



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO

---

---

FACULTAD DE CIENCIAS

Papel de la prolactina y su receptor en la viabilidad de  
las líneas celulares de pulmón A549, SK-LU-1 y  
BEAS-2B

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Anaiza Rico Luna



DIRECTOR DE TESIS:  
Dr. Edgar Vergara Castañeda  
Ciudad Universitaria, CD. MX., 2021



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.

FACULTAD DE CIENCIAS  
Secretaría General  
División de Estudios Profesionales

Votos Aprobatorios

LIC. IVONNE RAMÍREZ WENCE  
Directora General  
Dirección General de Administración Escolar  
Presente

Por este medio hacemos de su conocimiento que hemos revisado el trabajo escrito titulado:

**Papel de la prolactina y su receptor en la viabilidad de las líneas celulares de pulmón A549, SK-LU-1 y BEAS-2B**

realizado por **Anaiza Rico Luna** con número de cuenta **416063525** quien ha decidido titularse mediante la opción de tesis en la licenciatura en **Biología**. Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Propietaria Dra. Tatiana Fiordelisia Coll 

Propietario Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes 

Propietario Dr. Edgar Vergara Castañeda   
Tutor

Suplente Dra. Carmen Clapp Jiménez 

Suplente Dr. Ignacio González Sánchez 

Atentamente

**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
CIUDAD UNIVERSITARIA, CD. MX., A 4 DE DICIEMBRE DE 2020

JEFE DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS PROFESIONALES

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ

Señor sinodal: antes de firmar este documento, solicite al estudiante que le muestre la versión digital de su trabajo y verifique que la misma incluya todas las observaciones y correcciones que usted hizo sobre el mismo.

A mi madre,  
a mis abuelas,  
mis pies reposan sobre sus hombros de gigantes

A mis hermanas,  
a mi sobrina,  
nunca dejen de soñar

*“Estoy hecha de mujeres que un día son fuego arrasador abriendo senderos y al otro lluvia que propicia vida, estoy hecha de todas, sus historias se entretajan formando parte de la mía que es un hilo de la suya. Estoy hecha de mujeres hechas de otras mujeres, mi cuerpo y mi mente son cartografía de mis ancestras.”*

- Julia Celeste  
San Quitín, Baja California

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente a la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por brindarme una educación integral, no solo en lo académico, sino también en lo personal. Gracias infinitas a todos mis profesores y compañeros que encendieron en mí una chispa de curiosidad intensa y me permitieron enamorarme de la ciencia de la vida.

Gracias a los miembros del jurado por tomarse el tiempo de valorar mi trabajo de tesis y por sus valiosas aportaciones.

Gracias infinitas a mi tutor, el Dr. Edgar Vergara, por su dedicación, infinita paciencia y comprensión. Gracias por acompañarme en este primer acercamiento con la investigación científica y por permitirme desarrollarme de la mejor manera posible. ¡Eres un gran tutor y un gran ser humano!

Gracias especiales al Dr. Marco Cerbón por brindarme la confianza, recibirme en su laboratorio y animarme a continuar en la ciencia.

Gracias al Dr. Ignacio González por su infinita paciencia y su consejo incondicional.

Gracias a todas mis compañeras del laboratorio de Endocrinología Molecular de la Facultad de Química por recibirme con las puertas abiertas y acompañarme en mi descubrimiento de la increíble labor de investigación científica. A Karla, Irene, Juanita, Aracelli, Ofelia, Mariana M., Mariana B., Miguel, Gladys, Wendy, Alejandra C. y Kenia.

Gracias a Karol, Ariana, Mariana, Alejandra y Natalia. Siempre me llenan de inspiración y fortaleza para seguir por este camino tan difícil. Espero que la vida me conceda el privilegio de tenerlas siempre conmigo para seguir haciendo juntas ciencia. ¡Son grandiosas científicas y grandiosas hermanas!

Gracias a mis Pumas Azul, por ser un escape de la intensa vida académica y llenarme de luz y vida en el campo. A Natalia, Nancy, Valeria, Mariana, Aranza, Nona, Lorena, Jenny, Jann, Fer y Diana.

Fue maravilloso coincidir durante la carrera con personas increíbles; aunque el tiempo y espacio nos separen, tendrán siempre un espacio en mi corazón: Brenda, Ali, Abraham, Abi, Vilchis, Dani, Anahí, Erick, Rodrigo, Liss, Alexandra, Dulce y muchas más que por mi mala memoria podría olvidar en este momento.

Gracias a Tena. No me creerías lo agradecida que estoy en la vida por encontrarte. Gracias por acoger a esta foránea, por siempre estar para mí, por tu amistad sincera e incondicional y

por acompañarme en el descubrimiento de mi vocación. ¡Tantas experiencias tan hermosas en el aula, el laboratorio, en campo, en cualquier lugar! Eres grande.

Gracias a mis amigas de toda la vida, por su amistad que no caduca y por recibirme siempre de regreso durante estos cinco largos años. A Denisse, Araciell, Arisbeth, Salma y Alondra. Que nunca nos separe ni el tiempo ni la distancia.

Gracias a Michelle, tu alegría y espontaneidad siempre llenaron de calidez a nuestro pequeño hogar.

Gracias a Daniel. Tu llegada tan repentina me llenó de luz y amor. Gracias por estar en las buenas y en las malas, por inspirarme, por alentarme a ser siempre la mejor versión de mí, por crecer conmigo y por creer en mí aún cuando ni yo misma lo hacía.

Nunca terminaría de agradecerle a mi familia por su apoyo constante, su compañía tan reconfortante y su amor incondicional. A mis tías, ejemplos totales de fortaleza. A mis abuelos, por su amor absoluto. A mis hermanos Mily, Gregorio y Adrea, que tanto admiro y amo. Y a mis padres, Gregorio y Claudia, por darme alas para volar y siempre apoyarme en este inesperado viaje. Espero en algún momento ser capaz de retribuirles un poco de lo mucho que me han dado.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN</b>	<b>7</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>8</b>
<b>ANTECEDENTES</b>	<b>9</b>
Cáncer	9
Cáncer pulmonar	9
Participación de hormonas sexuales en el cáncer pulmonar	10
Prolactina	12
Receptor de prolactina	14
Isoformas del receptor de prolactina	17
Funciones biológicas de la prolactina	18
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	<b>21</b>
<b>PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN</b>	<b>22</b>
<b>HIPÓTESIS</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVOS</b>	<b>22</b>
General	22
Específicos	22
<b>MÉTODO</b>	<b>23</b>
Cultivo celular	23
Inmunofluorescencia	23
<i>Western blot</i>	24
Viabilidad celular	25
<b>RESULTADOS</b>	<b>26</b>
Expresión del PRLr en BEAS-2B, A549 y SK-LU-1	26
Inmunofluorescencia	26
Western blot	27
Efecto de la PRL en la viabilidad celular de BEAS- 2B, A549 y SK-LU-1	29
<b>DISCUSIÓN</b>	<b>30</b>
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>35</b>
<b>REFERENCIAS</b>	<b>36</b>

## RESUMEN

El cáncer pulmonar es un problema de salud pública prioritario ya que se encuentra en los primeros lugares tanto de incidencia como de mortalidad entre todas las neoplasias a nivel mundial. A pesar de que el factor más importante para su desarrollo es el tabaquismo, se ha observado un aumento en el número de pacientes no fumadores con cáncer pulmonar. Las diferencias durante el desarrollo de cáncer pulmonar entre hombres y mujeres, sugieren un papel importante del sexo y estado hormonal en el riesgo y comportamiento clínico y biológico del mismo. Hasta la fecha, en cáncer de pulmón los estudios relacionados al papel de las hormonas en la progresión de la enfermedad se han enfocado solamente en los estrógenos y la progesterona. La prolactina ha sido descrita como un factor importante, con efectos duales, en el desarrollo de otras enfermedades malignas. Este es el primer estudio que aborda el papel de la prolactina en cáncer pulmonar de células no pequeñas con el objetivo de caracterizar la expresión del receptor de prolactina y evaluar el efecto de la misma en la viabilidad celular de líneas celulares de pulmón. Se identificaron tres isoformas del receptor de prolactina expresadas de manera diferencial en las líneas celulares neoplásicas A549 Y SK-LU-1, y no neoplásica BEAS-2B. Además, la administración de 600 ng/mL de prolactina incrementó la viabilidad celular en la línea SK-LU-1 y en la línea BEAS-2B a 24 y 72 horas después del tratamiento, respectivamente.

## ABREVIATURAS

**ADC:** Adenocarcinoma  
**AKT:** Proteína quinasa B  
**oPRL:** Prolactina ovina  
**BSA:** Albúmina sérica bovina  
**CP:** Cáncer de pulmón  
**CPCNP:** Carcinoma pulmonar de células no pequeñas  
**CPC:** Carcinoma pulmonar de células pequeñas  
**DMEM:** Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**ePRL:** Prolactina extrapituitaria  
**ER:** Receptor de estrógenos  
**GAS:** Secuencia activada por interferón gamma  
**GH:** Hormona del crecimiento  
**GLOBOCAN:** Observatorio Global del Cáncer  
**h:** horas  
**hPRL:** Prolactina humana  
**JAK2:** Janus quinasa 2  
**kDa:** Kilodaltons  
**LT:** Linfocito T  
**MAPK:** Proteína quinasa activada por mitógeno  
**min:** minutos  
**MTT:** 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide  
**PBS:** Solución salina amortiguada con fosfato  
**PI3K:** Fosfatidilinositol 3-quinasa  
**PL:** Lactógeno placentario  
**pPRL:** Prolactina pituitaria  
**PR:** Receptor de progesterona  
**PRL:** Prolactina  
**PRLr:** Receptor de prolactina  
**RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa  
**SDS:** Dodecilsulfato sódico  
**SFB:** Suero Fetal Bovino  
**STAT:** Transductor de señal y activador de proteínas de transcripción  
**TBS-Tween:** Solución salina amortiguada con tris - polisorbato 20  
**TGF $\alpha$ :** Factor de crecimiento transformante alfa  
**Tyr:** Tirosina

## ANTECEDENTES

### **Cáncer**

El cáncer, definido por la Organización Mundial de la Salud,<sup>1</sup> es un término genérico para un conjunto de enfermedades que pueden presentarse en todo el cuerpo. Éstas se caracterizan por el crecimiento no controlado de células anormales, las cuales son capaces de invadir otros tejidos. De acuerdo a Hanahan y Weinberg,<sup>2</sup> estas enfermedades comparten rasgos moleculares, bioquímicos y celulares similares por lo que se pueden definir 10 características que las células normales adquieren conforme progresan hacia un estado neoplásico maligno; éstas son: señal proliferativa sostenida, evasión de supresores del crecimiento, evasión de apoptosis, activación de la invasión y metástasis, inmortalidad replicativa, inducción de angiogénesis, desregulación del metabolismo celular, evasión del sistema inmune, inestabilidad genética y un estado de inflamación promovida por el tumor.<sup>3</sup>

### **Cáncer pulmonar**

De acuerdo a la información obtenida de GLOBOCAN,<sup>4</sup> a nivel mundial, el cáncer de pulmón ocupa el primer y segundo lugar en mortalidad e incidencia respectivamente, mientras que en México se encuentra en el séptimo lugar de incidencia y en el cuarto de mortalidad. Bajo criterios histológicos, de pronóstico e implicaciones terapéuticas, el cáncer de pulmón se clasifica en dos grandes grupos: carcinomas de células pequeñas (CPCP) y carcinoma de células no pequeñas (CPCNP, que corresponde al 85 % de los casos).<sup>5-7</sup> A su vez, el CPCNP se clasifica en adenocarcinoma (ADC), carcinoma de células escamosas, carcinoma adenoescamoso, carcinoma de células grandes y tumores carcinoides. El ADC, generalmente localizado en la periferia del pulmón, es una tumoración epitelial maligna con diferenciación glandular y posible producción de mucina; representa la mayor parte de CPCNP (38.5 % de todos los cánceres de pulmón) y es el más común en mujeres y no fumadores.<sup>5,6</sup>

A nivel mundial, el tabaco es el factor de riesgo más importante en el desarrollo de cáncer pulmonar (CP), asociándose al 80 % de los casos de CP en hombres y al 50 % en mujeres.<sup>8</sup> Sin embargo, se ha observado un aumento en la proporción de no fumadores entre los pacientes con cáncer pulmonar. El cáncer pulmonar en fumadores y no fumadores presenta características clínicas, genéticas, bioquímicas, citomorfológicas, de pronosis y

sobrevivencia diferentes por lo que se ha propuesto ser considerado y abordado como enfermedades distintas.<sup>9</sup>

### **Participación de hormonas sexuales en el cáncer pulmonar**

Además del tabaco, otros factores que contribuyen al desarrollo del CP son la contaminación atmosférica, la exposición a radón, arsénico y asbestos, susceptibilidad hereditaria y radiación. Particularmente en México, la exposición al humo de leña es un factor importante en el desarrollo de CP, especialmente en mujeres.<sup>7</sup> Estudios recientes también relacionan factores como la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana y los niveles de estrógenos, aunque no se tienen resultados concluyentes respecto a estos últimos.<sup>8</sup>

