

Mg. EN QUÍMICA LILIANA DEL VALLE SOSA

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

**“MODULACIÓN DE LA RESPUESTA
SECRETORIA Y PROLIFERATIVA DE LA
CÉLULA LACTOTROPA POR ESTRADIOL EN
INTERACCIÓN CON TRH Y FGF2”**

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Nacional de Córdoba

República Argentina

2014

Signatura R-T

Tipus 574.87.34

N. de registre S
12415

Agència
Denominació de tor

Procediment
Expedient
Ordre Ministerial
Lletres
Región
Fecha de ingreso 7/7/2014

			
--	--	--	--

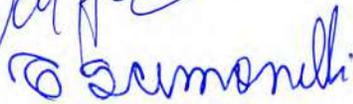
DIRECTOR DE TESIS: Prof. Dra. Alicia Inés Torres

COMISIÓN DE TESIS:

Prof. Dra. Cecilia Alvarez



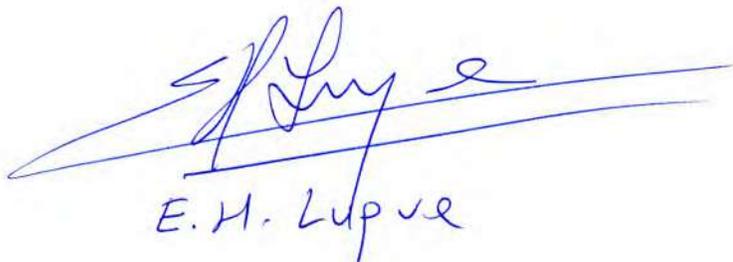
Prof. Dra. Teresa Scimonelli



Prof. Dr. Javier Valdez-Taubas



El presente trabajo de investigación se ha realizado en el Centro de Microscopía Electrónica, Facultad de Ciencias Médicas, INICSA-CONICET, Universidad Nacional de Córdoba.



E. H. Lupue

Por siempre enseñarme a seguir adelante...

A mi querida familia...

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer en primer lugar a Alicia por aceptarme para formar parte de este equipo de trabajo, por darme la oportunidad de realizar mi tesis doctoral bajo su dirección, por su apoyo y por confiar en mí en todo momento.

A los miembros de mi comisión: Dra. Teresa Scimonelli, Dra. Cecilia Álvarez y al Dr. Javier Valdez-Taubas por su disponibilidad, su interés y por las sugerencias realizadas a lo largo del desarrollo de esta tesis.

A Cristi por su continuo interés en mi trabajo, por sus palabras de apoyo y por su cariño.

A Patri gracias por su buena predisposición y generosidad.

A Elsa y Merce gracias por sus enseñanzas y los lindos momentos compartidos.

A Ana, Juan, Silvi y Jorge por dejarme ser parte de sus proyectos, por su predisposición, por sus enseñanzas y sus consejos.

A las muchachas del laboratorio Caro, Viki, Ali, Lu, Euge y Carito les quiero agradecer por su compañía y ayuda diaria, por su amistad y por cada uno de los momentos que hemos compartido en el laboratorio y en la vida. También, gracias por su alegría, su energía, sus ocurrencias y por todas las anécdotas compartidas.

A Clau gracias por la complicidad, por escucharme, por su ayuda desinteresada, por todos los hermosos momentos compartidos y por la linda amistad que mantenemos a la distancia.

A Amado gracias por su colaboración, por darme una mano en el uso de los programas de la compu, por las charlas y por su aporte particular en todos estos años en el laboratorio.

A Felix por su amistad y por todo los momentos que hemos compartido.

A los chicos del laboratorio: César, Pablo y Nahuel por su generosidad y su predisposición.

A Nati gracias por la buena onda, por darme siempre una mano y por los buenos momentos compartidos.

A Luci, Piru gracias por todo su cariño, por sus consejos y por su ayuda desinteresada.

A Néstor, Gaby y al Inge gracias por su buena predisposición, por sus enseñanzas y por la asistencia en todos los equipos del laboratorio, especialmente en el microscopio electrónico.

A Cristian y Oscar por su colaboración en las técnicas y en el mantenimiento de los animales.

A mis amigas de la vida Romi, Vale, Eli, Ceci y Ale por todos los mates y el tiempo compartido, por brindarme su apoyo, su colaboración, el ánimo y sobre todo por su cariño y amistad.

Por último, pero lo más importante, quiero agradecer especialmente a mis padres, Rodolfo y Elva, porque son las personas que hicieron de todo para que pudiera lograr mis sueños, por motivarme, por la paciencia, por su ejemplo de perseverancia y responsabilidad y por darme siempre una mano a través de la distancia. También a mis a mis hermanos, Eduardo y Sergio, por su continuo apoyo, por la paciencia y por ayudarme en todo momento.

Simplemente, GRACIAS!!! a toda la gente linda que durante este periodo hicieron posible la realización de este trabajo, acompañándome tanto en el crecimiento profesional y personal.

INDICE

Resumen	3
Introducción	5
Eje hipotálamo-hipofisario.....	6
Hipotálamo	6
La hipófisis.....	6
Poblaciones celulares de la adenohipófisis	9
Factores que regulan la actividad metabólica de las células lactotropas	11
Factores del hipotálamo	14
Factores intrahipofisarios	16
Receptores estrogénicos.....	21
Mecanismos de acción de los estrógenos	25
Acciones genómicas de los estrógenos.....	25
Acciones rápidas o no-genómicas de los estrógenos	27
Regulación de la secreción de prolactina por E2y TRH.....	30
Regulación de la población de células lactotropas mediada por E2 y FGF2	33
Objetivo general	37
Objetivos específicos:	37
Materiales y Métodos.....	38
Animales	39
Cultivos primarios de células adenohipofisarias	39
Diseños experimentales	41
1) Análisis del efecto del estradiol sobre la actividad secretoria de células lactotropas inducida por TRH.....	41
2) Estudio del efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas	42
Determinación de la liberación de PRL por radioinmunoensayo.....	43
Evaluación de la proliferación celular por incorporación de BrdU	44
Identificación del receptor de FGF en células lactotropas por inmunocitoquí-mica ultraestructural.....	45

