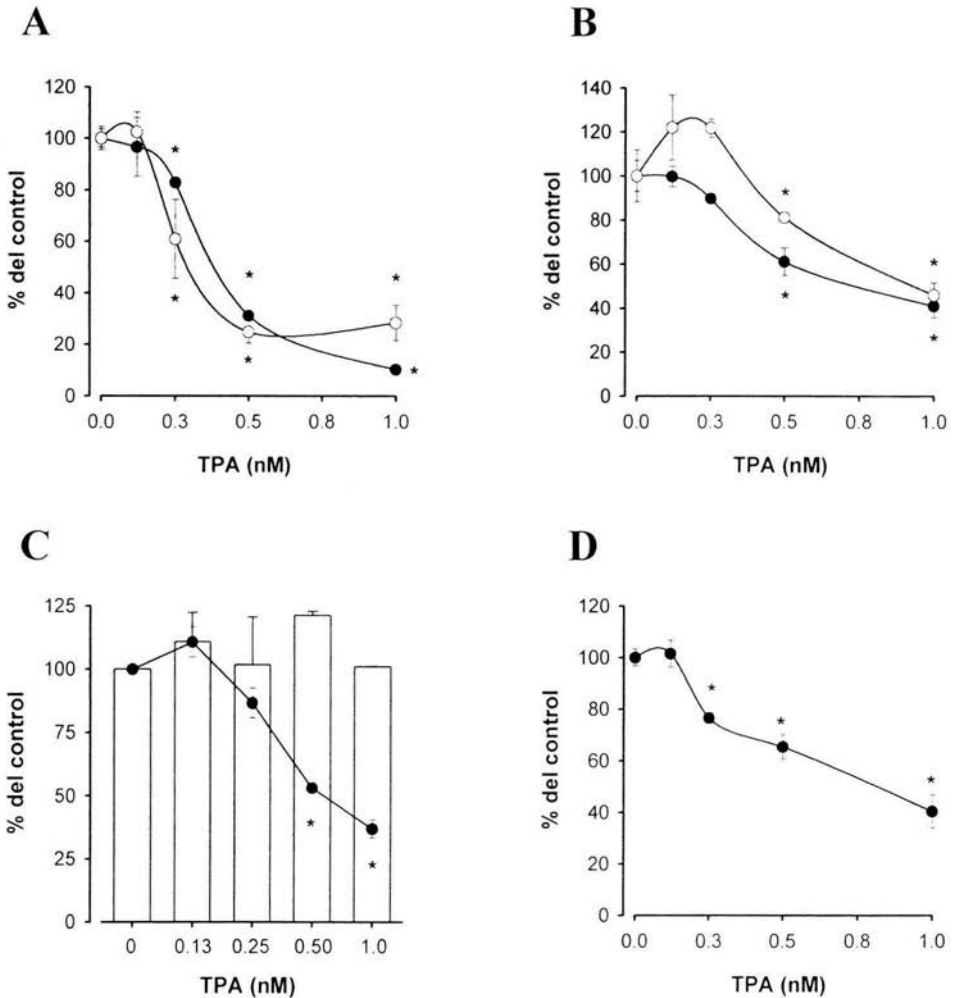


Figura 4. Efecto de concentraciones crecientes de TPA en la síntesis de estradiol (—●—) y la acumulación de AMPc (—○— ó □) en células de la granulosa incubadas en presencia de FSH (A), toxina del cólera (B), forskolina (C) u 8 Br-AMPc (D). Los resultados están expresados como la media ± DE de triplicados de pozo. * P<0.05 vs 0 nM de TPA.