En los últimos años se ha obtenido evidencia que sugiere que el sexo y estadio hormonal podrían influenciar el riesgo y comportamiento del CPCNP.<sup>8,10</sup> Algunas de estas evidencias son las diferencias en el desarrollo de la enfermedad entre hombres y mujeres. Por ejemplo, las mujeres con CP suelen ser más jóvenes al momento del diagnóstico, además de presentarse con un estadio más avanzado del cáncer. Aunado a esto, diversos estudios han demostrado que la respuesta a quimioterapia y la supervivencia en mujeres es mejor en comparación con los hombres. Cuando estos estudios separan a mujeres post y premenopáusicas, se encuentra que las mujeres premenopáusicas son diagnosticadas con mayor frecuencia en un estadio más avanzado, presentan tumores menos diferenciados, mayor número de metástasis distantes y peor prognosis en comparación con hombres y mujeres post-menopáusicas.<sup>9-11</sup>

Asimismo, altos niveles circulantes de estrógenos endógenos se asocian con una baja supervivencia al CP en mujeres premenopáusicas, mientras que hombres con altos niveles circulantes de  $\beta$ -estradiol, tienen una peor supervivencia en comparación con aquellos con bajos niveles. Por otro lado, el receptor de progesterona (PR) se asocia con una mejor supervivencia de pacientes con CPCNP pues el tratamiento con progesterona resulta en una baja proliferación de células de CPCNP. Lo anterior sugiere que las hormonas, especialmente los estrógenos y la progesterona, podrían estar jugando un papel importante en el comportamiento clínico o biológico del CPCNP.<sup>9-11</sup>

La participación de hormonas en el desarrollo del cáncer también ha sido estudiada en otras neoplasias. En cáncer de mama se han reportado efectos duales de la prolactina (PRL) sobre

la progresión del mismo. Altos niveles del receptor de prolactina (PRLr) son expresados en la mayoría de los tumores de mama y en modelos *in vitro* la PRL es capaz de incrementar la proliferación celular, influenciar la angiogénesis y promover la motilidad celular.<sup>12</sup> En un modelo murino, niveles elevados de PRL se relacionan con un aumento en el desarrollo de tumores mamarios, en tanto que en mujeres se ha observado que niveles elevados de PRL se correlacionan con un riesgo incrementado de cáncer de mama y metástasis. Sin embargo, las correlaciones entre los niveles de PRL en torrente sanguíneo y el desarrollo del cáncer de mama no son concluyentes.<sup>12,13</sup> Por otro lado, en un modelo *in vitro* con líneas celulares de glioblastoma multiforme, el efecto citotóxico por cisplatino es negativamente afectado cuando se administra PRL de manera simultánea.<sup>14</sup> En el mismo estudio, se demuestra que la activación o sobreexpresión del PRLr incrementa la proliferación, viabilidad, clonogenicidad, quimiorresistencia y la actividad de metaloproteasas de la matriz, mientras que un antagonista del PRLr reduce la proliferación, viabilidad, quimio-resistencia y migración de las líneas celulares.<sup>14</sup>

En contraste con los resultados anteriores, se ha demostrado la supresión del fenotipo mesenquimal y la reducción del comportamiento invasivo, mediado por las vías de señalización de las MAPK y TGF $\alpha$ /Smad,<sup>15</sup> en la línea celular de cáncer de mama MDA-MB-231, tras la sobreexpresión del PRLr y su estimulación con PRL. Aunado a esto, la ausencia o baja expresión del PRLr en tumores se asocia con una pobre diferenciación y tumores de mayor tamaño,<sup>16</sup> en tanto que la expresión de vías activadas por la interacción PRL-PRLr se relacionan con tumores bien diferenciados.<sup>13</sup>

De igual forma, en cáncer de mama se ha descrito que la PRL puede promover la expresión de los receptores de estrógenos (ER) y PR<sup>13</sup> lo cual estaría amplificando los efectos de los estrógenos y la progesterona en el desarrollo y progresión del cáncer de mama.<sup>17</sup> Arendt *et al.*<sup>12</sup> observaron que la sobreexpresión de PRL en ratones hembra conduce a adenocarcinomas positivos y negativos a receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ).

En células de cáncer de mama,<sup>18</sup> la señalización por progesterona activa a JAK2 e incrementa los niveles de STAT1, 3 y 5 tanto a nivel de mRNA como proteico, por lo que la progesterona podría promover la estimulación de STAT5 mediada por prolactina, en parte, por una retroalimentación positiva de las vías de señalización convergentes.<sup>13</sup>

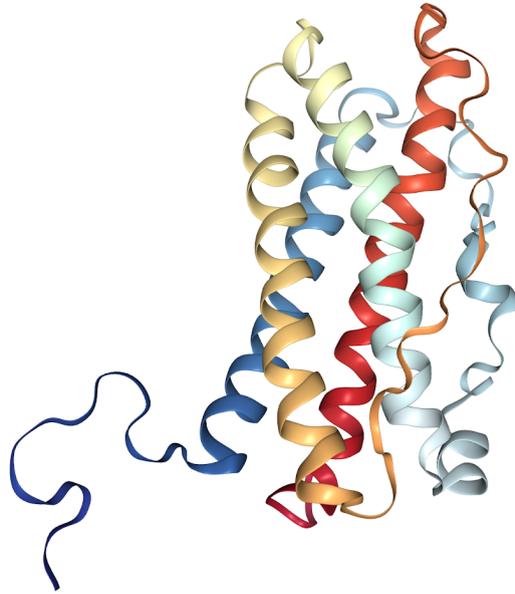
Por último, se ha observado que niveles elevados de PRL en suero (en promedio 32 ng/mL) se asocian con el padecimiento de CPCNP en comparación con individuos control (11.9 ng/mL).<sup>19</sup>

### **Prolactina**

La prolactina es una hormona polipeptídica perteneciente a la familia de citocinas hematopoyéticas y de gran homología estructural con la hormona del crecimiento (GH) y el lactógeno placentario (PL).<sup>20,21</sup> Se sugiere que GH y PRL surgen de manera temprana en la historia evolutiva de los vertebrados como resultado de la duplicación de un gen ancestral en común.<sup>22</sup> Es transcrita de un solo gen conservado entre todos los vertebrados (*PRL* o *GHAI*),<sup>20</sup> que se ubica en el cromosoma seis en humanos (6p22.2-p21.3),<sup>23</sup> mide 10 kb y se compone de cinco exones, cuatro intrones y un exón (1a) no codificante.<sup>20</sup> Su transcripción, regulada por dopamina, estrógenos, progesterona, neuropéptidos, entre otros,<sup>24</sup> se encuentra relacionada a dos promotores que participan en la expresión de PRL pituitaria (pPRL) y extra pituitaria (ePRL) por lo que la hormona presenta funciones tanto endocrinas como autocrinas y paracrinas.<sup>24</sup> Los transcritos de pPRL y ePRL difieren entre sí por 150 pb adicionales en el mRNA de ePRL, sin embargo, ambas tienen la misma estructura proteica. La pro-hormona resultante del transcrito consta de 227 aminoácidos, con un péptido de señal de 28 aminoácidos, que en su forma madura está conformada por 199 aminoácidos. La PRL, como una sola cadena de aminoácidos, cuenta con tres enlaces disulfuro y se encuentra organizada en un 50 %, en cuatro alfa hélices antiparalelas mientras que el resto de la proteína forma horquillas (Figura 1).<sup>21,25,26</sup>

Se pueden encontrar variantes de PRL resultado de *splicing* alternativo del transcrito primario, cortes proteolíticos u otras modificaciones postraduccionales como la dimerización, polimerización, fosforilación, glicosilación, sulfonación y desaminación; dichas modificaciones pueden impactar la estabilidad, vida media, unión a receptor y bioactividad de la proteína.<sup>24</sup> La PRL predominante en la glándula pituitaria es de 23 kDa; en otros tejidos se han detectado variantes de 14 y 16 kDa. La primer variante pertenece al extremo amino terminal, mientras que la segunda es producto del corte de la horquilla grande, que conecta a la tercer y cuarta alfa hélice, por la actividad enzimática de la catepsina D, metaloproteasas

de la matriz extracelular, o por calicreína inducida por estrógenos; lo anterior impide su unión al receptor.<sup>20,21</sup>



**Figura 1.** Estructura terciaria de la PRL. Se observan las cuatro alfa hélices antiparalelas.<sup>26</sup>

La síntesis de PRL ocurre principalmente en la glándula pituitaria anterior, pero también se ha identificado mediante RT-PCR, inmunohistoquímica, radioinmunoensayos y *Western blot*, que la PRL se expresa de manera independiente y diferencial en tejido reproductivo (ovario, decidua, placenta, glándula mamaria, testículos, próstata y células germinales), del sistema inmune (leucocitos, médula ósea, timo, bazo, anginas, nódulos linfáticos), neuronal (cerebro y médula espinal), integumentario (piel, glándulas sudoríparas, glándulas sebáceas, folículos pilosos) y en otros tejidos (glándulas lacrimales, riñones y en células adiposas y endoteliales).<sup>21,27,24</sup> En los sitios de producción extra pituitaria, la PRL puede permanecer en la proximidad del tejido por su capacidad de unirse a proteínas de unión a heparina que la retienen y permiten un aumento en la concentración local de la misma.<sup>24</sup>

En humanos adultos, la secreción basal de PRL es más alta en mujeres que en hombres, con concentraciones normales de 4 a 20 ng/mL y de 1 a 4 ng/mL respectivamente. El nivel de PRL incrementa ligeramente cuando se duerme, en los primeros 30 min durante la ingesta de alimentos<sup>23,28</sup> y frente a situaciones de estrés (lo cual podría tener efectos importantes en la atenuación de los efectos del estrés al largo plazo y en la modulación del sistema inmune).<sup>29</sup>

En neonatos, los niveles de PRL están elevados hasta diez veces pero se normalizan a los tres meses de edad, encontrándose los niveles más bajos de la hormona entre los tres meses y nueve años. La concentración de PRL aumentará gradualmente en la pubertad hasta alcanzar niveles normales en adultos. Se ha reportado que algunas mujeres presentan mayor concentración de prolactina a la mitad del ciclo menstrual. En el embarazo, los niveles basales de PRL aumentan gradualmente y para el término del mismo pueden haber incrementado por encima de los 200 ng/mL. Entre las primeras cuatro y seis semanas post-parto, los niveles basales de PRL se mantienen elevados en mujeres en lactancia y cada episodio de succión desencadena una rápida liberación de PRL, lo que resulta en un incremento de entre tres y cinco veces de los niveles de PRL.<sup>23,28</sup>

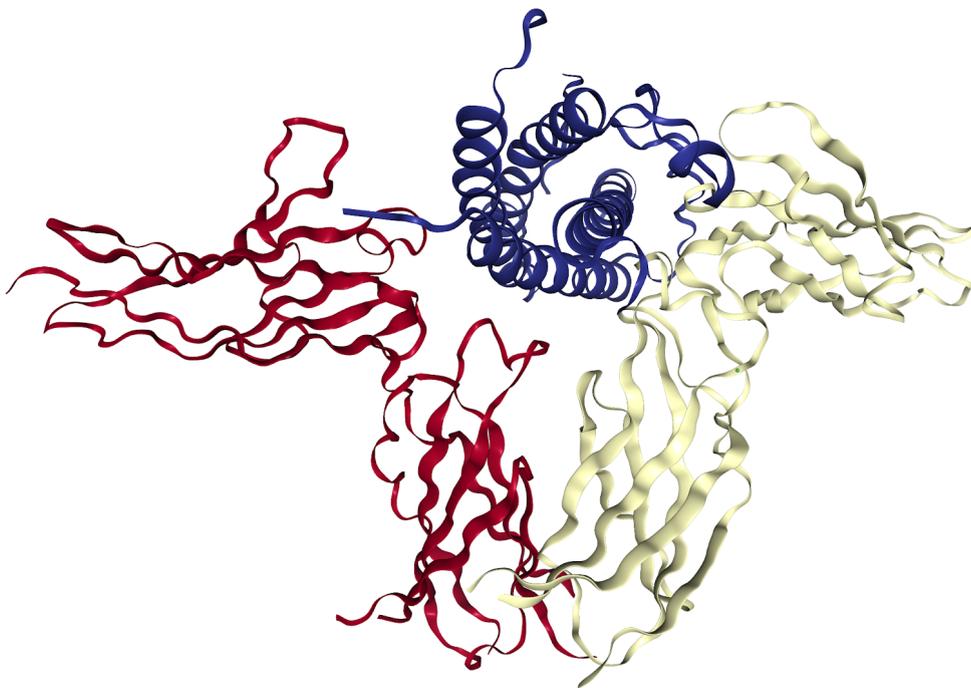
### **Receptor de prolactina**

La PRL es ligando de un receptor transmembranal, que pertenece a la clase uno de la superfamilia de receptores de citocinas (PRLr; Figura 2), también es capaz de reconocer a la hormona del crecimiento y al lactógeno placentario.<sup>21</sup> El gen del PRLr se encuentra en el cromosoma cinco en humanos, es codificado por diez exones y es regulado por tres promotores tejido específicos. Se han descrito diferentes isoformas, resultantes del inicio de la transcripción en sitios alternos y de *splicing* alternativo, que varían en longitud y composición del dominio citoplasmático; la isoforma larga consta de 598 aminoácidos<sup>30</sup> y cuenta principalmente con tres dominios: extracelular, transmembranal e intracelular.<sup>20,21,31</sup>