Determinación del RE α de membrana en la población de células lactotropas mediante citometría de flujo	47
Preparación de los lisados celulares para el análisis de proteínas mediante Western Blot.....	48
Análisis de interacción del RE α y RFGF por co-inmunoprecipitación.....	51
Determinación de la interacción del RE α y RFGF mediante inmunocitoquí-mica ultraestructural.....	52
Localización subcelular de proteínas por microscopía laser confocal	54
Análisis estadístico.....	55
Resultados	56
Caracterización del cultivo primario de células adenohipofisarias	57
1) Análisis del efecto del estradiol sobre la actividad secretoria inducida por TRH en células lactotropas.....	59
Secreción de PRL en cultivo primario de células adenohipofisarias.....	59
Participación de la vía PI3K/Akt en la liberación de PRL	63
Participación de la vía MEK/ERK 1/2 en la liberación de PRL.....	68
Movilización del ER α hacia la membrana plasmática en células adenohipofisarias..	71
2) Estudio del efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas.....	74
Respuesta proliferativa de lactotropas en cultivo inducida por E2 y FGF2.....	74
Participación de los receptores estrogénicos en la proliferación de células lactotropas	75
Participación de los RE de membrana en la actividad mitogénica de lactotropas inducida por E2/FGF2	76
Análisis de la expresión del receptor de FGF en células lactotropas	77
Evaluación de la interacción de los RE α y RFGF	79
Análisis de la señalización intracelular involucrada en la proliferación de las células lactotropas inducida por E2 y FGF2	82
Discusión.....	85
Conclusiones.....	102
Publicaciones y presentaciones en congresos	105
Abreviaturas	108
Bibliografía.....	110

RESUMEN

La actividad metabólica de las células lactotropas está regulada por diferentes neuropéptidos y neurohormonas hipotalámicas, factores intrapituitarios y hormonas liberadas por glándulas endocrinas periféricas. Dentro de este último grupo, el 17β -estradiol (E2) es un importante regulador que tiene la capacidad de modular la respuesta de las células lactotropas a la mayoría de los factores hipotalámicos e hipofisarios.

El principal objetivo del este trabajo fue estudiar los mecanismos involucrados en el rol modulador del estradiol sobre la actividad secretoria y proliferativa de las células lactotropas inducida por TRH o FGF2, analizando la participación de receptores estrogénicos (RE) citoplasmáticos/nucleares y de membrana y las vías de señalización involucradas en los efectos mencionados.

En la primera parte se analizaron los efectos rápidos del estradiol sobre la actividad secretoria de células lactotropas inducida por TRH en cultivos de células adenohipofisarias de ratas hembras los cuales fueron tratados con: E2; E2-BSA (forma impermeable a membrana); solos o combinados con TRH por 30min. La incubación con E2-BSA/TRH promovió los niveles más altos de liberación de prolactina (PRL) en el medio de cultivo, alcanzando $\approx 60\%$ con respecto a los inducidos por TRH. La participación de los RE fue confirmada con el antagonista específico de los RE el cual inhibió la secreción de PRL promovida por E2-BSA/TRH. En el análisis de la vía involucrada en la actividad secretoria de las células lactotropas estimulada por E2-BSA/TRH, se observó que los inhibidores de PI3K bloquearon totalmente la liberación de PRL. Además, se visualizó la translocación de la subunidad p85 α desde el citoplasma hacia la membrana plasmática de las células lactotropas tratadas con E2-BSA/TRH, lo cual fue correlacionado con el aumento de la fosforilación de Akt. En conjunto, estos resultados sugieren que los RE de membrana estarían mediando el efecto del E2 sobre la liberación de PRL inducida por TRH a través de la vía PI3K/Akt. Posteriormente, se analizaron las variaciones en la expresión del RE α en la membrana plasmática de lactotropas en respuesta a los diferentes estímulos. Se observó un aumento de la

expresión a los RE α en membrana inducida por E2, reflejado en la mayor intensidad de fluorescencia, sugiriendo la mayor expresión de los RE α en la membrana plasmática de esta población celular.

En la segunda parte de este trabajo se analizó el efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas, para lo cual las células adenohipofisarias en cultivo fueron tratadas con E2 o E2-BSA; solos o combinados con FGF2. Sólo el tratamiento con E2/FGF2 por 4h promovió la actividad mitogénica de las lactotropas, obteniéndose una respuesta proliferativa similar luego del tratamiento con el agonista del RE α (PPT)/FGF2. El tratamiento con E2-BSA/FGF2 por 30 min indujo un aumento en el porcentaje de células lactotropas, indicando la participación de los RE de membrana en la actividad mitogénica promovida por E2/FGF2. Un hallazgo importante fue observar la asociación entre el receptor de FGF y el RE α en células adenohipofisarias estimuladas con E2/FGF2. Además, en el análisis de la vía MEK/ERK 1/2 se observó un aumento en la fosforilación de ERK1/2 luego de los tratamientos combinados de la hormona esteroidea y FGF2. La participación de la vía MEK/ERK 1/2 fue confirmada con la pre-incubación con el inhibidor de MEK, el cual bloqueó totalmente el efecto mitogénico ejercido por E2/FGF2 y PPT/FGF2. Estos resultados sugieren que MEK/ERK1/2 sería la vía en común activada por los RFGF y RE α de membrana con la contribución del "pool" del RE α intracelular, desencadenando finalmente el aumento de la actividad mitogénica de células lactotropas.

Este trabajo de tesis contribuye al conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que participan en el rol modulador y cooperativo del E2 sobre TRH y FGF2, factores que regulan la actividad metabólica de células lactotropas. Estos mecanismos podrían estar involucrados en las fluctuaciones de los niveles séricos de PRL y en la plasticidad que presenta la población de células lactotropas en diferentes estadios reproductivos en respuesta a mayores requerimientos hormonales.

Introducción



Eje hipotálamo-hipofisario

El eje hipotálamo-hipofisario forma una unidad del sistema endocrino, de gran importancia en la integración de las señales provenientes del medio externo e interno, coordinando respuestas apropiadas, mediante la producción y secreción de neurotransmisores o neurohormonas que impactan en la actividad funcional de diferentes órganos blancos. Entre las funciones que regula este eje se encuentran el crecimiento somático, la maduración de las gónadas, la adaptación de la corteza adrenal al estrés, la secreción de leche, la liberación de hormonas tiroideas y la excreción de agua en el riñón. También contribuye a la regulación de la presión sanguínea y del gasto energético global del organismo.

Hipotálamo

El hipotálamo constituye una compleja asociación de elementos celulares y tractos nerviosos que combinan la actividad secretora y neuronal. Está ubicado en la base del cerebro por debajo del tálamo y sobre la pared lateral del tercer ventrículo. En el hipotálamo se producen hormonas, neuropéptidos y monoaminas, que determinan la liberación o inhibición de hormonas específicas de la hipófisis. Estos factores hipotalámicos se sintetizan en los cuerpos neuronales y son transportadas por los axones hasta la porción basal del hipotálamo, conocida como eminencia media. Desde allí, son liberadas a una red de capilares de tipo sinusoidales que forman parte del sistema de circulación porta hipotálamo-hipofisario, que se dirigen hacia la hipófisis y dan origen a una segunda red de capilares de la hipófisis (Figura 1).

La hipófisis

La hipófisis o glándula pituitaria es una pequeña glándula asentada en una depresión del hueso esfenoides del cráneo denominada silla turca. La cara superior de esta glándula está recubierta por el diafragma hipofisario, constituido por una dependencia de la duramadre, que sólo es atravesada por el tallo pituitario mediante el cual mantiene la continuidad anatómica con el hipotálamo.