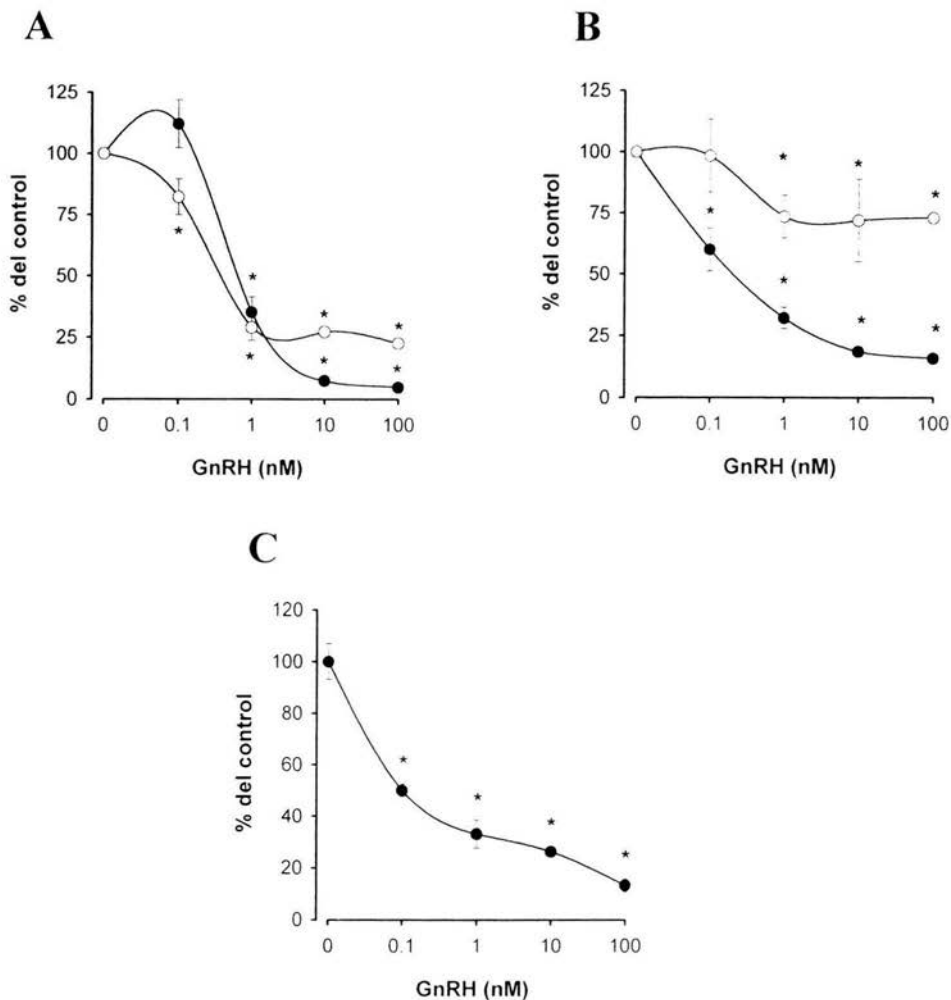


Figura 5. Efecto de concentraciones crecientes de GnRH en la síntesis de estradiol (—●—) y la acumulación de AMPc (—○—) en células de la granulosa incubadas en presencia de FSH (A), forskolina (B), u 8 Br-AMPc (C). Los resultados están expresados como la media \pm DE de triplicados de pozo. * $P < 0.05$ vs 0 nM de GnRH.

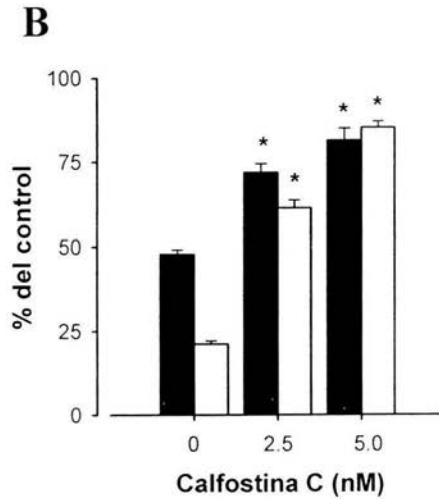
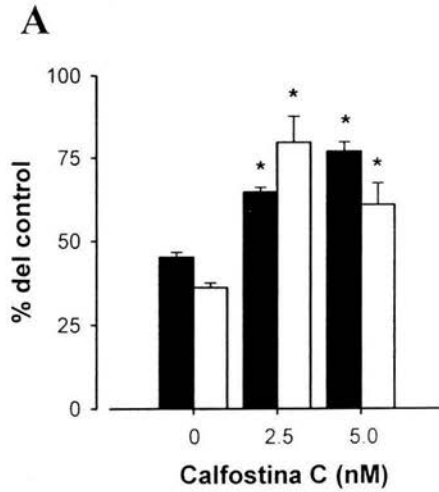


Figura 6. Efecto de calfofostina C en la respuesta inhibitoria de PRL (A) y TPA (B) sobre la síntesis de estradiol (■) y la acumulación de AMPc (□). Las células de la granulosa fueron incubadas con 5 mUI de FSH y 100 ng/ml de PRL ó 0.5 nM de TPA y pre-incubadas con calfofostina C durante 30 min. Los resultados están expresados como la media ± DE de triplicados de pozo. * P<0.05 vs 0 nM de calfofostina C.

5. Participación de las proteínas Gi en el efecto inhibitorio de la PRL en la esteroidogénesis en las células de la granulosa.

La participación de las proteínas Gi en el mecanismo de acción de la PRL ha sido informada en estudios previos (64), por lo que se investigó su posible activación por la PRL en el efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis en las células de la granulosa. La toxina pertussis promueve la ADP ribosilación de la subunidad G α i con la consecuente inhibición de las proteínas Gi. Con la finalidad de evaluar la activación de las proteínas Gi por PRL, se estimularon las células con toxina pertussis en presencia de FSH y PRL. La adición de diferentes concentraciones de la

toxina pertussis provocó el aumento de manera significativa del contenido de estradiol en los medios de cultivo y del AMPc total estimulados con FSH y PRL (Fig. 7-A). Por otra parte, para evaluar si la activación de la PKC participaba en la activación de las proteínas Gi se estimularon las células con toxina pertussis en presencia de FSH y TPA. La adición de la toxina pertussis no modificó el efecto inhibitorio del TPA en la síntesis de estradiol y de AMPc inducidos por la FSH (Fig. 7-B).