El dominio extracelular presenta subdominios esenciales para el correcto doblamiento y tráfico del receptor: S1, con dos pares de enlaces disulfuro, en el amino terminal y S2, con un motivo WS, en la región proximal a la membrana. Además, en los dominios S1 y S2 se encuentran cuatro y dos sitios de unión al ligando, respectivamente, por lo que S2 presenta una menor área superficial para la interacción del ligando.<sup>20,21,32,33</sup> La interacción de PRL con el dominio extracelular del PRLr resulta en la activación y dimerización del receptor, aunque se ha reportado que la dimerización del receptor también puede ocurrir independientemente de la unión del ligando.<sup>34-36</sup> Cada molécula de PRL presenta dos sitios de unión al receptor: el sitio uno, que comprende las alfa hélices uno y cuatro, y el sitio dos, corresponde a las hélices dos y tres. El sitio uno interactúa con una molécula de PRLr y posteriormente el sitio dos se

relaciona con una segunda molécula del PRLr. Esto provoca la dimerización del PRLr y activa la posterior cascada de señalización.<sup>20,21</sup>

El dominio intracelular, sin actividad enzimática *per se*, cuenta con los subdominios Box 1, proximal a la membrana, y Box 2, localizado en el extremo carboxilo terminal. La región proximal a la membrana se encuentra asociada constitutivamente con la tirosina cinasa Janus 2 (Jak2) la cual se transfosforila después de la dimerización del PRLr. Jak2 está involucrado en la fosforilación de residuos de tirosina (Tyr) en los receptores de PRL (excepto en la isoforma corta). Las tirosinas fosforiladas del PRLr resultan sitios potenciales de unión para moléculas transductoras de señales con dominios SH2: la familia STAT. Relacionadas con la cascada de señalización del PRLr se encuentran STAT1, STAT3, STAT5a y STAT5b.<sup>20,21,37</sup>

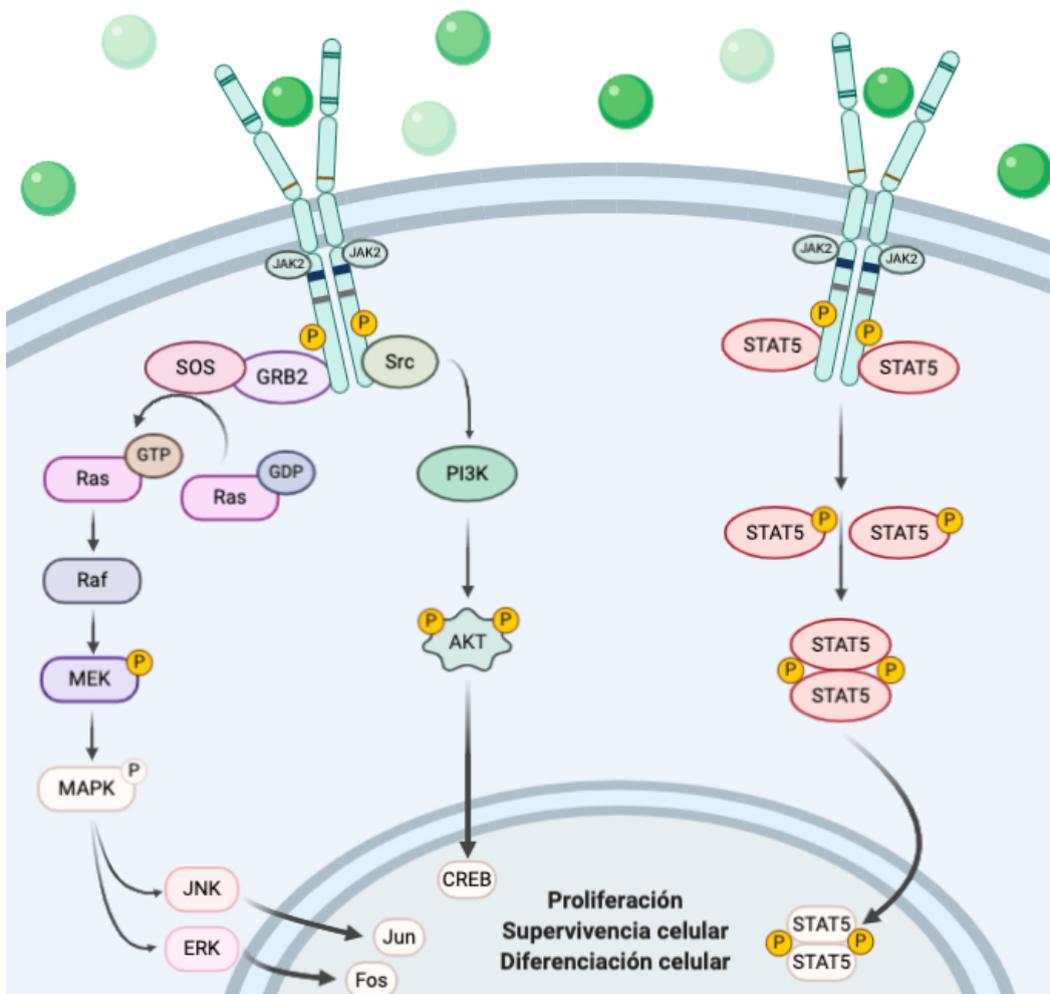


**Figura 2. Interacción PRL-PRLr.** Se muestra el complejo PRL-PRLr. Cada color corresponde a una cadena polipeptídica: azul: PRL, rojo y blanco: PRLr <sup>31</sup>

Posterior a la interacción del dominio SH2 de STAT con un residuo fosforilado del PRLr, Jak2 fosforila residuos de Tyr de la proteína STAT interactuante lo que ocasiona su disociación y su hetero u homodimerización con otra molécula STAT. Este dímero se transloca al núcleo y reconoce motivos GAS (secuencia activada por gamma-interferón que consiste de una secuencia palindrómica TTCxxGAA) de unión al DNA en un gen blanco. Se sugiere que las respuestas citocina-específica mediadas por STAT podrían deberse a la

interacción de la misma con otros transductores de señales. STAT5 es el transductor de señales más importante en las isoformas largas e intermedias de PRLr, que también puede ser fosforilado en residuos de serina y treonina dependiendo de la isoforma STAT5a o STAT5b.<sup>21</sup>

Además de la vía JAK-STAT, se reconocen entre las cascadas de señalización desencadenadas por la activación del PRLr, las vías de MAPK (Ras/Raf/MAPK), c-src y PI3K/AKT mediado por Fyn. También se reportan cambios iónicos dependientes del PRLr como el inducido por Box1, a través de la activación de canales de K<sup>+</sup> dependientes de tirosina cinasas, y por el extremo carboxilo terminal, involucrado en la producción de mensajero intracelulares que abren canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje.<sup>21</sup> La activación de estas cascadas de señalización promueven la diferenciación celular, proliferación y supervivencia celular (Figura 3).<sup>37</sup>



**Figura 3.** Cascadas de señalización PRL-PRLr. Se muestran las cascadas de señalización canónicas de la isoforma larga del PRLr. Modificado de Abramicheva y Smirnova.<sup>37,33</sup>

## Isoformas del receptor de prolactina

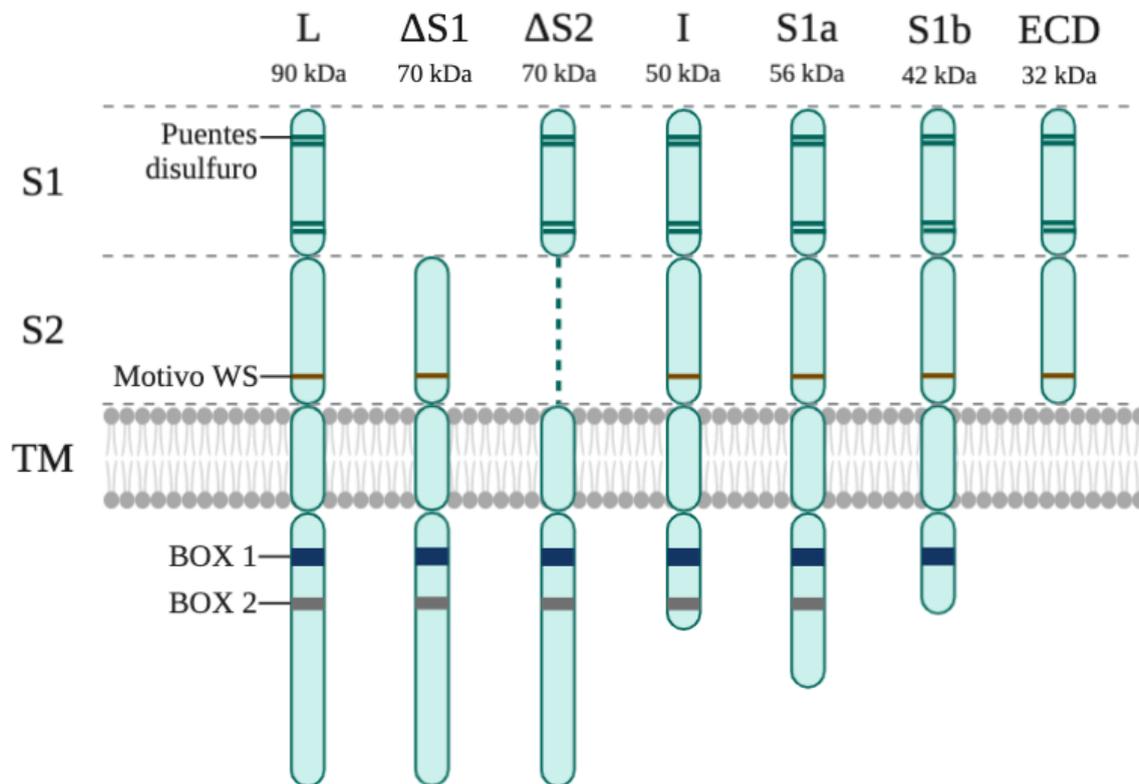
En humanos se reportan más de siete isoformas del PRLr (hPRLr): una larga,  $\Delta S1$ ,  $\Delta S2$ , una intermedia, dos cortas y una soluble (Figura 4). La isoforma larga del hPRLr consta de 598 aminoácidos y pesa aproximadamente 85 kDa.<sup>33,37,38</sup> La isoforma intermedia (50 kDa) carece del extremo carboxilo terminal como resultado de un evento de *splicing*. Debido a que el dominio extracelular de la isoforma intermedia no sufre modificaciones, la afinidad hacia el ligando es la misma que la encontrada en la isoforma larga. Ésta participa en la supervivencia celular; sin embargo, la isoforma intermedia no activa a Fyn y no es capaz de promover la proliferación de células transfectadas después del tratamiento con PRL.<sup>39,33</sup>

Las isoformas  $\Delta S1$  y  $\Delta S2$  (70 kDa) presentan variaciones en el dominio extracelular con la pérdida del dominio S1 ( $\Delta S1$ ) o el dominio S2 ( $\Delta S2$ ).<sup>39,33</sup> La isoforma  $\Delta S1$  es resultado del corte de los exones 4 y 5 del mRNA lo cual resulta en la pérdida de S1. En consecuencia, la afinidad de esta isoforma por PRL es siete veces menor en comparación con la isoforma larga. Esta isoforma no presenta antagonismo contra sí misma cuando el ligando se encuentra en altas concentraciones. Además, es capaz de asociarse y regular de manera diferencial las cascadas de señalización asociadas a integrinas.<sup>33,40</sup>

Las isoformas cortas (S1a de 56 kDa y S1b de 42 kDa), resultantes del *splicing* alternativo y de la delección parcial de los exones 10 y 11, presentan afinidad a PRL similar a la afinidad de la isoforma larga. Éstas inhiben la transducción de señales de la isoforma larga, al formar heterodímeros con la misma.<sup>33,37</sup>

La isoforma soluble (32 kDa), identificada en suero humano, consta del dominio extracelular libre que podría surgir de cortes proteolíticos. En modelos *in vitro*, esta isoforma antagoniza las acciones de la PRL en células responsivas e *in vivo* llega a unirse hasta al 36 % de la PRL circulante. Se sugiere que el receptor soluble podría limitar la secreción y degradación de la PRL, incrementar la vida media de la misma en suero y aumentar su función *in vivo*.<sup>33</sup>