La hipófisis está compuesta por dos partes histológica y funcionalmente diferentes: una porción neural que se origina a partir del techo del tercer ventrículo

denominado neurohipófisis o lóbulo posterior y una porción epitelial que embriológicamente deriva de una extensión de la bolsa de Ratke la cual se denomina adenohipófisis o lóbulo anterior.

La neurohipófisis está formada por la eminencia media, el tallo infundibular y la pars nervosa. En esta última se encuentran los axones de las neuronas de los núcleos hipotalámicos supraóptico y paraventricular que secretan las hormonas vasopresina y oxitocina respectivamente ante la llegada de estímulos específicos (Figura 1.

La adenohipófisis comprende el 80% de la glándula y está compuesta por tres partes:

- Pars distalis o lóbulo anterior que es la responsable de la síntesis y liberación a la circulación sanguínea de seis hormonas, todas ellas de naturaleza peptídica.
- Pars intermedia que produce dos polipéptidos llamados melanotropinas u hormonas estimulantes de los melanocitos conocida como MSH, que inducen el aumento de la síntesis de melanina de las células de la piel.
- Pars tuberalis que es una región altamente vascularizada que envuelve el tallo hipofisario.

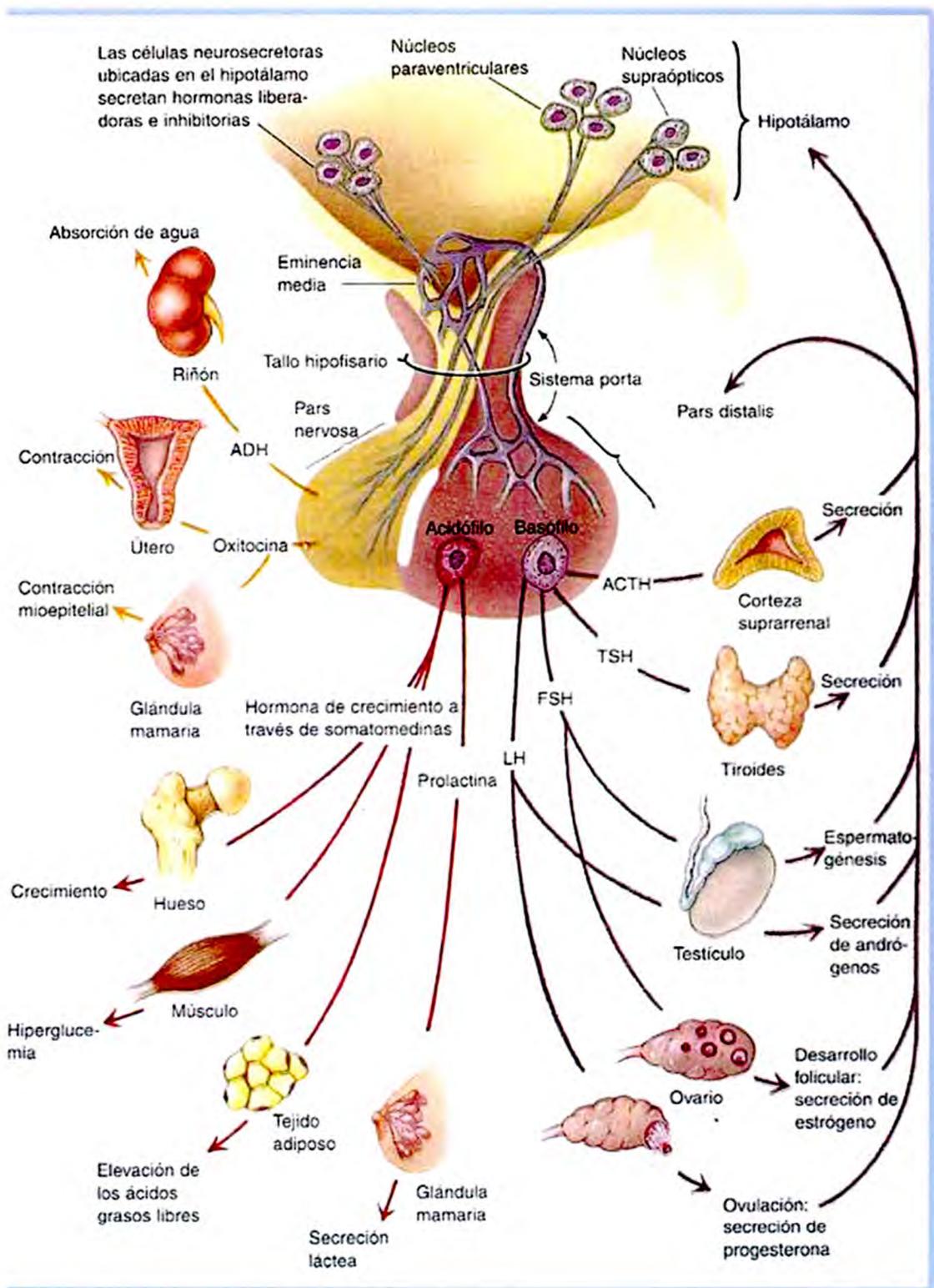


Figura 1: Esquema del sistema Hipotálamo–Hipofisario–Órganos Blancos.

Poblaciones celulares de la adenohipófisis

En la adenohipófisis se encuentran las células foliculo estrelladas y cinco poblaciones celulares productoras de hormonas. Las células foliculo estrelladas constituyen una población celular agranular ya que no secretan hormonas, que se caracterizan por su forma estrellada y largos procesos citoplasmáticos [7]. Estas células cumplen la función de sostén, fagocitosis de restos celulares y síntesis y liberación diferentes factores angiogénicos (VEGF), factores de crecimiento (FGF2, TGF- β 1) y citoquinas (IL-6, IL-1, TNF- α) que actúan localmente por mecanismos autocrinos o paracrinos [8-12]. Estos factores regulan la actividad de diferentes poblaciones que componen la adenohipófisis durante el desarrollo postnatal y participan activamente en cambios adaptativos que ocurren en la vida adulta de la mujer tales como ciclo estral, embarazo y lactancia donde la glándula hipofisaria muestra notables fluctuaciones de los diferentes tipos celulares que la componen [13, 14].

Las diferentes células secretoras de hormonas fueron identificadas a nivel ultraestructural por las características de los gránulos secretorios y su identidad fue confirmada mediante técnicas inmunocitoquímicas que permiten marcar con anticuerpos específicos los productos hormonales sintetizados y almacenados en el citoplasma.

Las células **somatotropas**, productoras de hormona de crecimiento (GH), constituyen alrededor del 50 % de la población celular de la adenohipófisis en ratas machos, presentando un porcentaje menor las hembras. Poseen numerosos gránulos de perfil esférico, con un contenido electrodensito cuyo diámetro oscilan entre 200-350 nm [15, 16].

Las células **corticotropas** producen (ACTH) y representa entre el 15-20 % de las células hipofisarias. Contienen en su citoplasma pequeños gránulos de secreción redondos con un núcleo electrodensito.