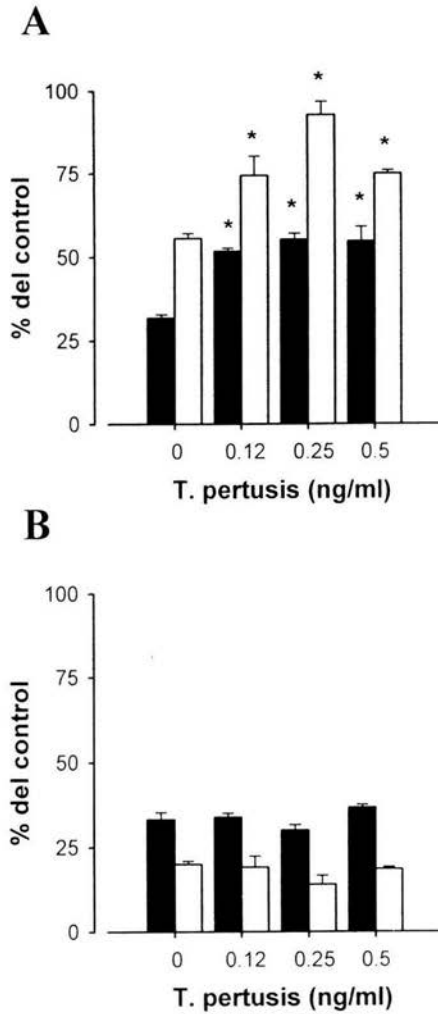


Figura 7. Efecto de diferentes dosis de toxina pertusis en la respuesta inhibitoria de PRL (A) y TPA (B) sobre la síntesis de estradiol (■) y la acumulación de AMPc (□). Las células de la granulosa fueron incubadas con 5 mUI de FSH y 100 ng/ml de PRL ó 0.5 nM de TPA. Los resultados están expresados como la media \pm DE de triplicados de pozo. * $P < 0.05$ vs 0 ng/ml de toxina pertusis.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio demuestran que la prolactina (PRL) ejerce su efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la hormona foliculo estimulante (FSH) (Fig. 4) a través de la activación de la proteína cinasa C (PKC) (Fig. 8) y de las proteínas G inhibitorias (Gi) (Fig. 9). La habilidad tanto de la PRL como de activadores de la PKC de inhibir la síntesis de estradiol confirma evidencias previas en estudios realizados en las células de la granulosa (51,52,58,59). Lo anterior aunado a la capacidad, tanto de un inhibidor de la PKC como de un inhibidor de las proteínas Gi, de revertir el efecto inhibitorio de la PRL en la síntesis de estradiol y de AMP cíclico (AMPc) permitió sugerir un mecanismo por el que esta hormona ejerce su acción en la síntesis de estrógenos inducida por la FSH en el ovario (Fig. 8 y 9). En este trabajo se validó la utilización de cultivos primarios de células de la granulosa obtenidas de ratas hembras pre-tratadas con dietilestilbestrol como modelo experimental para el estudio del mecanismo de acción de factores hormonales que llevan a cabo sus efectos a través de segundos mensajeros como el AMPc. A este respecto, la estimulación 1) de proteínas G estimulatorias (Gs) por la activación del receptor membranal de la FSH y por la toxina del cólera, 2) de la adenilato ciclasa por forskolina y 3) a nivel del AMPc con el uso de un análogo no hidrolizable de este nucleótido cíclico, el 8-Br AMPc demostraron la integridad funcional de esta vía de transducción de señal responsable de la síntesis de estradiol por las células de la granulosa.

Por mucho tiempo se supo que la inhibición de la función ovárica en presencia de altas concentraciones circulantes de PRL estaba asociada con la reducción en la secreción de las gonadotrofinas hipofisarias y con

el deterioro en la retroalimentación positiva de los estrógenos sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria (50,65,66). Sin embargo, existe ya suficiente evidencia que demuestra el efecto inhibitorio directo de la PRL en el ovario que incide en la secreción tanto de progesterona como de estradiol en modelos humanos y de rata (51,52,56,67,68). Los resultados del presente trabajo indican que el efecto inhibitorio de la PRL en la síntesis de estradiol por las células de la granulosa es a través de la interacción con su receptor, dado que los cultivos incubados en presencia de un anticuerpo anti-receptor de PRL resultaron en el efecto agonista de las acciones de la PRL, lo que implica un mecanismo de homodimerización del receptor inducida por el ligando o por el anticuerpo, previamente descrita (57).

Con los resultados del presente estudio, se pudo dilucidar el sitio de acción de la PRL en el que interfiere con la aromatización inducida por la FSH, dependiente o independiente de la activación de la PKC. La utilización del TPA que mimetiza la acción del diacilglicerol para estimular a la PKC, a través de aumentar su afinidad por el calcio, inhibió de manera dependiente de la dosis la síntesis de estradiol y de AMPc inducidos por la FSH. Otro activador de la PKC, la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), que se une a su receptor membranal acoplado a proteínas Gq y activa a la PKC a través de la vía de fosfatidil inositol (69), también inhibió de manera dosis-dependiente la síntesis de estradiol inducida por la FSH. De manera similar, la incubación de las células en presencia de PRL, cuyo mecanismo es mediado por la activación de cinasas de tirosina (TK) acopladas al receptor de la PRL (59), afectó negativamente la estimulación de la esteroidogénesis inducida por la FSH. Estas observaciones en su conjunto nos permiten sugerir la presencia de vías de comunicación entre segundos mensajeros responsables de la transducción de señales de diferentes ligandos sobre la actividad de receptores membranales acoplados a proteínas G (Fig. 8 y 9). Hallazgos