El mRNA de la isoforma larga del PRLr se encuentra de forma abundante en el plexo coroideo, núcleo del lecho de la estría terminal, amígdala, córtex cerebral y bulbo olfatorio mientras que la proteína está presente en la glándula pituitaria, corazón, pulmones, timo, bazo, hígado, páncreas, riñón, glándula adrenal, útero, músculo esquelético y piel.<sup>13,21</sup>



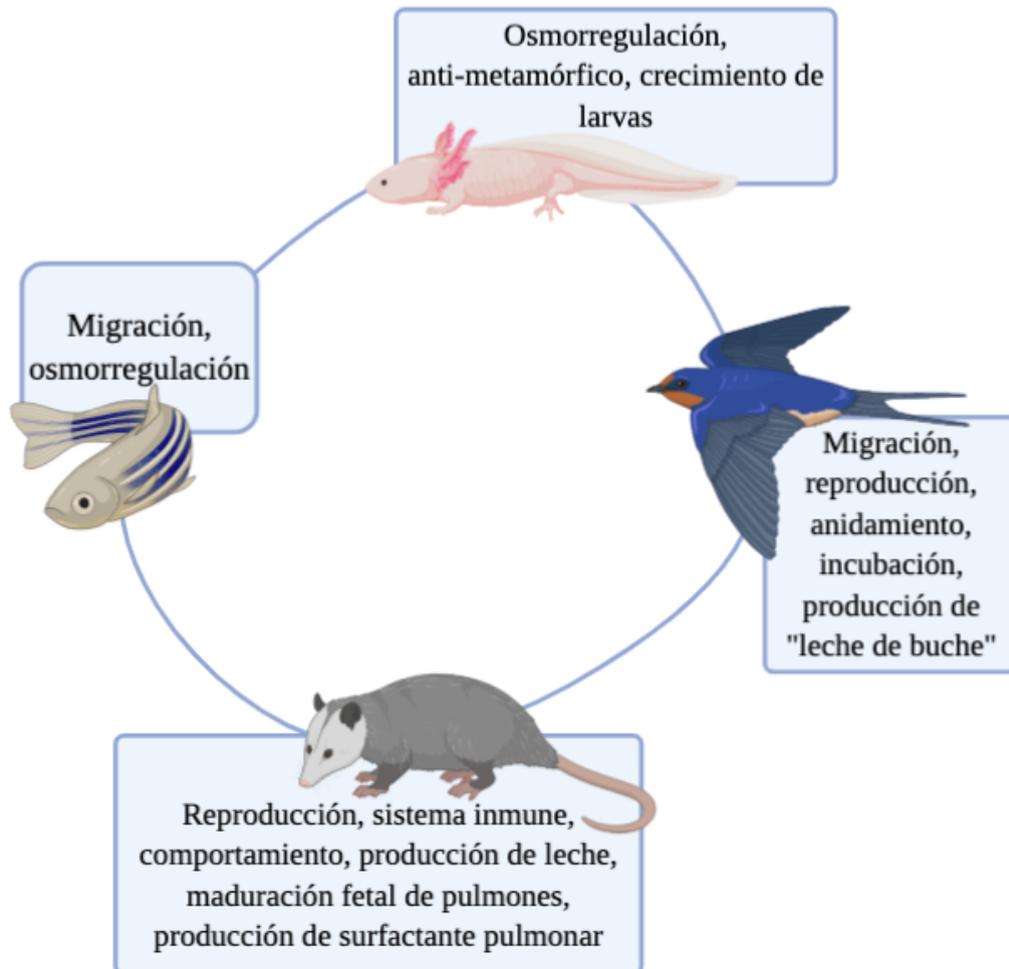
**Figura 4.** Isoformas del PRLr. En humanos se han reportado más de siete isoformas del PRLr que ocurren de manera natural, resultantes de *splicing* alternativo y modificaciones postraduccionales. Modificado de Bernard *et al.*<sup>20, 33</sup>

### Funciones biológicas de la prolactina

La PRL es principalmente reconocida por su capacidad para estimular la producción de leche durante la lactancia; sin embargo, es una hormona pleiotrópica de la cual se han descrito, en diferentes especies, más de 300 funciones biológicas (Figura 5). Entre éstas se encuentran funciones reproductivas, como la función lútea y el comportamiento reproductivo, y homeostáticas, entre ellas la respuesta inmune, la osmorregulación y la angiogénesis.<sup>13,21</sup>

Por otro lado, se ha sugerido que la PRL participa en enfermedades relacionadas al sistema inmune, a patologías de la piel y pelo, desregulaciones metabólicas<sup>24</sup> y obesidad.<sup>41</sup> Además, podría interferir en el desarrollo de cáncer de mama, próstata, colorrectal, ginecológico y

hepatocelular.<sup>19,42,41</sup> La PRL activa vías de señalización relacionadas a procesos de regulación del citoesqueleto, motilidad celular,<sup>43</sup> supervivencia, inmunoregulación, apoptosis, proliferación celular y angiogénesis.<sup>14,44-46</sup>



**Figura 5. Funciones de PRL en vertebrados.** *Peces:* osmorregulación en riñones; *Anfibios:* desplazamiento a cuerpos de agua; *Aves:* cambios estacionales: ganancia de peso, alimentación de crías; *Mamíferos:* cambio estacional de pelaje, factor luteotrófico, luteolítico.<sup>22</sup>

En líneas celulares de cáncer de mama se ha reportado que el tratamiento con PRL (50 y 100 ng/mL, 48 h) estimula la motilidad celular a través de la inducción de cambios estructurales del citoesqueleto. Dichos cambios están mediados por la señalización de c-Src, moesina y FAK.<sup>47</sup> Por otro lado, la PRL es capaz de activar a la quinasa NEK3 que puede promover la migración de células de cáncer de mama, invasión y reorganización del citoesqueleto.<sup>48</sup>

Respecto a la regulación del sistema inmune por PRL, se ha descrito que la misma es producida por linfocitos T y B periféricos, los cuales también expresan el PRLr, y células dendríticas.<sup>49-51</sup> Carreño *et al.*<sup>49</sup> demuestran en un modelo *in vitro* que la PRL es un factor importante para la sobrevivencia y proliferación de precursores tempranos de LT y favorece su maduración en el timo. Asimismo, anticuerpos monoclonales contra PRL y PRLr impiden el desarrollo de LT lo cual lleva a la acumulación de células doble negativas en el timo. Además, hay evidencia de que la PRL modula la apoptosis inducida por glucocorticoides en timocitos.<sup>50</sup>

Por otro lado, la PRL es capaz de estimular o inhibir procesos relacionados a la angiogénesis como la proliferación, dilatación, permeabilización, y regresión de los vasos sanguíneos.<sup>45</sup> La PRL de 23 kDa es capaz de promover la angiogénesis, tanto en el desarrollo embrionario como en tejido adulto (cuerpo lúteo y testículo)<sup>45,25</sup>, mientras que las isoformas cortas (14-18 kDa), recientemente denominadas como vasoinhibinas,<sup>45</sup> tienen el efecto contrario.

## JUSTIFICACIÓN

El cáncer de pulmón ocupa el segundo y primer lugar en incidencia y mortalidad, respectivamente de malignidades a nivel mundial. En México, se encuentra en el séptimo lugar de incidencia y en el cuarto de mortalidad, por lo que es un problema de salud pública relevante. El factor más importante para el desarrollo de la enfermedad es el tabaco, asociándose al 80 % de los casos en hombres y al 50 % en mujeres; sin embargo, se ha observado un aumento en el número de pacientes no fumadores con CP.

Las diferencias durante el desarrollo de CP entre hombres y mujeres, además de diversos estudios con estrógenos y progesterona, sugieren un papel importante del sexo y estadio hormonal en el riesgo y comportamiento clínico y biológico del mismo. La prolactina también ha sido descrita como un factor importante, con efectos duales, en el desarrollo de otras enfermedades malignas.

Se ha relacionado a la PRL con eventos de proliferación celular, angiogénesis, promoción de la motilidad, aumento en el desarrollo de tumores mamarios, riesgo incrementado de cáncer de mama y la presencia de metástasis. Por otro lado, hay evidencia que indica que la presencia del PRLr se relaciona con la supresión del fenotipo mesenquimal y la reducción del comportamiento invasivo. Además, la pérdida del PRLr se asocia con una pobre diferenciación y tumores de mayor tamaño, mientras que la activación de vías de señalización inducidas por la interacción PRL-PRLr se relacionan con tumores bien diferenciados.

En CP, los estudios relacionados al papel del estadio hormonal en la progresión de la enfermedad se han enfocado solamente en los estrógenos y la progesterona, dejando fuera el efecto de la PRL. Debido a lo anterior, es importante explorar el papel de la PRL en la biología del cáncer pulmonar. En este proyecto se busca identificar el posible rol de la PRL y su receptor en la viabilidad de líneas celulares de cáncer pulmonar.

## **PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN**

¿Las líneas celulares de pulmón A549, BEAS-2B y SK-LU-1 expresan el receptor de prolactina y la administración de prolactina aumentará la viabilidad celular de las mismas?

## **HIPÓTESIS**

Las líneas celulares A549, BEAS-2B y SK-LU-1 expresan el PRLr y el tratamiento con PRL aumentará la viabilidad celular de estas líneas celulares.

## **OBJETIVOS**

### **General**

Evaluar el efecto de la prolactina en la viabilidad celular de las líneas celulares A549, BEAS-2B y SK-LU-1 y caracterizar el PRLr expresado en las mismas.

### **Específicos**

Analizar la expresión y localización de PRLr en las líneas celulares A549, BEAS-2B y SK-LU-1.

Caracterizar las isoformas de PRLr expresadas en las líneas celulares A549, BEAS-2B y SK-LU-1.

Evaluar la viabilidad celular de las líneas celulares A549, BEAS-2B y SK-LU-1 tratadas con diferentes dosis de PRL.

## MÉTODO

### **Cultivo celular**

En el cultivo celular se utilizaron tres líneas celulares adherentes humanas (A549, BEAS-2B y SK-LU-1), las cuales presentan morfología epitelial. Las líneas celulares SK-LU-1 y A549 provienen de pacientes con adenocarcinoma pulmonar, mientras que BEAS-2B es una línea celular no neoplásica. Como control positivo para la expresión del PRLr se utilizó la línea celular de cáncer de mama T47D.

Los cultivos celulares se incubaron a 37°C, en una atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. La línea celular SK-LU-1 se cultivó en medio DMEM (Biowest<sup>®</sup>) mientras que A549 y BEAS-2B se cultivaron en medio DMEM-F12 (Gibco<sup>®</sup>). Ambos medios fueron suplementados con piruvato (Biowest<sup>®</sup>, 1 %), una mezcla de antibiótico y antimicótico (Biowest<sup>®</sup>, 1 %), aminoácidos no esenciales (Biowest<sup>®</sup>, 1 %) y suero fetal bovino (Biowest<sup>®</sup>) al 10 %.

### **Inmunofluorescencia**

Se colocaron cubreobjetos estériles circulares de 18 mm., previamente tratados con alcohol etílico al 70 % en una caja de 12 pozos. En éstos se sembraron 6×10<sup>4</sup> células por pozo (A549, BEAS-2B y SK-LU-1) y se incubaron a 37 °C con CO<sub>2</sub> al 5 % con SFB al 10 %.

A las 24 h de haber sembrado las células se colocó la caja en una cama de hielo y se retiró el medio de cultivo. Los pozos fueron lavados tres veces con PBS frío y se les añadió 0.5 mL de paraformaldehído al 4 %. Transcurridos 40 min se retiró el paraformaldehído de las cajas y se realizaron tres lavados con PBS.

Para la permeabilización de la membrana celular se añadió a cada pozo 0.5 mL de una disolución 1:1 de SDS al 0.5 % y Tritón X-100 al 0.5 % en PBS la cual fue retirada a los 15 min. de incubación a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con PBS.

Las muestras se bloquearon con una disolución de BSA al 3 % durante una h a temperatura ambiente y después se lavaron tres veces con PBS y agua Milli-Q. Posteriormente, las muestras se incubaron en cámara húmeda toda la noche a 4 °C con 20 µl de los anticuerpos primarios anti-PRLr (sc-20992, Santa Cruz Biotechnology<sup>®</sup>) y anti-β-actina (sc-47778, Santa

Cruz Biotechnology<sup>®</sup>) en una dilución 1:500. Después se realizaron tres lavados con PBS y uno con agua destilada y se depositaron 20 µl del anticuerpo secundario Alexa Fluor 546 en una dilución 1:500 (Invitrogen<sup>®</sup>) y Alexa Fluor 488 en una dilución 1:250 (Invitrogen<sup>®</sup>). Transcurridas dos h de incubación en oscuridad, se hicieron tres lavados con PBS y uno con agua desionizada. Finalmente se incubó por 10 min con DAPI en una dilución 1:10 000. Cada cubreobjetos se montó sobre un portaobjetos con 20 µl de medio para montaje fluorescente (Dako<sup>®</sup>) y las preparaciones se observaron al microscopio. Se tomaron fotos con el objetivo 40X y las imágenes fueron procesadas en el software ImageJ (NIH<sup>®</sup>).