Las células **gonadotropas** sintetizan y liberan gonadotropinas, hormona foliculo estimulante y luteinizante (FSH y LH) y constituyen alrededor del 15 % de la población de la glándula. Presentan abundantes gránulos secretorios redondos de 150nm y otros

de mayor tamaño (400nm) que son menos frecuentes y con electrodensidad variable [17].

Las células **tirotropas** son productoras de tirotrófina (TSH). Se encuentran en menor proporción que las demás poblaciones celulares y contienen gránulos secretorios de densidad electrónica variable, la mayoría esféricos y con un diámetro entre 100-150 nm, generalmente alineados en la membrana plasmática [15].

Las células **lactotropas**, encargadas de la síntesis y secreción de prolactina (PRL) constituyen la población de interés en esta tesis. Particularmente nos propusimos abordar el estudio de la regulación de la actividad secretoria y proliferativa de esta población de células adenohipofisarias. En ratas hembras, las lactotropas constituyen alrededor del 35% de las células de la hipófisis anterior y aumentan de tamaño y número durante la preñez y lactancia [18-20], siendo el porcentaje de esta población menor en ratas macho. Ultraestructuralmente se caracterizan por contener gránulos secretorios de tamaños variados, de forma irregular y con un diámetro promedio entre 500 y 900 nm [21].

Se han descrito y caracterizado tres tipos de subpoblaciones de células lactotropas presentes en la hipófisis anterior de roedores, mediante microscopía electrónica. Fueron clasificadas como tipo I, II y III tomando como parámetro comparativo el tamaño y forma de los gránulos secretorios [22]. Las lactotropas tipo I fueron originalmente identificadas como típicas y son características en el animal adulto. Contienen gránulos secretorios polimórficos grandes de elevada electrodensidad, con un diámetro promedio de 500-900 nm. Presentan características de células con gran actividad biosintética, marcado desarrollo de organelas proteinopoyéticas (retículo endoplasmático rugoso y Complejo de Golgi) y numerosos gránulos inmaduros asociados a la cara trans de complejo de Golgi [23, 24]. Las lactotropas atípicas constituyen alrededor del 10% de las células de adenohipófisis de rata normal adulta. Comprenden el tipo II con gránulos esféricos de diámetro entre 200-250nm y el tipo III que contienen gránulos de alrededor de 100 nm de diámetro. Las variaciones en el porcentaje de los diferentes subtipos dependen del sexo, edad, de los cambios en los niveles hormonales y de factores que regulan esta población,

variantes que estarían relacionadas con su actividad secretoria [25]. En las ratas macho y hembra de 10 días de edad, la mayoría de las células lactotropas son del tipo III, presentando una baja proporción del tipo I. En cambio, en ratas adultas, las proporciones de los tipos son muy diferentes. En ratas hembra presentan el 80% del tipo I, 15% del tipo II y 2-4% del tipo III; en comparación con las ratas macho que poseen el 40% del tipo I, 50% del tipo II y 10% del tipo III [22-24].

En este trabajo de tesis se utilizó como modelo experimental, cultivos primarios adenohipofisarios de ratas hembra, en los cuales la población de células lactotropas representan la mayor proporción, principalmente células lactotropas típicas [26].

Factores que regulan la actividad metabólica de las células lactotropas

La regulación de la actividad metabólica de las lactotropas está ejercida a tres niveles: hipotalámico, intrahipofisario y periférico (Figura 2). Estos tres niveles se encuentran interconectados y regulados por mecanismos de retroalimentación positiva o negativa con el fin de mantener la homeostasis de esta población celular. Este control es ejercido principalmente por diferentes neuropéptidos y neurohormonas liberadas por el hipotálamo. Así también, participan factores intrapituitarios, donde la comunicación intercelular es clave para modular la secreción de PRL y el crecimiento de esta población. Numerosos factores tales como hormonas, factores de crecimiento y citoquinas son liberados por las lactotropas y por otros tipos celulares de adenohipófisis involucrados en la regulación a través de mecanismos autocrinos o paracrinos [3, 6]. Por último, a nivel periférico las hormonas esteroideas y no esteroideas secretadas por los órganos blancos tales como glucocorticoides, insulina, hormonas tiroideas y estrógenos también participan en el control del tamaño de la población de lactotropas y de la liberación de PRL.