interesantes en este estudio fueron los efectos inhibitorios de la PRL en la esteroidogénesis y en la acumulación de AMPc inducida por la FSH, la toxina del cólera y la forskolina, sugiriendo que el sitio de acción de la hormona se encuentra previo a la generación de este segundo mensajero. Estas observaciones condujeron a suponer cambios en la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa y/o alteraciones en las proteínas Gs provocados por la PRL a través de la activación de la PKC. En este sentido, la activación de la PKC por el TPA inhibió la síntesis de estradiol y el contenido total de AMPc inducidos por la toxina del cólera, pero no así por la forskolina, ya que sólo inhibió la síntesis de estradiol sin provocar cambios significativos en el contenido total de AMPc. Prácticamente los mismos resultados se obtuvieron al incubar las células con la GnRH, que inhibió la síntesis de estradiol y el contenido total de AMPc inducidos por la forskolina, siendo menos efectivo que la PRL en el efecto sobre el segundo mensajero, pero alcanzando significancia estadística. Estos resultados sugieren que los efectos inhibitorios de la PRL a través de la PKC no involucran la actividad catalítica de la adenilato ciclasa y posiblemente utilice otras vías de señalización adicionales e independientes de la PKC implicadas en las acciones de la PRL en la esteroidogénesis ovárica (Fig. 9).

Otro punto de estudio fue las proteínas G. La incubación de las células con PRL o con TPA inhibió la síntesis de estradiol y de AMPc inducidos por la toxina del cólera. Estos resultados sugieren que la PRL modifica la actividad de las proteínas Gs y que la PKC está implicada en esta acción (Fig. 8). Adicionalmente, el tratamiento de las células con diferentes dosis de un inhibidor de las proteínas Gi, la toxina pertussis, revertió el efecto inhibitorio de la PRL tanto en la síntesis de estradiol como de AMPc. Algunos autores han informado que la toxina pertussis bloquea algunos de los efectos mediados por la insulina, cuyo receptor tiene actividad intrínseca de TK (70). Aunque el receptor de la PRL no tiene ninguna

relación estructural con los receptores acoplados a proteínas G, evidencias previas han demostrado que existe un enlace entre los mecanismos de transducción de señal de los receptores acoplados a proteínas G y los receptores con actividad de TK ya sea intrínseca o asociada. Esta interacción puede estar dada por la posibilidad de que los receptores acoplados a proteína G induzcan cascadas de fosforilación en residuos de tirosina o que las proteínas G sirvan como sustrato de las TK, activándolas y permitiendo que interactúen con moléculas que se pensaba sólo eran activadas por receptores TK (71,72). También se ha demostrado la participación de las cinasas de la familia Src en la señalización corriente abajo a la generación de las subunidades $G\beta\gamma$, producto de la activación de G_i , para la activación de las proteínas cinasas activadoras de la mitosis o MAPK (71,73), representando éstas un punto de convergencia entre receptores acoplados a TK, proteínas G y posiblemente la activación de PKC. Además, estudios previos demuestran la participación de las proteínas G sensibles a la toxina pertussis en el efecto mitogénico que la PRL ejerce en el sistema celular Nb2 (64) y que la PRL afecta a la ADP ribosilación de las proteínas G en este sistema (74). Adicionalmente, estudios hechos en células de Leydig MA-10 informaron que la estimulación con PRL inhibió la activación de una proteína G dependiente de la toxina pertussis (75). En este estudio, la posibilidad de una asociación entre el receptor de la PRL y el receptor de la FSH a través de interactuar con proteínas G_i se investigó en incubaciones de células de la granulosa en presencia de toxina pertussis. Los resultados en este trabajo demostraron la participación de las proteínas G_i en los mecanismos de acción inhibitoria de la PRL sobre la actividad esteroidogénica inducida por la FSH en las células de la granulosa (Fig. 9). Sin embargo, la toxina pertussis no modificó el efecto inhibitorio que produjo la activación de la PKC con el TPA. Este mecanismo explica, en parte, las acciones de la PRL previas a la

generación de AMPc y demuestra que no está implicada a nivel de las proteínas Gi la activación de la PKC en el efecto de la PRL.

El hecho de que la activación de la PKC con el TPA no modificara el contenido total de AMPc pero sí la síntesis de estradiol inducida por forskolina, sugería un sitio de acción posterior a la generación de este segundo mensajero en donde actuara la PRL a través de la activación de la PKC. Así, la inhibición producida por la PRL o el TPA en presencia del análogo no hidrolizable del AMP, el 8-Br AMPc, confirmaron que también había un sitio de acción posterior al segundo mensajero que implicaba la acción de la PKC (Fig. 8). La incubación de las células con el inhibidor de la PKC en presencia de PRL condujo a la restauración de la actividad estimuladora de la FSH sobre la síntesis de estradiol y de AMPc. Sin embargo, como se mencionó anteriormente, la ausencia de efectos de la PKC sobre la generación de AMP cíclico inducida por forskolina sugiere que, aunque la PRL utilice la activación de la PKC para interferir con la esteroidogénesis ovárica, también participen otras vías de señalización independientes de la PKC implicadas en las acciones de la PRL.