Los ensayos se realizaron por triplicado para verificar la reproducibilidad de los resultados obtenidos.

### ***Western blot***

Los cultivos celulares se colocaron sobre una cama de hielo y se lavaron tres veces con PBS pH 7.4 a 4°C. A cada caja se le añadieron 100 µl de solución de lisis (RIPA) suplementado con inhibidor de proteasas (cOmplete Tablets, Roche<sup>®</sup>) y con un *scraper* se desprendieron mecánicamente las células de la caja. La suspensión celular se centrifugó a 15 200 rpm a 4°C durante 20 min y se recuperó el sobrenadante. Posteriormente se cuantificó la concentración de proteínas por el método de Lowry (Bio-Rad<sup>®</sup>). Las muestras de proteína fueron separadas mediante electroforesis en un gel de poliacrilamida al 10 % y transferidas en cámara húmeda a una membrana de nitrocelulosa. Al terminar la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con leche al 10 % en TBS-Tween 20 por 2 h a temperatura ambiente. La membrana fue incubada toda la noche a 4 °C con los anticuerpos primarios anti-PRLr en una dilución 1:1000 (sc-20992, Santa Cruz Biotechnology) y anti-β-actina en una dilución 1:1000 (sc-47778, Santa Cruz Biotechnology). La membrana fue lavada tres veces con TBS-Tween 20 para después ser incubada con los anticuerpos secundarios IRDye<sup>®</sup> 800CW (Goat anti-Mouse, 925-32210) e IRDye<sup>®</sup> 680RD (Donkey anti-Rabbit). Finalmente se hicieron 5 lavados con TBS-Tween 20 y dos con PBS durante 10 min cada uno. Las membranas fueron visualizadas en el sistema de imágenes Odyssey<sup>®</sup> Sa (LI-COR<sup>®</sup>).

## **Viabilidad celular**

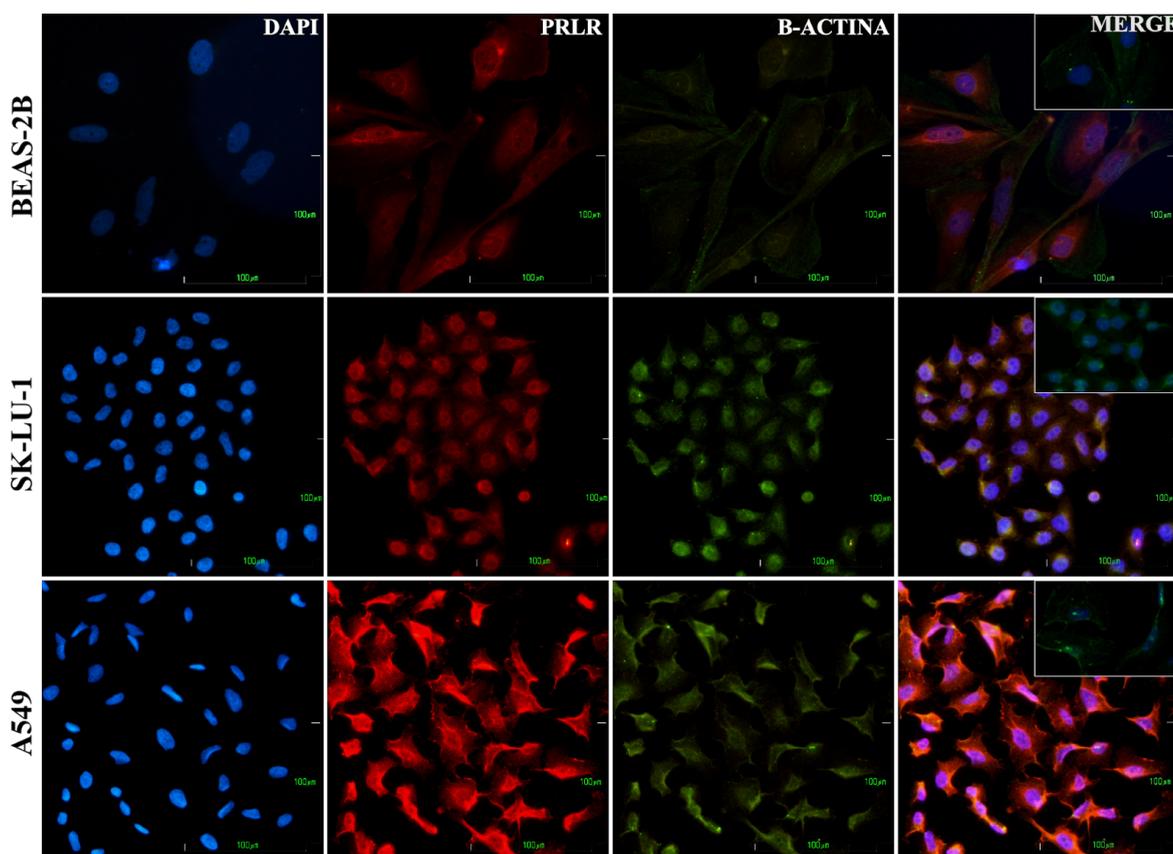
Se realizaron ensayos de viabilidad celular por MTT, de acuerdo a lo descrito previamente por Romero,<sup>52</sup> en las tres líneas celulares. Se sembraron  $4 \times 10^3$ ,  $7 \times 10^3$  y  $9 \times 10^3$  células en placas de 96 pozos para ensayos de 24, 48 y 72 h, respectivamente. Posteriormente, a las 24 h de haber sido sembradas, se aplicaron diferentes tratamientos de PRL. Las concentraciones de los tratamientos fueron 10, 50, 100, 200, 400 y 600 ng/mL. Transcurridas 24, 48 o 72 h se añadieron 20  $\mu$ l de MTT (2.5 mg/mL) a cada pozo y se incubó por 80 min. Posteriormente se retiró el medio de cultivo y se añadió DMSO para disolver los cristales de formazán depositados en el fondo de la placa. Las placas fueron leídas a 540 nm en un lector de placas Epoch<sup>®</sup>.

## RESULTADOS

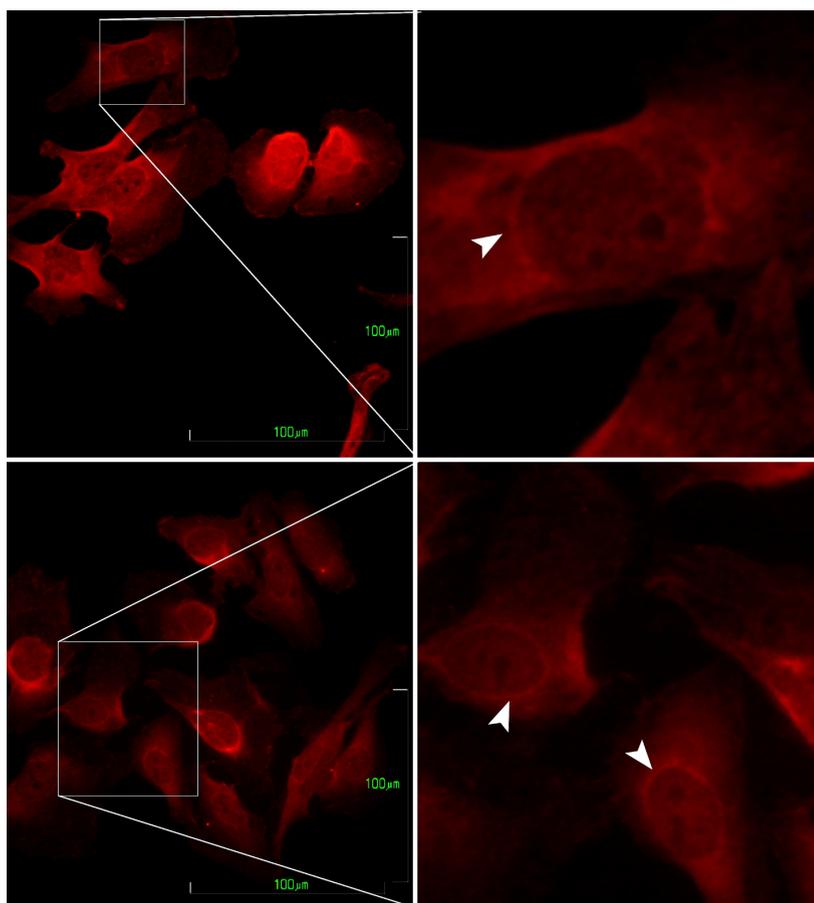
### Expresión del PRLr en BEAS-2B, A549 y SK-LU-1

#### Inmunofluorescencia

La expresión del receptor de prolactina (PRLr) se detectó en las líneas celulares BEAS-2B, A549 y SK-LU-1 (Figura 6). En BEAS-2B, se aprecia mayor intensidad de fluorescencia de manera perinuclear (Figura 7), mientras que en SK-LU-1 y A549 se observan zonas de mayor intensidad de fluorescencia en regiones intracelulares (Figura 8).



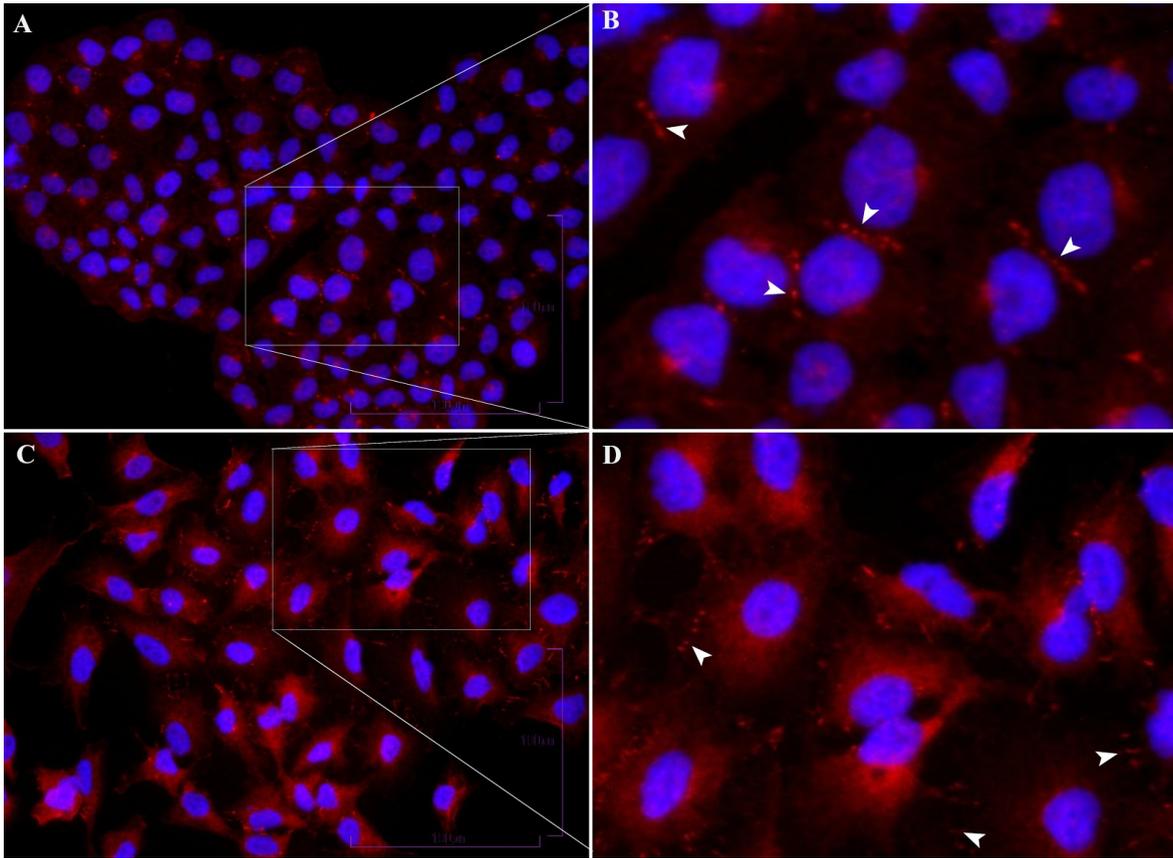
**Figura 6. Expresión del PRLr en BEAS-2B, SK-LU-1 y A549.** Resultados representativos de la detección del PRLr por inmunofluorescencia. Las primeras tres columnas corresponden a las fotomicrografías para el marcaje de DAPI, PRLr y B-actina (de izquierda a derecha) para cada línea celular (BEAS-2B, SK-LU-1 y A549 de arriba hacia abajo). La última columna corresponde a la sobreposición de las fotomicrografías de DAPI (azul), PRLr (rojo) y B-actina (verde) para cada línea celular. En cada fila se incluye un control negativo en la esquina superior derecha de la columna de *MERGE*.