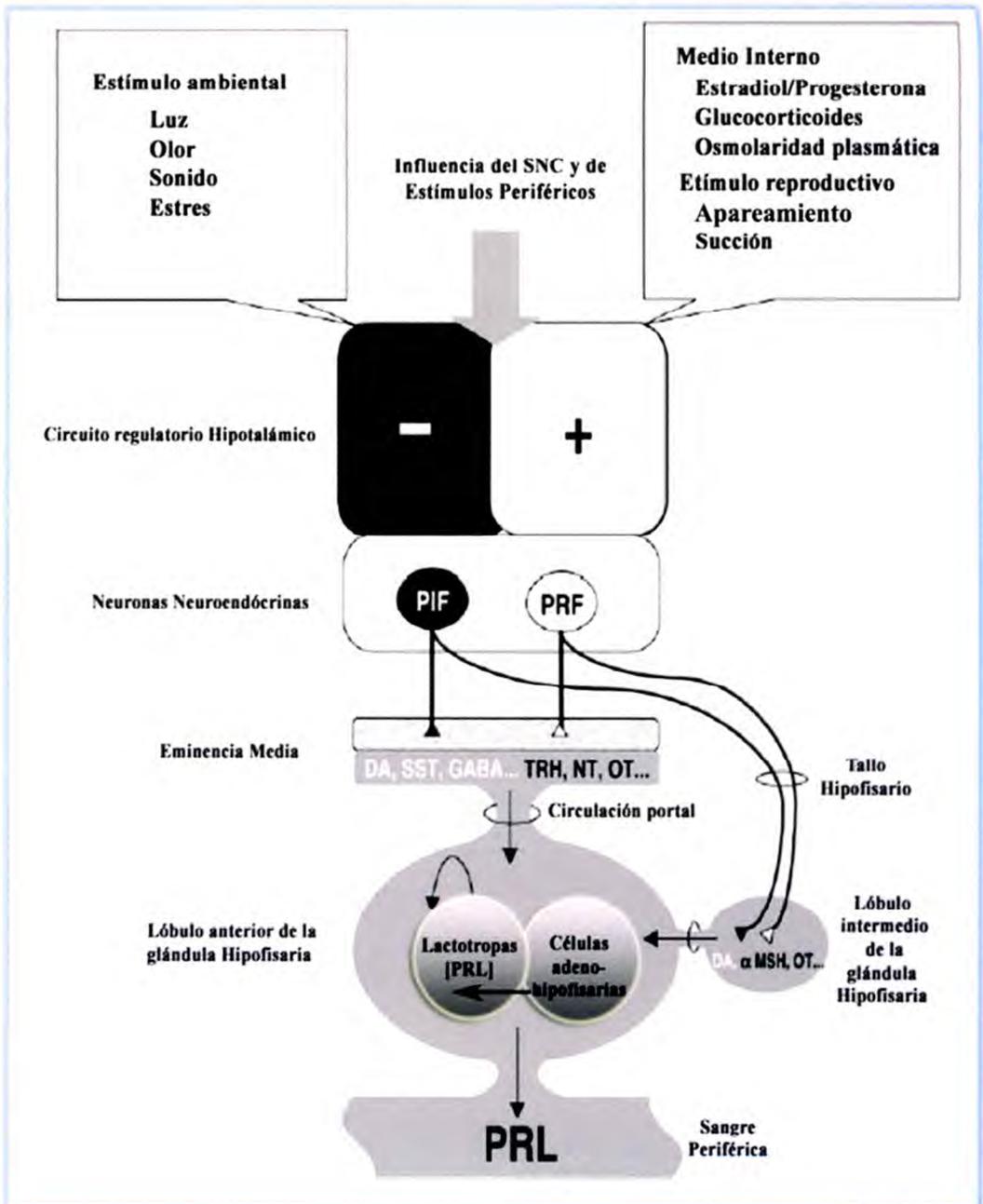


Figura 2: Esquema general de los niveles de regulación de la secreción de prolactina. PIF: factores de inhibición de prolactina (PRL): dopamina (DA), somatostatina, y ácido g-aminobutírico (GABA). PRF: factores de liberación de PRL: hormona liberadora de tirotropina (TRH), oxitocina (OT), neurotensina (NT), hormona melanocito estimulante (MSH). Los factores estimulatorios o inhibitorios pueden ser liberados a la eminencia media y luego a la glándula hipofisaria por circulación portal o desde la neurohipófisis. Las células lactotropas también están influenciadas por el PRF y PIF liberados de células vecinas (regulación paracrina) o por las células lactotropas (regulación autocrina). Esquema extraído de Freeman, M, *Physiological Reviews*, 2000 con modificaciones.[3]

Entre las hormonas periféricas, los estrógenos son los principales moduladores de la actividad funcional de las lactotropas actuando tanto a nivel hipotalámico como hipofisario de manera directa o modificando la sensibilidad de las células para responder a los diferentes factores fisiológicos activadores o inhibidores.

Los **estrógenos** son hormonas sexuales esteroideas (derivadas del ciclopentanoperhidrofenantreno) de tipo femenino principalmente, producidos por los ovarios, la placenta durante el embarazo y en menores cantidades, por las glándulas adrenales. Esta hormona regula la expresión génica ejerciendo además diferentes efectos sobre los tejidos blanco. Son esenciales para las funciones reproductivas de la mujer, estimulan la secreción de las gonadotrofinas y prolactina [27, 28] y participan en la remodelación de la adenohipófisis actuando sobre diferentes poblaciones celulares en condiciones fisiológicas tales como el ciclo estral y menstrual, lactancia y preñez [18, 20, 29].

Hay tres estrógenos endógenos importantes en hembras, la estrona (E1) el 17β -estradiol (E2) y el estriol (E3). El E2 es el estrógeno mayormente asociado con el desarrollo y las funciones reproductivas específicas. Los niveles de E2 en las mujeres varían en magnitud desde el desarrollo temprano hasta la edad reproductiva en un rango de concentraciones de pM a nM. El E1 contribuye en la etapa reproductiva (0,5-10 nM) y en la postmenopausia (150-200pM); mientras que los niveles de E3 son mayores durante la preñez (10-100nM). Por otro lado, los niveles de los estrógenos en machos son muy bajos y presentan pocas variaciones en el desarrollo de la vida (Figura 3) [30].

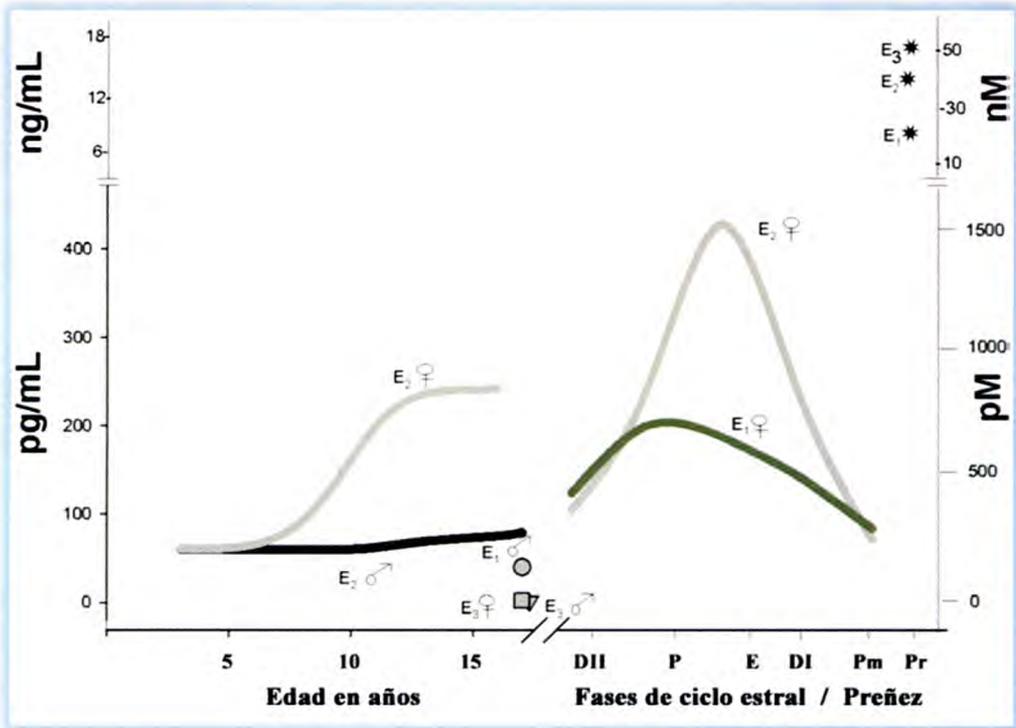


Figura 3: Niveles de los estrógenos en diferentes estados de la vida en hembras comparados con machos. Niveles de los estrógenos: estrón, estradiol y estriol (E₁, E₂, and E₃, respectivamente) en hembras (♀) y en machos (♂). Fases del ciclo estral : diestro II (DII), proestro (P), estró (E), diestro (DI), Post-menopausia (Pm) y preñez (Pr*). Gráfico extraído de Jeng et al.: 2010 con modificaciones [1].