En resumen, el presente trabajo de tesis permite establecer que los sitios de acción de la PRL sobre la esteroidogénesis en las células de la granulosa son tanto previos como posteriores a la generación de AMPc. El mecanismo de acción de la PRL es complejo e implica procesos relacionados tanto con la activación de receptores acoplados a TK como con aquéllos acoplados a proteínas G y a la PKC (Fig. 8 y 9). Antes de la producción de AMPc, la PRL interfiere a nivel de las proteínas Gs, probablemente a través de la activación de la PKC (Fig. 8), y a nivel de las proteínas Gi y de la adenilato ciclasa, utilizando una vía independiente de la PKC (Fig. 9), mientras que el efecto posterior a la producción del nucleótido cíclico lo ejerce a través de la activación de la PKC (Fig. 8). La intercomunicación entre las vías de los receptores acoplados a proteínas

G y los que tienen actividad de TK se hace patente en el mecanismo de acción de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la FSH, siendo probablemente las MAPK el sitio de encuentro entre las dos vías.

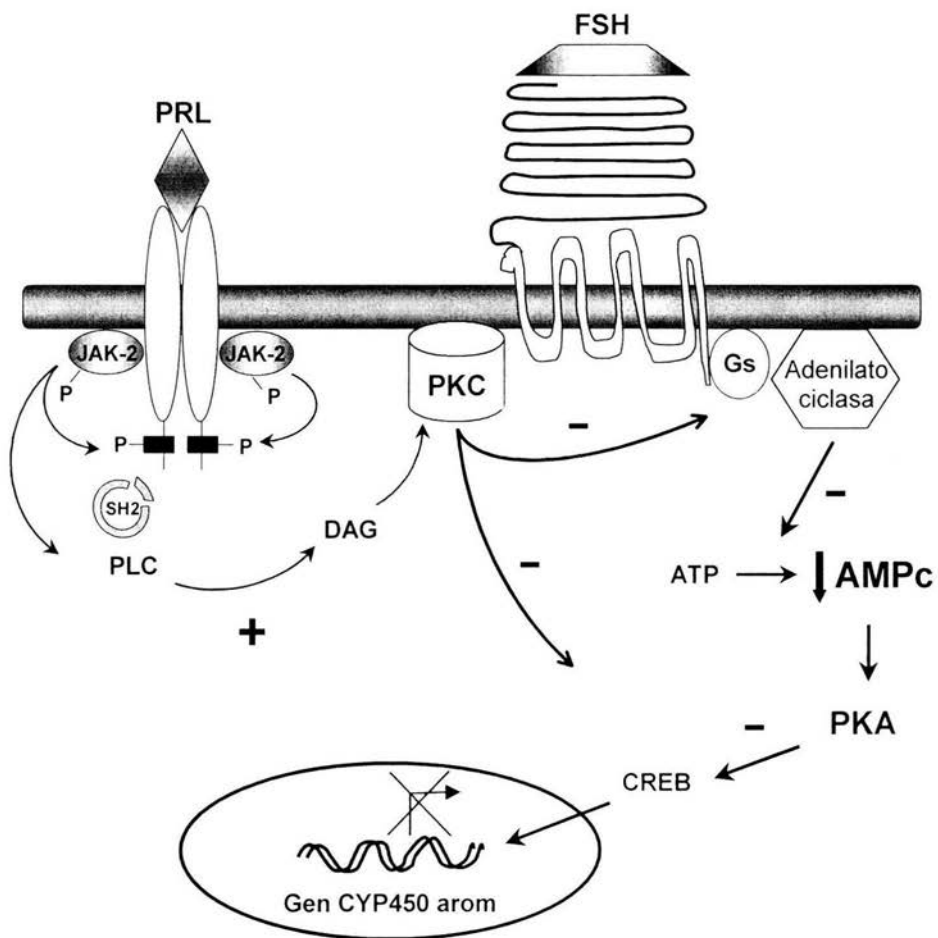


Figura 8. Mecanismo de transducción de señal propuesto para la PRL en el efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la FSH, dependiente de la PKC.