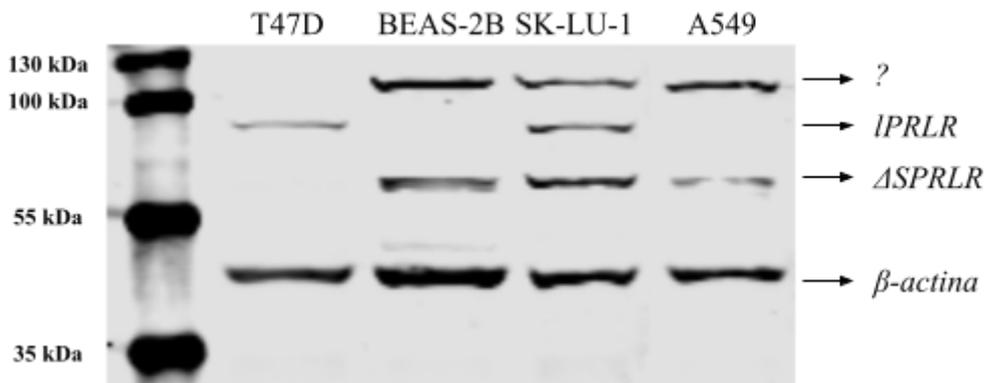
**Figura 7. Expresión del PRLr en BEAS-2B.** Fotomicrografías representativas de la detección del PRLr por inmunofluorescencia en BEAS-2B. Se aprecia en algunas células mayor intensidad de fluorescencia con localización perinuclear, señalada por las cabezas de flecha.

### ***Western blot***

Debido a que las isoformas del PRLr difieren en masa atómica (kilodaltons), se utilizó la técnica de *Western blot* para evaluar la expresión de las mismas. La expresión del PRLr se confirmó por *Western blot* y se identificaron tres isoformas del receptor (Figura 9). En las tres líneas celulares (A549, BEAS-2B y SK-LU-1) se identificaron dos isoformas de aproximadamente 70 y 110 kDa. Por otro lado, en SK-LU-1, además de las isoformas de aproximadamente 70 y aproximadamente 110 kDa se obtuvo una banda de aproximadamente 90 kDa. En la línea celular T47D, utilizada como control positivo, sólo se identificó la expresión de la isoforma de aproximadamente 90 kDa.



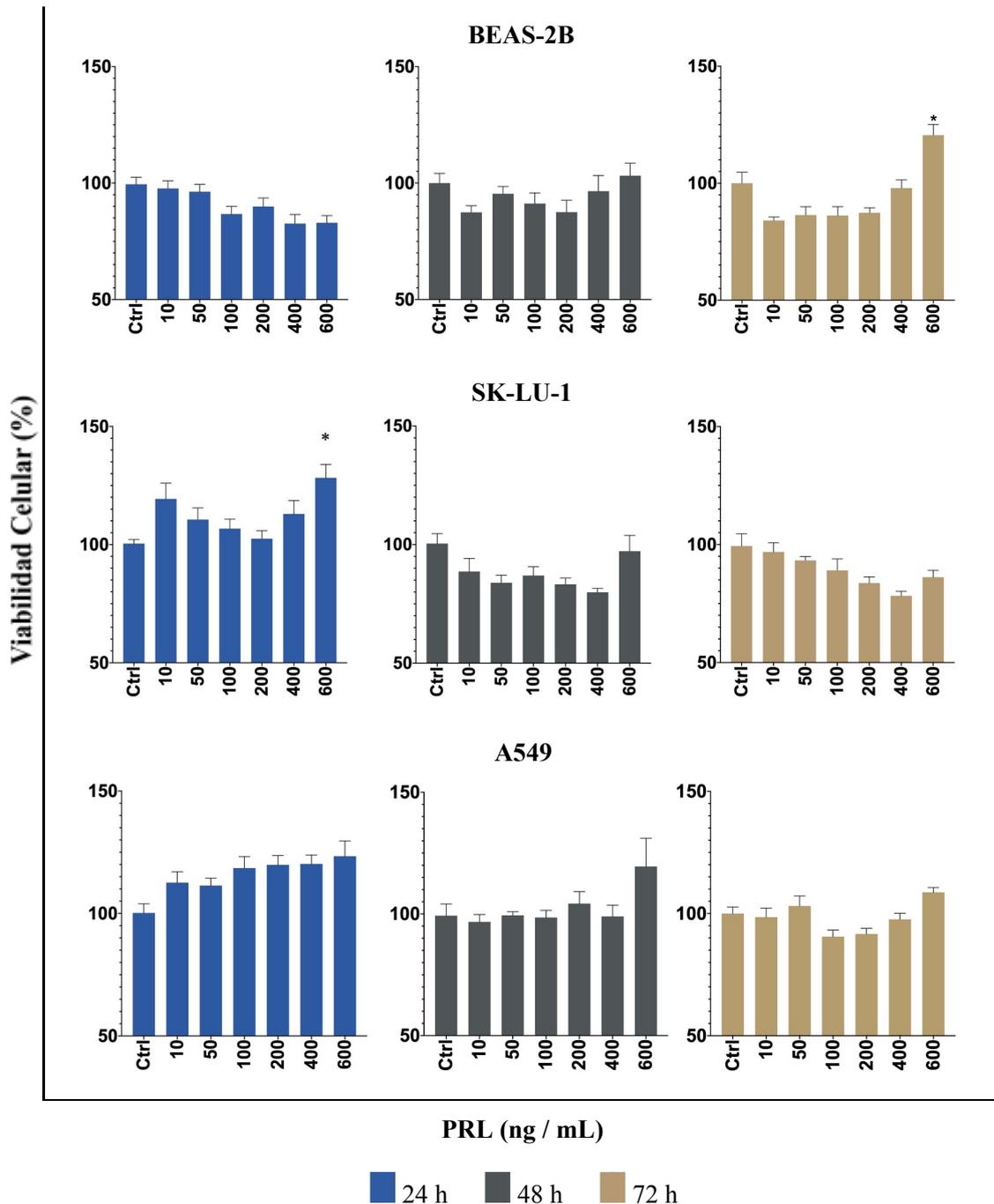
**Figura 8. Expresión del PRLr en SK-LU-1 y A549.** Sobreposición de las señales de DAPI (azul) y PRLr (rojo). A y B). Monocapa celular de la línea celular SK-LU-1. C y D) Monocapa celular de la línea celular A549. Las cabezas de flecha señalan regiones con mayor intensidad de fluorescencia. Fotomicrografías capturadas a 40X.



**Figura 9. Isoformas del PRLr Expresadas en BEAS-2B, A549 y SK-LU-1.** Imagen representativa de los resultados obtenidos en el ensayo de *Western blot* para la identificación del receptor de prolactina. La línea celular T47D de cáncer de mama fue utilizada como control positivo. Se utilizó  $\beta$ -actina como control de carga.

## Efecto de la PRL en la viabilidad celular de BEAS- 2B, A549 y SK-LU-1

Tras la administración de PRL en las líneas celulares se observó un aumento significativo en la viabilidad celular a 24 h en SK-LU-1 de aproximadamente el 28 % y a 72 h en BEAS-2B de aproximadamente 20 % en el tratamiento de 600 ng/mL (Figura 10).



**Figura 10.** Efectos de la PRL en la viabilidad celular SK-LU-1, A549 y BEAS-2B. Se hicieron análisis de varianza (ANOVA unidireccional) con el *Software* GraphPad Prism<sup>®</sup> (\*p<0.05). Con la prueba Shapiro-Wilk se evaluó la normalidad de los datos.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este trabajo demuestran la expresión del PRLr en las líneas celulares de pulmón A549, SK-LU-1 y BEAS-2B; del mismo modo, se caracterizan las diferentes isoformas del PRLr expresadas en cada línea celular. De acuerdo a nuestro conocimiento, este es el primer estudio que analiza la expresión diferencial de las isoformas del PRLr en líneas celulares de CPCNP.

En este trabajo se observó un aumento estadísticamente significativo en la viabilidad celular a 24 h de tratamiento con PRL (600 ng/mL) en SK-LU-1 y a 72 h (600 ng/mL) en BEAS-2B. Si bien la dosis de PRL en la cual se observaron efectos no es aparentemente la encontrada *in vivo*, esta diferencia podría ser debida al tipo de PRL usada. Se ha demostrado que la PRL ovina (oPRL) es un agonista con una potencia diez veces menor a la PRL humana (hPRL), pero sus efectos biológicos a altas concentraciones son equivalentes a los de la hPRL.<sup>40,53</sup> Aunado a lo anterior, se ha propuesto que la presencia de lactógenos en el SFB podría enmascarar los efectos mitogénicos de la PRL exógena.<sup>54</sup> Debido a esto, es importante determinar los efectos de la PRL a altas concentraciones. Por otro lado, Clevenger *et al.*,<sup>33</sup> reportan efectos biológicos modestos de PRL exógena en modelos *in vitro* que podrían explicarse por la producción de PRL por los mismos cultivos celulares, por lo que sería interesante evaluar la producción de PRL en las líneas celulares estudiadas y de esta manera explorar la posible estimulación autocrina de las mismas.

En diferentes neoplasias, el papel de la PRL en la viabilidad y proliferación celular no es del todo claro, pues distintos modelos reportan diferentes efectos sobre las mismas. En tejido mamario, la interacción PRL-PRLr resulta en el aumento de la supervivencia, proliferación y diferenciación del mismo; durante el embarazo, dicho proceso es necesario para la expansión del tejido mamario epitelial y la posterior producción de leche.<sup>16</sup> En líneas celulares de cáncer de mama, la PRL estimula la proliferación celular, migración y supervivencia,<sup>16</sup> y en una línea celular humana de endometrio glandular la PRL regula positivamente la expresión del PRLr y aumenta la proliferación celular inducida por estrógenos.<sup>55</sup> Además, en líneas celulares de cáncer cervicouterino, la proliferación celular de la línea celular HeLA aumenta tras la administración de PRL, pero permanece constante en las líneas celulares SiHa y C-33A.<sup>56</sup> Del mismo modo, en líneas celulares de cáncer de próstata la proliferación celular

no se ve modificada.<sup>57</sup> En contraste, se ha demostrado que la PRL limita la proliferación celular en células de cáncer de mama positivas a Her-2.<sup>58</sup> De manera interesante, Huang *et al.*<sup>38</sup> sugieren que la isoforma  $\Delta$ S2SF1b del PRLr es un inhibidor natural de los efectos proliferativos mediados por E2 en la línea celular de cáncer de mama T47D.

Respecto al efecto de la PRL en la viabilidad celular, en una línea celular de células condrogénicas de ratón se describe una respuesta bifásica a PRL, donde a dosis bajas (10 ng/mL, 24 h) la viabilidad celular aumenta mientras que a dosis altas (600 ng/mL, 24h; 100 y 600 ng/mL, 72 h) disminuye.<sup>59</sup> Por otro lado, en líneas celulares de cáncer de mama, el tratamiento con PRL humana recombinante (100 ng/mL por 48 hr) reduce la viabilidad celular alrededor de un 20 %<sup>58</sup> mientras que una línea celular de osteosarcoma (100-500, 48 h ng/mL) no la modifica.<sup>60</sup> En algunos modelos neuronales, del sistema inmune y tumorales, la administración de PRL aumenta la viabilidad celular, antagonizando el efecto citotóxico de diferentes estímulos.<sup>14,56,61-63</sup> Estos resultados contrastantes están probablemente relacionados con las diferentes isoformas del PRLr expresadas, con la formación de heterodímeros del receptor y las diferentes cascadas de señalización activadas por cada isoforma.<sup>39,14</sup> En humanos se ha reportado la expresión de más siete isoformas del PRLr (larga, intermedia,  $\Delta$ S1,  $\Delta$ S2, S1a, S1b y soluble)<sup>33</sup> por lo que resulta relevante caracterizar la expresión de las mismas en las líneas celulares de CPCNP, y así explorar el efecto mediado por PRL-PRLr.