Factores del hipotálamo

El hipotálamo en respuesta a estímulos variados del medio externo o interno libera diferentes hormonas y péptidos que tienen acción trófica en las células lactotropas. Los factores estimulatorios o inhibitorios que modulan tanto el tamaño de esta población celular como la liberación de PRL de mayor relevancia son los siguientes:

Hormona liberadora de tirotrófina (TRH): neurohormona considerada como el principal factor fisiológico que estimula la secreción de PRL de una manera dosis dependiente provocando la liberación rápida de la PRL almacenada en gránulos y aumentando la tasa de síntesis hormonal [31]. Sus efectos son mediados por receptores presentes en las células de la hipófisis anterior y específicamente en la

población de células lactotropas[32]. El estradiol ejerce un efecto regulatorio sobre TRH tanto a nivel hipotalámico, facilitando su liberación, como en las células lactotropas induciendo la transcripción del ARNm del receptor de TRH.

Péptido liberador de prolactina (PrRP): es el factor específico, de origen hipotalámico, capaz de inducir la liberación de prolactina en ratas en la fase del proestro con una potencia menor que TRH; no actúa en las otras fases del ciclo estral ni en ratas machos [33]. En estudios iniciales, se encontró que este péptido estimula específicamente la secreción de prolactina en una línea celular derivada de un adenoma hipofisario de rata y en cultivos adenohipofisarios provenientes de ratas lactantes [34]. Además, se ha detectado el ARNm de y su receptor en hipófisis normales y tumorales en humanos [35]. PrRP puede modular indirectamente la secreción de prolactina a través de diferentes sitios centrales y de otras regiones periféricas como la médula suprarrenal, páncreas, testículos [36] y la placenta [37]

Angiotensina II (AngII): es un factor sintetizado en el hipotálamo, principalmente en la eminencia media y estimula la secreción de PRL *in vivo* actuando sobre sus receptores específicos AT tipo 1 y 2 expresado en células lactotropas [38, 39]. Los estrógenos estarían implicados directamente en la modulación de los receptores AT, causando una regulación diferencial de los mismos en las células lactotropas [40]. En cultivos celulares, AngII fue identificada en gonadotropas siendo liberada en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH). El estímulo con GnRH es capaz de inducir la liberación de PRL solo cuando las lactotropas son co-cultivadas con gonadotropas, hallazgo que permite sugerir el efecto paracrino de AngII sobre la liberación de PRL [26].

Dopamina: es considerada un potente inhibidor fisiológico de la actividad metabólica de la población de células lactotropas en estudios realizados *in vivo e in vitro*. Ejerce su efecto directo por unión a los receptores de dopamina D2, localizados en las células lactotropas [41]. Se han descrito diferentes mecanismos por los cuales dopamina inhibe la función de las células lactotropas, entre los que se encuentran la inhibición de la vía adenilato ciclasa/AMPC/PKA ó de la producción de inositol trifosfato con una reducción de los niveles de Ca^{+2} . La activación de los receptores D2

produce la supresión del gen de PRL como así también la inhibición tónica de la síntesis y la liberación de esta hormona. Ejerce además, acción antimitogénica a través de la inhibición de la síntesis del ADN y la división celular, efectos que son menos potentes en presencia de los estrógenos. Por otra parte, se ha descripto que alteraciones o ausencia selectiva de los receptores D2 en modelos de ratones knock-out origina hiperplasia de las células lactotropas [42] y posterior formación de adenomas hipofisarios [43].

Somastostatina: también denominada hormona inhibidora de la liberación de la hormona de crecimiento, es sintetizada en el hipotálamo y liberada a la circulación porta hipofisaria. En cultivos de células adenohipofisarias inhibe la secreción de PRL en condiciones basales y estimuladas [44]. La acción inhibitoria de la somatostatina sobre la liberación de PRL es sensibilizada por los estrógenos, induciendo un aumento de los receptores de somastostatina en la membrana de las células lactotropas [45].

Factores intrahipofisarios

La regulación de la función de las células lactotropas también está mediada por factores intrahipofisarios que actúan a través de mecanismos paracrinos o autocrinos. Estos mecanismos en muchos casos se encuentran interconectados, manteniendo la homeostasis de la población.

Entre los factores intrahipofisarios, hay numerosos **factores de crecimiento**, la mayoría de naturaleza proteica, quienes junto con las hormonas y neurotransmisores desempeñan una importante función en la comunicación intercelular, regulando el tamaño de las diferentes poblaciones celulares y la liberación de hormonas específicas [46]. Los factores de crecimiento, características y funciones generales de los mismos se describen a continuación:

Factor de crecimiento transformante β (TGF- β) pertenece a una superfamilia de factores de crecimiento que incluye tres isoformas: TGF- β 1, β 2 y β 3, proteínas homodiméricas producidas por una gran variedad de células incluidas las lactotropas. El TGF- β es sintetizado como un precursor inactivo, que debe ser escindido proteolíticamente para generar la proteína activa. Dentro de esta familia el **TGF β 1**

sintetizado por las células lactotropas, actúa en forma autocrina inhibiendo la expresión del gen de PRL y la secreción de la hormona como así también la proliferación de esta población celular [47, 48]. La inhibición autocrina ejercida por este factor sobre lactotropas, está regulada por el estradiol, el cual disminuye la expresión de TGF- β 1 y de su receptor [49].

El **TGF β 3** también es producido por las células lactotropas y estimula su proliferación, ejerciendo efectos contrarios a TGF β 1. Su acción sería indirecta y estaría mediada por el factor de crecimiento fibroblástico básico, que es secretado por las células foliculo estrelladas [8]. Este efecto es modulado por el estradiol, el cual induce la producción y liberación de TGF β 3 en lactotropas, actuando luego sobre las células foliculo estrelladas estableciendo la comunicación entre estos tipos celulares. Este mecanismo de regulación paracrino es relevante y contribuye al mantenimiento del tamaño de la población de lactotropas [50].

Ambas isoformas de TGF β se unen a dos receptores celulares tipo I y II, con actividad serina-treonina-quinasa, desencadenando la fosforilación de proteínas citoplásmicas denominados Smads. Diferentes isoformas de las Smads (Smad1, 2, 3, 5 y 8) fosforiladas se unen a Smad4 para formar heterodímeros que translocan al núcleo y se asocian a proteínas de unión al ADN para activar o inhibir la transcripción de genes específicos.

Factor de crecimiento epidérmico (EGF) es otro importante regulador que actúa principalmente sobre las células lactotropas estimulando la transcripción del gen de PRL y su secreción [51]; como así también la proliferación de lactotropas en cultivo de células adenohipofisarias y en la línea tumoral GH3 [52, 53]. Además, se ha observado que este factor induce aumento de la expresión de los receptores de dopamina D2 en las células lactotropas generando un balance entre efectos estimulatorios e inhibitorios. Las acciones del EGF son mediadas por la activación del receptor de EGF, constituido por una familia de receptores, denominados EGFR/ErbB1, ErbB2/Her2, ErbB3 y ErbB4. Sus efectos pueden estar modulados por estradiol el cual estimula la secreción de EGF en la adenohipofisis de rata. Ha sido descrito un

aumento de los niveles de EGF en el proestro participando así de la liberación de PRL observada en esta fase del ciclo estral [54, 55].