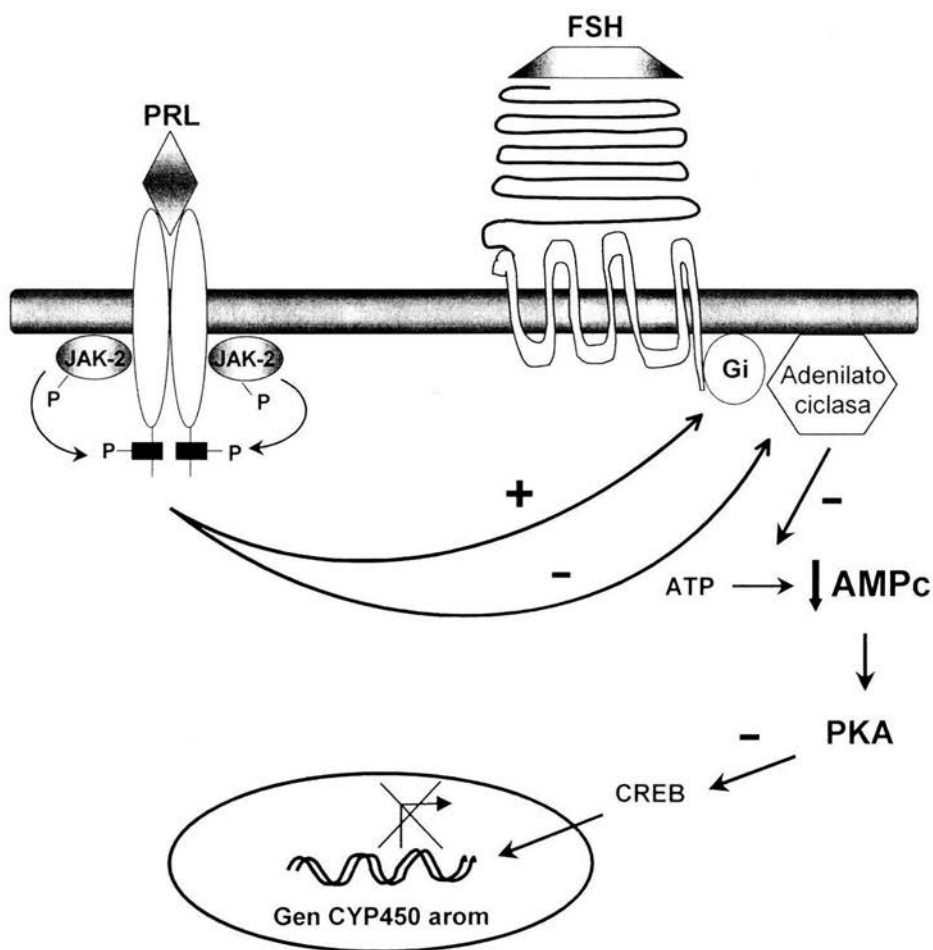


Figura 9. Mecanismo de transducción de señal propuesto para la PRL en el efecto inhibitorio sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la FSH, independiente de la PKC.

CONCLUSIONES

1. La PRL inhibe la esteroidogénesis ovárica inducida por la FSH a través de la interacción con receptores específicos presentes en las células de la granulosa, implicando la dimerización del receptor en el mecanismo de acción.
2. Los sitios de acción de la PRL dependientes de la activación de la PKC están a nivel de las proteínas G sensibles a la toxina del cólera y posterior a la generación de AMPc por la FSH.
3. Los sitios de acción de la PRL independientes de la activación de la PKC están a nivel de las proteínas G sensibles a la toxina pertussis y a nivel de la activación de la adenilato ciclasa por la FSH.
4. La vía de señalización de los receptores TK como el de la PRL se comunica estrechamente con la vía de señalización de los receptores acoplados a proteínas G, como el de la FSH, para derivar en un efecto biológico, que es la regulación de la esteroidogénesis en las células de la granulosa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Shome B, Parlow AF. Human pituitary prolactin (hPRL): the entire linear amino acid sequence. *J Clin Endocrinol Metab* 1977; 45: 1112-1115.
2. Cooke NE, Coit D, Shine J, Baxter JD, Martial JA. Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem* 1981; 256: 4007-4016.
3. Maurer RA, Stone R, Gorski J. Cell-free synthesis of a large translation product of prolactin messenger RNA. *J Biol Chem* 1976; 251: 2801-2807.
4. Sinha YN. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocr Rev* 1995; 16: 354-369.
5. Ben-Jonathan N, Hnasko R. Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 2001; 22: 724-763.
6. Neill J, Nagy GM. Prolactin Secretion and Its Control. En: *The Physiology of Reproduction*. Neill (eds.). Raven Press. 1994: 1833-1860.
7. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 1998; 19: 225-268.
8. Arden KC, Boutin JM, Djiane J, Kelly PA, Cavenee WK. The receptors for prolactin and growth hormone are localized in the same region of human chromosome 5. *Cytogenet Cell Genet* 1990; 53: 161-165.
9. Shirota M, Banville D, Ali S, Jolicoeur C, Boutin JM, Edery M, Djiane J, Kelly PA. Expression of two forms of prolactin receptor in rat ovary and liver. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 1136-1143.
10. Ali S, Pellegrini I, Kelly PA. A prolactin-dependent immune cell line (Nb2) expresses a mutant form of prolactin receptor. *J Biol Chem* 1991; 266: 20110-20117.
11. Nagano M, Chastre E, Choquet A, Bara J, Gespach C, Kelly PA. Expression of prolactin and growth hormone receptor genes and their isoforms in the gastrointestinal tract. *Am J Physiol* 1995; 268: G431-442.
12. Shiu RP, Elsholtz HP, Tanaka T, Friesen HG, Gout PW, Beer CT, Noble RL. Receptor-mediated mitogenic action of prolactin in a rat lymphoma cell line. *Endocrinology* 1983; 113: 159-165.
13. Postel-Vinay MC, Belair L, Kayser C, Kelly PA, Djiane J. Identification of prolactin and growth hormone binding proteins in rabbit milk. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 6687-6690.

14. Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991; 12: 235-251.
15. Taga T, Kishimoto T. Cytokine receptors and signal transduction. *Faseb J* 1992; 6: 3387-3396.
16. Wells JA, de Vos AM. Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 609-634.
17. DaSilva L, Howard OM, Rui H, Kirken RA, Farrar WL. Growth signaling and JAK2 association mediated by membrane-proximal cytoplasmic regions of prolactin receptors. *J Biol Chem* 1994; 269: 18267-18270.
18. Jabbour HN, Kelly PA. Prolactin receptor subtypes: a possible mode of tissue specific regulation of prolactin function. *Rev Reprod* 1997; 2: 14-18.
19. Gertler A, Grosclaude J, Strasburger CJ, Nir S, Djiane J. Real-time kinetic measurements of the interactions between lactogenic hormones and prolactin-receptor extracellular domains from several species support the model of hormone-induced transient receptor dimerization. *J Biol Chem* 1996; 271: 24482-24491.
20. Goffin V, Kinet S, Ferrag F, Binart N, Martial JA, Kelly PA. Antagonistic properties of human prolactin analogs that show paradoxical agonistic activity in the Nb2 bioassay. *J Biol Chem* 1996; 271: 16573-16579.
21. Kinet S, Goffin V, Mainfroid V, Martial JA. Characterization of lactogen receptor-binding site 1 of human prolactin. *J Biol Chem* 1996; 271: 14353-14360.
22. Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. Quantitative analysis by polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 1994; 269: 13337-13345.
23. Ouhtit A, Morel G, Kelly PA. Visualization of gene expression of short and long forms of prolactin receptor in rat reproductive tissues. *Biol Reprod* 1993; 49: 528-536.
24. Rui H, Djeu JY, Evans GA, Kelly PA, Farrar WL. Prolactin receptor triggering. Evidence for rapid tyrosine kinase activation. *J Biol Chem* 1992; 267: 24076-24081.
25. Carey GB, Liberti JP. Inhibition of tyrosine kinase activity abolishes anabolic and mitogenic effects of prolactin and growth hormone in Nb2 cells. *Biochem Mol Biol Int* 1993; 31: 635-642.
26. Rui H, Kirken RA, Farrar WL. Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. *J Biol Chem* 1994; 269: 5364-5368.
27. Lebrun JJ, Ali S, Sofer L, Ullrich A, Kelly PA. Prolactin-induced proliferation of Nb2 cells involves tyrosine phosphorylation of the prolactin

- receptor and its associated tyrosine kinase JAK2. *J Biol Chem* 1994; 269: 14021-14026.
28. Campbell GS, Argetsinger LS, Ihle JN, Kelly PA, Rillema JA, Carter-Su C. Activation of JAK2 tyrosine kinase by prolactin receptors in Nb2 cells and mouse mammary gland explants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 5232-5236.
 29. Piccoletti R, Bendinelli P, Maroni P. Signal transduction pathway of prolactin in rat liver. *Mol Cell Endocrinol* 1997; 135: 169-177.
 30. Gouilleux F, Wakao H, Mundt M, Groner B. Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J* 1994; 13: 4361-4369.
 31. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 1992; 258: 607-614.
 32. Hunter T, Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell* 1992; 70: 375-387.
 33. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature* 1988; 334: 661-665.
 34. Crowe PD, Buckley AR, Zorn NE, Rui H. Prolactin activates protein kinase C and stimulates growth-related gene expression in rat liver. *Mol Cell Endocrinol* 1991; 79: 29-35.
 35. Pasqualini C, Guibert B, Frain O, Leviel V. Evidence for protein kinase C involvement in the short-term activation by prolactin of tyrosine hydroxylase in tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *J Neurochem* 1994; 62: 967-977.
 36. DeVito WJ, Avakian C, Stone S, Okulicz WC. Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes is mediated by a protein kinase C-dependent mechanism. *J Neurochem* 1993; 60: 832-842.
 37. Fan G, Rillema JA. Prolactin stimulation of protein kinase C in isolated mouse mammary gland nuclei. *Horm Metab Res* 1993; 25: 564-568.
 38. Amsterdam A, Rotmensch S. Structure-function relationships during granulosa cell differentiation. *Endocr Rev* 1987; 8: 309-337.
 39. Halvorson L, Chin WW. Hormonas gonadotróficas: biosíntesis, secreción, receptores y acción. En: *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Yen S, Jaffe RB, Barbieri RL (eds.). Panamericana. 2001: 86-117.
 40. Fitzpatrick SL, Richards JS. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology* 1991; 129: 1452-1462.
 41. Armstrong DT, Papkoff H. Stimulation of aromatization of exogenous and endogenous androgens in ovaries of hypophysectomized