En líneas celulares de CPCNP (A549, HTB177, HTB183 y CRL5803) y en muestras de pacientes con CP, el mRNA del PRLr fue detectado por RT-PCR y su expresión por inmunofluorescencia.<sup>46</sup> En dicho estudio, los autores describen una respuesta quimiotáctica a PRL en las líneas celulares de CPCNP pero no analizan las isoformas del PRLr expresadas. En el presente trabajo, las isoformas identificadas en las tres líneas celulares de ~70 kDa y ~90 kDa en SK-LU-1, podrían corresponder a las isoformas  $\Delta$ S y larga, respectivamente, reportadas ampliamente en la literatura.<sup>33,39,40</sup> Por otro lado, la isoforma entre 100 y 130 kDa no ha sido reportada en otros modelos *in vivo* o *in vitro*, pero podría corresponder a una modificación postraducciona de la proteína como ubiquitinación o glicosilación.<sup>64-66</sup>

El mRNA de la isoforma  $\Delta$ S1 se ha detectado en varios tejidos humanos, con expresión variable de acuerdo al tejido, encontrándose los niveles más altos en placenta y riñón, mientras que en testículo la isoforma es apenas detectable. Además, se reporta que la

expresión de esta isoforma es predominante en tejido mamario, tanto normal como neoplásico.<sup>40</sup> Cabe resaltar que los hallazgos descritos por Kline<sup>40</sup> concuerdan con los resultados encontrados en este proyecto de investigación, dado que la supuesta isoforma  $\Delta S$  fue detectada tanto en líneas celulares neoplásicas como en una no neoplásica. Kline *et al.*<sup>40</sup> sugieren que la isoforma  $\Delta S1$  podría contribuir a los efectos desencadenados por PRL a altas concentraciones, ya que esta isoforma tiene una afinidad reducida por PRL. En cambio, la expresión *in vitro* de la isoforma  $\Delta S2$  ha sido demostrada en líneas celulares de cáncer de próstata y células endoteliales humanas, y los autores relacionan su expresión con la regulación de la proliferación y diferenciación celular.<sup>67</sup>

Los dominios intracelulares de las isoformas  $\Delta S$  y larga del PRLr son idénticos, por lo tanto se asume que activan las mismas cascadas de señalización.<sup>33</sup> La delección del subdominio S1 o S2 del PRLr, resulta en una pérdida de afinidad hacia PRL.<sup>33</sup> Se ha sugerido que la isoforma larga del PRLr media las cascadas de señalización más importantes dependientes de PRL, pues la isoforma  $\Delta S1$  sólo induce señales a concentraciones elevadas de PRL.<sup>40</sup> Por otro lado, se ha reportado que la delección del subdominio S2 provoca cambios conformacionales en el dominio intracelular del receptor lo cual resulta en la activación constitutiva del dímero, aún en ausencia del ligando.<sup>67</sup> Para futuras investigaciones, es importante determinar la isoforma  $\Delta S$  expresada en las líneas celulares y de esta manera, analizar sus posibles implicaciones en la respuesta a PRL. En el modelo de estudio de esta investigación, la expresión de la isoforma larga del PRLr en la línea celular SK-LU-1 podría provocar una mayor respuesta a PRL (en comparación con BEAS-2B y A549 que sólo expresan la isoforma  $\Delta S$ ) y explicaría el aumento (aunque no estadísticamente significativo) de la viabilidad celular de SK-LU-1 a 10 ng/mL a 24 h y su subsecuente disminución conforme se aumenta la concentración de la PRL hasta alcanzar los 200 ng/mL (Figura 10). La concentración de la hormona puede afectar la dimerización de la isoforma larga del PRLr ya que a diferencia de la isoforma  $\Delta S$ , exhibe auto-antagonismo, donde un subdominio del receptor presenta mayor afinidad hacia el ligando, lo que resulta en la unión preferencial del sitio uno y en consecuencia, la formación de complejos inactivos donde la hormona se une a un solo receptor impidiendo la dimerización de los receptores y así la consecuente transducción de señales.<sup>40</sup>

El PRLr es un receptor transmembranal y su localización en diferentes compartimentos celulares ha sido previamente demostrada. En este trabajo, los ensayos de

inmunofluorescencia sugieren la localización transmembranal, citoplásmica y perinuclear del PRLr. De manera similar, en líneas celulares de cáncer cervicouterino, la expresión del PRLr se observó en la membrana celular y en el citoplasma.<sup>56</sup> Tan *et al.*<sup>67</sup> sugieren que la señalización mediada por la isoforma  $\Delta S2$  podría no depender de su ubicación transmembranal ya que ésta no requiere de un ligando para su activación y además, se ha reportado que otros miembros de la superfamilia de receptores de citocinas, en específico el receptor de eritropoyetina, se asocia con JAK2 en el retículo endoplásmico rugoso.<sup>68</sup> Sin embargo, sería necesario utilizar otras estrategias metodológicas como microscopía confocal o marcadores de organelos para evaluar colocalización y de esta manera comprobar la localización del mismo en los estudios subsecuentes de esta línea de investigación.

En la línea celular BEAS-2B se observó mayor intensidad de fluorescencia en la región perinuclear. La endocitosis del PRLr inducida por PRL ha sido examinada en modelos *in vitro* (rata y bovino) donde se ha observado que diferencias en el dominio citoplasmático resultan en diferentes tasas de internalización de las isoformas. Lo anterior provocaría una modificación de la proporción de isoformas del PRLr en membrana después de un estímulo con PRL y en consecuencia, las cascadas de señalización podrían verse modificadas pues las respuestas subsecuentes a la hormona dependerían de las isoformas restantes.<sup>33,69</sup> En un modelo *in vitro* con células embrionarias de riñón humano, los autores demuestran que la estimulación con PRL promueve la fosforilación del PRLr en Ser349, a través de JAK2, lo que acelera la endocitosis y subsecuente degradación del receptor.<sup>66</sup> La unión de un ligando a su receptor membranal puede iniciar la internalización tanto del ligando, así como del receptor, lo que puede desencadenar fenómenos como el reciclaje de receptores, la degradación del ligando y/o receptor (resultando en una regulación negativa de la expresión del receptor), o el transporte de ligandos y/o receptores a otros compartimentos celulares como el núcleo, donde directamente pueden alterar la expresión génica.<sup>33,69</sup>

En A549 y SK-LU-1 se observa mayor intensidad de fluorescencia en la región intracelular. Se ha reportado que la isoforma  $\Delta S$  es capaz de asociarse y de regular cascadas de señalización asociadas a la integrina  $\beta 1$  (también llamada ITGB1 o CD29), la cual se ha demostrado ser necesaria para la diferenciación de células epiteliales de mama, además, en ratones su supresión compromete la activación de STAT5 y la producción de leche.<sup>33,70</sup> Uno de los siguientes pasos en esta línea de investigación es explorar la posible interacción del

PRLr e integrinas en CPCNP. El uso de cultivos 3D y la composición del sustrato de crecimiento modifican los estímulos recibidos por las células y en consecuencia los eventos de transducción de señales. Cuando se comparan los cultivos 3D con las monocapas celulares (cultivos 2D), la sublocalización de las integrinas suele verse modificada.<sup>71</sup> Aunado a esto, en ensayos *in vitro* con células epiteliales de mama se ha descrito que las vías de señalización mediadas por PRL y la matriz extracelular interactúan tras la endocitosis de PRL. Lo anterior es indispensable para la fosforilación de STAT5 y podría resultar en un mecanismo de regulación positiva de citocinas.<sup>72</sup>

En este trabajo se demostró la expresión diferencial del PRLr en las líneas celulares de pulmón A549, SK-LU-1 y BEAS-2B. Aunado a esto, los resultados sugieren que altas concentraciones de PRL podrían aumentar la viabilidad celular en SK-LU-1 a corto plazo (24 h) y en BEAS-2B a largo plazo (72 h). La isoforma larga del PRLr podría influenciar la modificación de la viabilidad celular en SK-LU-1 ya que la misma tiene mayor afinidad hacia PRL en comparación con la isoforma  $\Delta S$ . Por otra parte, es necesario determinar la isoforma  $\Delta S$  expresada para ahondar en los efectos que la misma podría desencadenar; la isoforma  $\Delta S1$  sólo responde a altas concentraciones de PRL y se ha demostrado la activación constitutiva de la isoforma  $\Delta S2$ . Respecto a la isoforma mayor a 110 kDa, hacen falta más estudios para determinar si la misma es resultado de una modificación postraduccional tal como la ubiquitinación o glicosilación. Finalmente, se requieren estudios posteriores que permitan comprobar la localización perinuclear e intracelular del PRLr en las líneas celulares para plantear los posibles mecanismos involucrados.

## CONCLUSIONES

Se identificó la expresión diferencial de tres isoformas del PRLr en las líneas celulares de pulmón neoplásicas A549, SK-LU-1 y no neoplásica BEAS-2B. Las tres líneas celulares expresaron isoformas de aproximadamente 70 y 110 kDa, mientras que SK-LU-1 expresó una isoforma adicional de 90 kDa. Las isoformas de 70 y 90 kDa podrían corresponder a las isoformas  $\Delta$ S y larga, respectivamente. Sin embargo, la isoforma de aproximadamente 110 kDa no ha sido reportada previamente en la teoría. Con base a los ensayos de inmunofluorescencia se sugiere que el PRLr se localiza en diferentes compartimentos celulares, sin embargo son necesarios ensayos adicionales para comprobar estos hallazgos.

Tras el tratamiento con PRL (600 ng/mL) se observó un aumento en la viabilidad celular de las líneas celulares SK-LU-1 (24 h) y BEAS-2B (72h). En A549 la viabilidad celular no aumentó bajo ninguna condición.

## REFERENCIAS

1. Cáncer (2017). Organización Mundial de la Salud. Disponible en: <http://www.who.int/cancer/es/>. Consultado el 10 de enero de 2021.
2. Hanahan, D., y Weinberg, R.A. (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70.
3. Hanahan, D., y Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 144, 646–674.
4. Cancer today (2018). Disponible en: <http://gco.iarc.fr/today/home>. Consultado el 10 de enero de 2021.
5. Rodríguez-Canales, J., Parra-Cuentas, E., y Wistuba, I.I. (2016). Diagnosis and Molecular Classification of Lung Cancer. *Cancer Treatment and Research*, 25–46.
6. Siddiqui, F., y Siddiqui, A.H. (2019). Cancer, Lung. StatPearls. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK482357/>. Consultado el 10 de enero de 2021.
7. Arrieta, O., López-Mejía, M., Macedo-Pérez, E.O., y Corona-Cruz, J.F. (2016). Proposals for the prevention of lung cancer in the health system of Mexico. *Salud Pública de México* 58, 274–278.
8. Mao, Y., Yang, D., He, J., y Krasna, M.J. (2016). Epidemiology of Lung Cancer. *Surgical Oncology Clinics of North America* 25, 439–445.
9. Peddireddy, V. (2016). Lung cancer incidence in never smokers: Genetic and gender basis. *Gene Reports* 4, 198–207.
10. Rodríguez-Lara, V., Hernández-Martínez, J.-M., y Arrieta, O. (2018). Influence of estrogen in non-small cell lung cancer and its clinical implications. *J. Thorac. Dis.* 10, 482–497.
11. Asavasupreechar, T., Chan, M.S.M., Saito, R., Miki, Y., Boonyaratanakornkit, V., y Sasano, H. (2019). Sex steroid metabolism and actions in non-small cell lung carcinoma. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, 105440.
12. Arendt, L.M., Rose-Hellekant, T.A., Sandgren, E.P., y Schuler, L.A. (2006). Prolactin Potentiates Transforming Growth Factor  $\alpha$  Induction of Mammary Neoplasia in Transgenic Mice. *The American Journal of Pathology* 168, 1365–1374.
13. Leehy, K.A., Truong, T.H., Mauro, L.J., y Lange, C.A. (2018). Progesterone receptors (PR) mediate STAT actions: PR and prolactin receptor signaling crosstalk in breast cancer models. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 176, 88–93.
14. Asad, A.S., Nicola Candia, A.J., Gonzalez, N., Zuccato, C.F., Abt, A., Orrillo, S.J., Lastra, Y., De Simone, E., Boutillon, F., Goffin, V., et al. (2019). Prolactin and its receptor as therapeutic targets in glioblastoma multiforme. *Sci. Rep.* 9, 19578.

15. Nouhi, Z., Chughtai, N., Hartley, S., Cocolakis, E., Lebrun, J.-J., y Ali, S. (2006). Defining the role of prolactin as an invasion suppressor hormone in breast cancer cells. *Cancer Res.* 66, 1824–1832.
16. Faupel-Badger, J.M., Duggan, M.A., Sherman, M.E., Garcia-Closas, M., Yang, X.R., Lissowska, J., Brinton, L.A., Peplonska, B., Vonderhaar, B.K., y Figueroa, J.D. (2014). Prolactin Receptor Expression and Breast Cancer: Relationships with Tumor Characteristics among Pre- and Post-menopausal Women in a Population-Based Case–Control Study from Poland. *Hormones and Cancer* 5, 42–50.
17. Gutzman, J.H., Miller, K.K., y Schuler, L.A. (2004). Endogenous human prolactin and not exogenous human prolactin induces estrogen receptor  $\alpha$  and prolactin receptor expression and increases estrogen responsiveness in breast cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 88, 69–77.
18. Richer, J.K., Lange, C.A., Manning, N.G., Owen, G., Powell, R., y Horwitz, K.B. (1998). Convergence of Progesterone with Growth Factor and Cytokine Signaling in Breast Cancer. *J. Biol. Chem.* 273, 31317–31326.
19. Fang, R., Zhu, Y., Khadka, V.S., Zhang, F., Jiang, B., y Deng, Y. (2018). The Evaluation of Serum Biomarkers for Non-small Cell Lung Cancer (NSCLC) Diagnosis. *Front. Physiol.* 9, 1710.
20. Bernard, V., Young, J., Chanson, P., y Binart, N. (2015). New insights in prolactin: pathological implications. *Nat. Rev. Endocrinol.* 11, 265.
21. Freeman, M.E., Kanyicska, B., Lerant, A., y Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews* 80, 1523–1631.
22. Forsyth, I.A., y Wallis, M. (2002). Growth Hormone and Prolactin—Molecular and Functional Evolution. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* 7, 291–312.
23. Gillam, M.P., y Molitch, M.E. (2011). Prolactin. En *The Pituitary* (Elsevier), pp. 119–166.
24. Ben-Jonathan, N., y Hugo, E. (2015). Prolactin (PRL) in Adipose Tissue: Regulation and Functions. En *Recent Advances in Prolactin Research* (Springer, Cham), pp. 1–35.
25. Corbacho, A.M., De La Escalera, G.M., y Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/growth hormone/placental lactogen family in angiogenesis. *Journal of Endocrinology* 173, 219–238.
26. Teilum, K., Hoch, J.C., Goffin, V., Kinet, S., Martial, J.A., y Kragelund, B.B. (2005). RCSB PDB - 1RW5: Solution structure of human prolactin. Protein Data Bank. Disponible en: <http://www.rcsb.org/3d-view/1RW5>. Consultado el 10 de enero de 2021.
27. Harvey, S., Martínez-Moreno, C.G., Luna, M., y Arámburo, C. (2015). Autocrine/paracrine roles of extrapituitary growth hormone and prolactin in health and disease: An overview. *Gen. Comp. Endocrinol.* 220, 103–111.