Factor de crecimiento transformante α (TGF- α): es también expresado en la adenohipófisis, aumenta la actividad mitogénica de las células lactotropas a través de la unión al receptor de EGF que se encuentra expresado en este tipo celular [56]. Además, se ha observado que las acciones de TGF- α son moduladas por estradiol, el cual estimula la expresión del gen e incrementa los niveles de ARNm de TGF α en lactotropas [57].

Factor de crecimiento tipo Insulina (IGF-1): es miembro de una familia de factores de crecimiento comprendida por: IGF-1, IGF-II, insulina y otras proteínas asociadas [58]. Este factor es sintetizado principalmente en el hígado, pero varios tejidos tienen la capacidad de producirlo incluyendo la hipófisis anterior [59]. En adenohipófisis de rata sería sintetizado y secretado por las células folículo estrelladas, regulando indirectamente la secreción de PRL a través de la estimulación de la liberación del péptido intestinal vasoactivo [60]. Además, IGF-1 podría inducir la proliferación de las células lactotropas por un mecanismo paracrino, por acción de factores sintetizados por células gonadotropas, tipo celular que expresa receptores para IGF-1 [61]. A su vez el efecto proliferativo de IGF-1 sería modulado por los niveles de estradiol que pueden inducir un aumento o una disminución de la proliferación celular [62, 63].

Factor de crecimiento fibroblástico básico (FGF2): es un potente mitógeno, el más abundante en la adenohipófisis [64], siendo las células folículo estrelladas la principal fuente del mismo [65]. El FGF2 está involucrado en el control de la secreción de PRL y en la proliferación de las células lactotropas mediados por la unión a su receptor de alta afinidad tipo I, expresado en las células hipofisarias [66]. Este factor de crecimiento, en altas concentraciones o de manera dosis dependiente, aumenta los niveles de PRL y TSH en cultivos primarios de células adenohipofisarias después de periodos prolongados de incubación [67]. Así también, se ha reportado que FGF2 induce un marcado aumento en la expresión de ARNm de PRL en la línea celular derivada de un tumor de la hipófisis de rata GH3 [68]. Los efectos sobre la

proliferación de células lactotropas inducidos por el FGF2 serían modulados en parte por la presencia del estradiol, quien provoca la liberación de TGF- β 3 en este tipo celular. TGF- β 3 actúa sobre las células folículo estrelladas estimulando la síntesis y la secreción de FGF2 [8].

Las acciones de los factores de crecimiento (EGF, TGF- α , IGF-1 y FGF2) son mediadas por la unión a sus receptores de membrana específicos, con actividad tirosina quinasa intrínseca, expresados en las poblaciones celulares adenohipofisarias. Luego de la unión del factor de crecimiento a su receptor, ocurren cambios conformacionales de la proteína, que inducen la autofosforilación de residuos de tirosina específicos del dominio citoplasmático del receptor. Estos cambios en el receptor exponen sitios de unión de proteínas adaptadoras y la posterior activación de quinasas de diferentes cascadas de señalización intracelular clásicamente involucradas en las acciones inducidas por factores de crecimiento, que incluyen: fosfolipasa C (PLC), proteínas quinasas A (PKA), fosfatidilinositol 3 quinasa (PI3K) y proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK) [69-72]. También, se ha reportado la activación de las diferentes isoformas de proteínas quinasas C (PKC) entre las que se incluyen las clásicas (α , β y γ), noveles (δ , ϵ , θ y η) y atípicas (ζ y ι) [73-75]. Por otro lado, se ha descrito la participación de la vía del GMPc y óxido nítrico, de la proteína activadora de GTPasa asociada al proto-oncogen RAS, como así también miembros de la familia de proteínas quinasas SRC [76, 77].

En la adenohipófisis se sintetizan además, otros péptidos que actúan regulando la actividad metabólica de las lactotropas entre los que se encuentran la galanina, el péptido intestinal vasoactivo y la calcitonina; siendo sus funciones generales las siguientes:

Galanina: es sintetizada en el sistema nervioso central y periférico, así como en otros tejidos incluyendo la hipófisis anterior, donde su producción es estimulada por los estrógenos [78]. Los receptores para este factor se encuentran expresados en células lactotropas, somatotropas y tirotropas. Este factor regula la expresión del gen de PRL y estimula su liberación, como así también la proliferación de células

lactotropas y gonadotropas [79]. La síntesis de galanina fluctúa con los niveles de estradiol durante el ciclo estral, preñez y lactancia [80].

Péptido intestinal vasoactivo (VIP) es sintetizado en el yeyuno o colon como una hormona gastrointestinal. También fue localizado en la adenohipófisis de rata en las subpoblaciones de células lactotropas [81, 82] y en otros tipos celulares [83]. Este péptido estimula la secreción de PRL de manera autocrina o paracrina [84]. Ha sido descrito que los estrógenos regulan la liberación de VIP modulando la actividad secretoria y proliferativa de las lactotropas. Además, VIP puede actuar estimulando la proliferación de las células lactotropas a través de la inhibición de TGF- β 1, importante factor inhibitorio presente en adenohipófisis [85, 86].

Calcitonina es sintetizada y liberada por las células gonadotropas, actúa a través de la unión a sus receptores expresados en las células lactotropas inhibiendo de manera paracrina la síntesis y secreción de PRL [87]. Además, este factor tiene acción antiproliferativa indirecta sobre las lactotropas, ya que induce un aumento de la síntesis de TGF- β 1. Por otro lado, los esteroides ováricos inhiben la expresión del gen de calcitonina, como así también la de TGF- β 1, regulando de esta manera sus efectos sobre las lactotropas [88, 89].

Los diferentes mecanismos de regulación ejercidos a nivel hipotalámico e intrahipofisario convergen simultáneamente sobre la población de células lactotropas, las que a su vez pueden ser reguladas por otros factores (Figura 4). Como se describió anteriormente, el estradiol es un importante modulador que tiene la capacidad de modificar la respuesta de las células lactotropas a la mayoría de los factores hipotalámicos e hipofisarios antes mencionados. Los mecanismos por los cuales actúan están finamente balanceados entre ellos para regular la actividad secretoria y proliferativa de esta población celular en diferentes estados fisiológicos.