- rats in vivo by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology* 1976; 99: 1144-1151.
42. Yeh J, Adashi EY. El ciclo ovárico. En: *Endocrinología de la reproducción. Fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. Yen S, Jaffe RB, Barbieri RL (eds.). Panamericana. 2001: 164-202.
43. Fowler RE, Fox NL, Edwards RG, Walters DE, Steptoe PC. Steroidogenesis by cultured granulosa cells aspirated from human follicles using pregnenolone and androgens as precursors. *J Endocrinol* 1978; 77: 171-183.
44. Tsang BK, Armstrong DT, Whitfield JF. Steroid biosynthesis by isolated human ovarian follicular cells in vitro. *J Clin Endocrinol Metab* 1980; 51: 1407-1411.
45. Knecht M, Ranta T, Katz MS, Catt KJ. Regulation of adenylate cyclase activity by follicle-stimulating hormone and a gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology* 1983; 112: 1247-1255.
46. Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Hum Reprod Update* 1998; 4: 260-283.
47. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocr Rev* 1997; 18: 739-773.
48. Richards JS, Williams JJ. Luteal cell receptor content for prolactin (PRL) and luteinizing hormone (LH): regulation by LH and PRL. *Endocrinology* 1976; 99: 1571-1581.
49. Gitay-Goren H, Lindenbaum ES, Kraiem Z. Effects of prolactin on steroidogenesis and cAMP accumulation in rat luteal cell cultures. *Mol Cell Endocrinol* 1989; 65: 195-201.
50. Larrea F, Sandoval JL, Salinas E, Franco-Rodriguez VA, Mendez I, Ulloa-Aguirre A. Evidence for an altered luteinizing hormone sensitivity to naloxone in pathological hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1995; 43: 591-600.
51. Dorrington J, Gore-Langton RE. Prolactin inhibits oestrogen synthesis in the ovary. *Nature* 1981; 290: 600-602.
52. Dorrington JH, Gore-Langton RE. Antigonadal action of prolactin: further studies on the mechanism of inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat granulosa cell cultures. *Endocrinology* 1982; 110: 1701-1707.
53. Krasnow JS, Hickey GJ, Richards JS. Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Mol Endocrinol* 1990; 4: 13-12.

54. Jia XC, Hsueh AJ. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology* 1986; 119: 1570-1577.
55. Hunter WM, Greenwood FC. Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* 1962; 194: 495-496.
56. Wang C, Hsueh AJ, Erickson GF. Prolactin inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1980; 20: 135-144.
57. Elberg G, Kelly PA, Djiane J, Binder L, Gertler A. Mitogenic and binding properties of monoclonal antibodies to the prolactin receptor in Nb2 rat lymphoma cells. Selective enhancement by anti-mouse IgG. *J Biol Chem* 1990; 265: 14770-14776.
58. He H, Herington AC, Roupas P. Effect of protein kinase C modulation on gonadotrophin-induced granulosa cell steroidogenesis. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7: 83-95.
59. Villanueva LA, Mendez I, Ampuero S, Larrea F. The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod* 1996; 2: 725-731.
60. Buckley AR, Crowe PD, Russell DH. Rapid activation of protein kinase C in isolated rat liver nuclei by prolactin, a known hepatic mitogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1988; 85: 8649-8653.
61. Davis JS, West LA, Farese RV. Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) rapidly stimulates the formation of inositol phosphates and diacylglycerol in rat granulosa cells: further evidence for the involvement of Ca²⁺ and protein kinase C in the action of GnRH. *Endocrinology* 1986; 118: 2561-2571.
62. Hsueh AJ, Erickson GF. Extrapituitary action of gonadotropin-releasing hormone: direct inhibition ovarian steroidogenesis. *Science* 1979; 204: 854-855.
63. Hsueh AJ, Jones PB. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocr Rev* 1981; 2: 437-461.
64. Too CK, Murphy PR, Friesen HG. G-proteins modulate prolactin- and interleukin-2-stimulated mitogenesis in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology* 1989; 124: 2185-2192.
65. Matsuzaki T, Azuma K, Irahara M, Yasui T, Aono T. Mechanism of anovulation in hyperprolactinemic amenorrhea determined by pulsatile gonadotropin-releasing hormone injection combined with human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* 1994; 62: 1143-1149.

66. Sauder SE, Frager M, Case GD, Kelch RP, Marshall JC. Abnormal patterns of pulsatile luteinizing hormone secretion in women with hyperprolactinemia and amenorrhea: responses to bromocriptine. *J Clin Endocrinol Metab* 1984; 59: 941-948.
67. McNatty KP, Sawers RS, McNeilly AS. A possible role for prolactin in control of steroid secretion by the human Graafian follicle. *Nature* 1974; 250: 653-655.
68. Demura R, Ono M, Demura H, Shizume K, Oouchi H. Prolactin directly inhibits basal as well as gonadotropin-stimulated secretion of progesterone and 17 beta-estradiol in the human ovary. *J Clin Endocrinol Metab* 1982; 54: 1246-1250.
69. Ortmann O, Diedrich K. Pituitary and extrapituitary actions of gonadotrophin-releasing hormone and its analogues. *Hum Reprod* 1999; 14 Suppl 1: 194-206.
70. Goren HJ, Northup JK, Hollenberg MD. Action of insulin modulated by pertussis toxin in rat adipocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1985; 63: 1017-1022.
71. Malbon CC, Karoor V. G-protein-linked receptors as tyrosine kinase substrates: new paradigms in signal integration. *Cell Signal* 1998; 10: 523-527.
72. van Biesen T, Luttrell LM, Hawes BE, Lefkowitz RJ. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocr Rev* 1996; 17: 698-714.
73. Igishi T, Gutkind JS. Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to MAP kinase from both Gq and Gi-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244: 5-10.
74. Barkey RJ, Calvo JC, Dufau ML. Prolactin differentially affects bacterial toxin-induced ADP-ribosylation of Nb2 lymphoma cell membrane proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 1988; 156: 776-782.
75. Weiss-Messer E, Ber R, Barkey RJ. Prolactin and MA-10 Leydig cell steroidogenesis: biphasic effects of prolactin and signal transduction. *Endocrinology* 1996; 137: 5509-5518.