28. Goodman, H.M. (2009). Chapter 14 - Hormonal Control of Pregnancy and Lactation. En *Basic Medical Endocrinology (Fourth Edition)*, H. M. Goodman, ed. (Academic Press), pp. 277–301.
29. Murray, J.F., y Le Tissier, P.R. (2020). Chapter 9 - Anterior Pituitary: Somatotrophs (GH) and Lactotrophs (PRL). En *Hormonal Signaling in Biology and Medicine*, G. Litwack, ed. (Academic Press), pp. 171–201.
30. Bernard, V., Young, J., y Binart, N. (2019). Prolactin — a pleiotropic factor in health and disease. *Nat. Rev. Endocrinol.* *15*, 356–365.
31. van Agthoven, J., Zhang, C., Tallet, E., Raynal, B., Hoos, S., Baron, B., England, P., Goffin, V., y Broutin, I. (2010). Structural characterization of the stem-stem dimerization interface between prolactin receptor chains complexed with the natural hormone. *J.Mol.Biol.* *404*, 112–126.
32. Clevenger, C.V., y Kline, J.B. (2001). Prolactin receptor signal transduction. *Lupus* *10*, 706–718.
33. Clevenger, C.V., Furth, P.A., Hankinson, S.E., y Schuler, L.A. (2003). The role of prolactin in mammary carcinoma. *Endocr. Rev.* *24*, 1–27.
34. Bugge, K., Papaleo, E., Haxholm, G.W., Hopper, J.T.S., Robinson, C.V., Olsen, J.G., Lindorff-Larsen, K., y Kragelund, B.B. (2016). A combined computational and structural model of the full-length human prolactin receptor. *Nat. Commun.* *7*, 11578.
35. Clevenger, C.V., Gadd, S.L., y Zheng, J. (2009). New mechanisms for PRLr action in breast cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* *20*, 223–229.
36. Gadd, S.L., y Clevenger, C.V. (2006). Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Mol. Endocrinol.* *20*, 2734–2746.
37. Abramicheva, P.A., y Smirnova, O.V. (2019). Prolactin Receptor Isoforms as the Basis of Tissue-Specific Action of Prolactin in the Norm and Pathology. *Biochemistry (Moscow)* *84*, 329–345.
38. Huang, K.-T., Tan, D., Chen, K.-H.E., y Walker, A.M. (2015). Blockade of estrogen-stimulated proliferation by a constitutively-active prolactin receptor having lower expression in invasive ductal carcinoma. *Cancer Lett.* *358*, 152–160.
39. Brooks, C.L. (2012). Molecular mechanisms of prolactin and its receptor. *Endocr. Rev.* *33*, 504–525.
40. Kline, J.B., Rycyzyn, M.A., y Clevenger, C.V. (2002). Characterization of a Novel and Functional Human Prolactin Receptor Isoform ( $\Delta$ S1PRLr) Containing Only One Extracellular Fibronectin-Like Domain. *Mol. Endocrinol.* *16*, 2310–2322.
41. Marano, R.J., y Ben-Jonathan, N. (2014). Minireview: Extrapituitary prolactin: an update on the distribution, regulation, and functions. *Mol. Endocrinol.* *28*, 622–633.

42. Levina, V.V., Nolen, B., Su, Y., Godwin, A.K., Fishman, D., Liu, J., Mor, G., Maxwell, L.G., Herberman, R.B., Szczepanski, M.J., et al. (2009). Biological significance of prolactin in gynecologic cancers. *Cancer Res.* *69*, 5226–5233.
43. Rider, L., y Diakonova, M. (2011). Adapter protein SH2B1beta binds filamin A to regulate prolactin-dependent cytoskeletal reorganization and cell motility. *Mol. Endocrinol.* *25*, 1231–1243.
44. Radhakrishnan, A., Raju, R., Tuladhar, N., Subbannayya, T., Thomas, J.K., Goel, R., Telikicherla, D., Palapetta, S.M., Rahiman, B.A., Venkatesh, D.D., et al. (2012). A pathway map of prolactin signaling. *J. Cell Commun. Signal.* *6*, 169–173.
45. Clapp, C., Thebault, S., Macotela, Y., Moreno-Carranza, B., Triebel, J., y Martínez de la Escalera, G. (2015). Regulation of blood vessels by prolactin and vasoinhibins. *Adv. Exp. Med. Biol.* *846*, 83–95.
46. Abdelbaset-Ismail, A., Pedziwiatr, D., Schneider, G., Niklinski, J., Charkiewicz, R., Moniuszko, M., Kucia, M., y Ratajczak, M.Z. (2017). Pituitary sex hormones enhance the pro-metastatic potential of human lung cancer cells by downregulating the intracellular expression of heme oxygenase-1. *Int. J. Oncol.* *50*, 317–328.
47. da Silva, P.L., do Amaral, V.C., Gabrielli, V., Montt Guevara, M.M., Mannella, P., Baracat, E.C., Soares, J.M., Jr, y Simoncini, T. (2015). Prolactin Promotes Breast Cancer Cell Migration through Actin Cytoskeleton Remodeling. *Front. Endocrinol.* *6*, 186.
48. Harrington, K.M., y Clevenger, C.V. (2016). Identification of NEK3 Kinase Threonine 165 as a Novel Regulatory Phosphorylation Site That Modulates Focal Adhesion Remodeling Necessary for Breast Cancer Cell Migration. *J. Biol. Chem.* *291*, 21388–21406.
49. Carreño, P.C., Sacedón, R., Jiménez, E., Vicente, A., y Zapata, A.G. (2005). Prolactin affects both survival and differentiation of T-cell progenitors. *J. Neuroimmunol.* *160*, 135–145.
50. Savino, W., Mendes-da-Cruz, D.A., Lepletier, A., y Dardenne, M. (2016). Hormonal control of T-cell development in health and disease. *Nature Reviews Endocrinology* *12*, 77–89.
51. Savino, W. (2017). Prolactin: An Immunomodulator in Health and Disease. *Front. Horm. Res.* *48*, 69–75.
52. Romero-Velasquez, A. (2018). Evaluación in vitro de derivados de bencimidazol-2-carbamato de metilo como inhibidores de la polimerización de la  $\beta$ -tubulina humana.
53. Utama, F.E., Tran, T.H., Ryder, A., LeBaron, M.J., Parlow, A.F., y Rui, H. (2009). Insensitivity of human prolactin receptors to nonhuman prolactins: relevance for experimental modeling of prolactin receptor-expressing human cells. *Endocrinology* *150*, 1782–1790.

54. Ben-Jonathan, N., Liby, K., McFarland, M., y Zinger, M. (2002). Prolactin as an autocrine/paracrine growth factor in human cancer. *Trends Endocrinol. Metab.* *13*, 245–250.
55. Yamaguchi, M., Erdenebaatar, C., Saito, F., Honda, R., Ohba, T., Kyo, S., Tashiro, H., y Katabuchi, H. (2020). Prolactin Enhances the Proliferation of Proliferative Endometrial Glandular Cells and Endometrial Cancer Cells. *J Endocr Soc* *4*, bvz029.
56. Lopez-Pulido, E.I., Muñoz-Valle, J.F., Del Toro-Arreola, S., Jave-Suárez, L.F., Bueno-Topete, M.R., Estrada-Chávez, C., y Pereira-Suárez, A.L. (2013). High expression of prolactin receptor is associated with cell survival in cervical cancer cells. *Cancer Cell Int.* *13*, 103.
57. Giuffrida, D., Perdichizzi, A., Giuffrida, M.C., La Vignera, S., D'Agata, R., Vicari, E., y Calogero, A.E. (2010). Does prolactin induce apoptosis? Evidences in a prostate cancer in vitro model. *J. Endocrinol. Invest.* *33*, 313–317.
58. Hachim, I.Y., López-Ozuna, V.M., Hachim, M.Y., Lebrun, J.-J., y Ali, S. (2019). Prolactin hormone exerts anti-tumorigenic effects in HER-2 overexpressing breast cancer cells through regulation of stemness. *Stem Cell Res.* *40*, 101538.
59. Seriwatanachai, D., Krishnamra, N., y Charoenphandhu, N. (2012). Chondroregulatory action of prolactin on proliferation and differentiation of mouse chondrogenic ATDC5 cells in 3-dimensional micromass cultures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *420*, 108–113.
60. Wongdee, K., Tulalamba, W., Thongbunchoo, J., Krishnamra, N., y Charoenphandhu, N. (2011). Prolactin alters the mRNA expression of osteoblast-derived osteoclastogenic factors in osteoblast-like UMR106 cells. *Mol. Cell. Biochem.* *349*, 195–204.
61. Flores-Fernández, R., Blanco-Favela, F., Fuentes-Pananá, E.M., Chávez-Sánchez, L., Gorocica-Rosete, P., Pizaña-Venegas, A., y Chávez-Rueda, A.K. (2016). Prolactin Rescues Immature B-Cells from Apoptosis Induced by B-Cell Receptor Cross-Linking. *J Immunol Res* *2016*, 3219017.
62. Karayazi Atici, Ö., Urbanska, A., Gopinathan, S.G., Boutillon, F., Goffin, V., y Shemanko, C.S. (2018). ATM Is Required for the Prolactin-Induced HSP90-Mediated Increase in Cellular Viability and Clonogenic Growth After DNA Damage. *Endocrinology* *159*, 907–930.
63. Cabrera-Reyes, E.A., Limón-Morales, O., Rivero-Segura, N.A., Camacho-Arroyo, I., y Cerbón, M. (2017). Prolactin function and putative expression in the brain. *Endocrine* *57*, 199–213.
64. Li, Y., Clevenger, C.V., Minkovsky, N., Kumar, K.G.S., Raghunath, P.N., Tomaszewski, J.E., Spiegelman, V.S., y Fuchs, S.Y. (2006). Stabilization of prolactin receptor in breast cancer cells. *Oncogene* *25*, 1896–1902.

65. Plotnikov, A., Varghese, B., Tran, T.H., Liu, C., Rui, H., y Fuchs, S.Y. (2009). Impaired turnover of prolactin receptor contributes to transformation of human breast cells. *Cancer Res.* *69*, 3165–3172.
66. Swaminathan, G., Varghese, B., Thangavel, C., Carbone, C.J., Plotnikov, A., Kumar, K.G.S., Jablonski, E.M., Clevenger, C.V., Goffin, V., Deng, L., et al. (2008). Prolactin stimulates ubiquitination, initial internalization, and degradation of its receptor via catalytic activation of Janus kinase 2. *J. Endocrinol.* *196*, R1–7.
67. Tan, D., Huang, K.T., Ueda, E., y Walker, A.M. (2008). S2 deletion variants of human PRL receptors demonstrate that extracellular domain conformation can alter conformation of the intracellular signaling domain. *Biochemistry* *47*, 479–489.
68. Huang, L.J., Constantinescu, S.N., y Lodish, H.F. (2001). The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell* *8*, 1327–1338.
69. Perrot-Appianat, M., Gualillo, O., Buteau, H., Edery, M., y Kelly, P.A. (1997). Internalization of prolactin receptor and prolactin in transfected cells does not involve nuclear translocation. *J. Cell Sci.* *110 (Pt 9)*, 1123–1132.
70. Galbaugh, T., Feeney, Y.B., y Clevenger, C.V. (2010). Prolactin Receptor–Integrin Cross-Talk Mediated by SIRP $\alpha$  in Breast Cancer Cells. *Mol. Cancer Res.* *8*, 1413–1424.
71. Howe, G.A., y Addison, C.L. (2012).  $\beta$ 1 integrin: an emerging player in the modulation of tumorigenesis and response to therapy. *Cell Adh. Migr.* *6*, 71–77.
72. Bridgewater, R.E., Streuli, C.H., y Caswell, P.T. (2017). Extracellular matrix promotes clathrin-dependent endocytosis of prolactin and STAT5 activation in differentiating mammary epithelial cells. *Sci. Rep.* *7*, 4572.