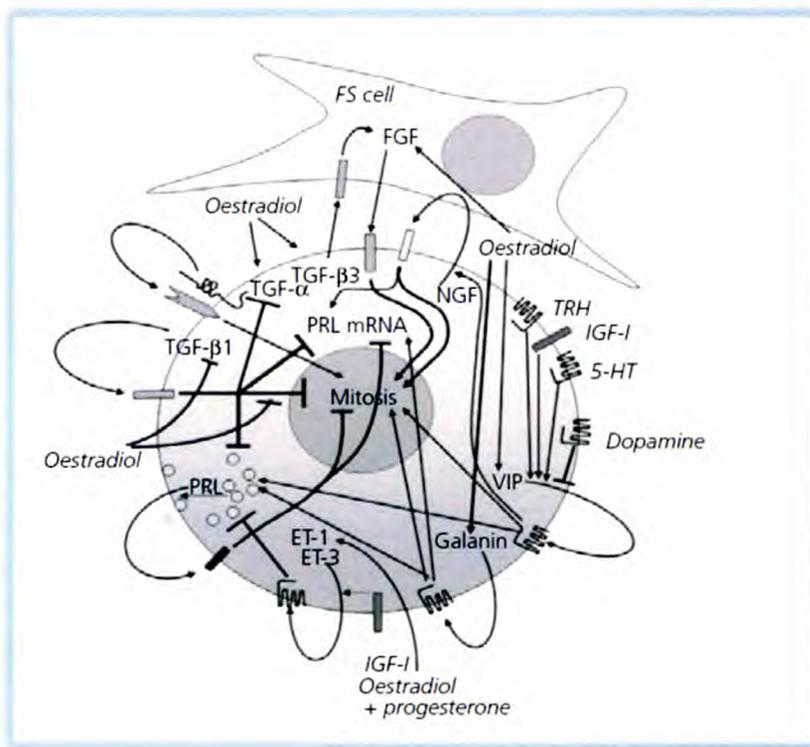


Figura 4: Representación esquemática de la regulación autocrina, paracrina y endocrina de la actividad funcional de las células lactotropas ejercida por neuropéptidos, neurohormonas, factores de crecimiento y hormonas esteroideas. Extraído de Deneff 2008 [6].

Como se describió para los diferentes factores hipotalámicos e intrahipofisarios que regulan la actividad metabólica de la población de células lactotropas, parte de sus acciones son moduladas por los estrógenos, principalmente por el estradiol. Las características de los receptores que median los efectos de esta hormona y los diferentes mecanismos de acción se describen a continuación.

Receptores estrogénicos

Las acciones del E2 son mediadas por la unión específica a los receptores estrogénicos (RE) citoplasmáticos/nucleares y de membrana. Estos receptores son miembros de la superfamilia de receptores nucleares, específicamente de la familia de los receptores esteroideos que actúan como factores de transcripción activados por ligando [90]. Existen dos subtipos clásicos del RE denominadas RE α y RE β (también denominadas ESR1 y ESR2 respectivamente). Los subtipos de los RE se originan a partir de genes separados localizados en cromosomas 6 y 14 [91] y comparten un alto grado

de homología aunque median diferentes funciones [92]. Ambos receptores son expresados en varios tipos celulares del organismo, incluidas las distintas poblaciones celulares de la adenohipófisis [93]. La expresión de los diferentes subtipos del RE y proteínas que interactúan con el receptor varía en los diferentes estadios fisiológicos y en condiciones patológicas, lo cual influye notablemente en los efectos generales de los estrógenos en las células blanco.

Los RE presentan cinco dominios: el dominio N-terminal de activación independiente de ligando (AF-1), un dominio de unión al ADN (DBD) que contiene la estructura de dedos de zinc, una región bisagra que contiene la señal de localización nuclear (H), el dominio de unión al ligando (LBD) y la región C-terminal de activación dependiente de ligando (AF-2) [94].

Los RE α (66-kDa) y los RE β (60-kDa) tienen más del 95 % de homología en el dominio DBD, alrededor del 59% en el dominio LBD, mientras que difieren en gran medida en sus dominios de activación, con menos del 15% de homología en la región AF-1. La mayor variación de la región N-terminal entre ambos receptores sugiere que ambos isotipos pueden interactuar con diferentes proteínas co-activadoras, originando así sus efectos transcripcionales específicos [95]. El tipo de respuesta inducida por la unión del ligando, en ambos RE, depende también del tipo celular y de la unión a los co-activadores o represores para traducir los efectos directos o indirectos del estradiol sobre la expresión de genes blancos. El 17β -estradiol se une con similar afinidad a ambos subtipos de RE, mientras que el 17α -estradiol, su enantiómero quiral, se une con una baja afinidad a los RE [96].

Además de los subtipos clásicos de ambos receptores, existen variantes de ARNm y de proteínas de los RE [94]. Estas variantes podrían ser el resultado del "splicing" alternativo por la delección de uno o más exones o de la inserción de una base dentro de un exón (Figura 5) [97].

Para los RE α se han descrito la variante del RE α 46, que carece del dominio AF-1, identificadas en células MCF-7 de cáncer de mama [98], osteoblastos [99], macrófagos humanos [100] y en células endoteliales [101]. Una variante de 36-39 kDa (RE α 36-39) que carecen tanto del dominio AF-1 y AF-2 ha sido descrita en líneas

celulares de cáncer de mama [102] y en células adenohipofisarias [103]. Se ha propuesto que esta variante del RE α media los efectos del estradiol iniciados en la membrana [103, 104]. Además, una proteína de 50-55 kDa ha sido reportada en extractos adenohipofisarios por varios autores [105, 106], la cual posiblemente tendría un rol fisiológico en el desarrollo de la glándula [107].

En la adenohipófisis también se han reportado dos variantes truncadas del RE α de 22kDa denominados productos de respuesta al estrógeno truncados 1 y 2 (TERP-1 y TERP-2) que carecen de la región N-terminal, de unión al ADN, de la región bisagra y de parte del dominio de unión al ligando. La expresión de la proteína TERP-1 en condiciones fisiológicas se limita a la glándula hipofisaria, localizada principalmente en lactotropas y gonadotropas [97]. Debido a que el receptor TERP-1 no puede unirse al ADN, no afecta la expresión génica por sí mismo, pero puede formar heterodímeros con cualquiera de los RE clásicos, modulando la acción del RE α en forma positiva o negativa, dependiendo del contexto celular y del promotor [108].

El RE β ha sido detectado en la mayoría de las células endocrinas adenohipofisarias, incluyendo un 30% de lactotropas [93], pero aún sus funciones no han sido completamente establecidas. Este subtipo estaría relacionado con la inhibición de la proliferación celular en mama, colon, pulmón y médula ósea [109-111]. Particularmente en tumores de mama el E2 a través del RE β inhibe la proliferación y previene la formación tumoral regulando negativamente genes que promueven la inducción del ciclo celular [112, 113]. En adenohipofisis se ha descrito que participaría en la regulación de la secreción de prolactina, ya que la sobre-expresión del RE β en células somatolactotrófica GH3B6 incrementó la expresión del gen de prolactina inducida por estrógenos [114], mientras que otros autores mostraron que la activación del RE β por un agonista específico fue incapaz de incrementar la concentración sérica de prolactina [115].

Además del RE β de longitud completa, se han identificado otras variantes de este receptor: el RE β 2/cx [116] y el RE β 5 [117]; resultantes de una combinación diferencial de corte y empalme de los diferentes dominios. Estas variantes del RE β han sido identificados en tumores de mama, siendo su función aún desconocida [118].

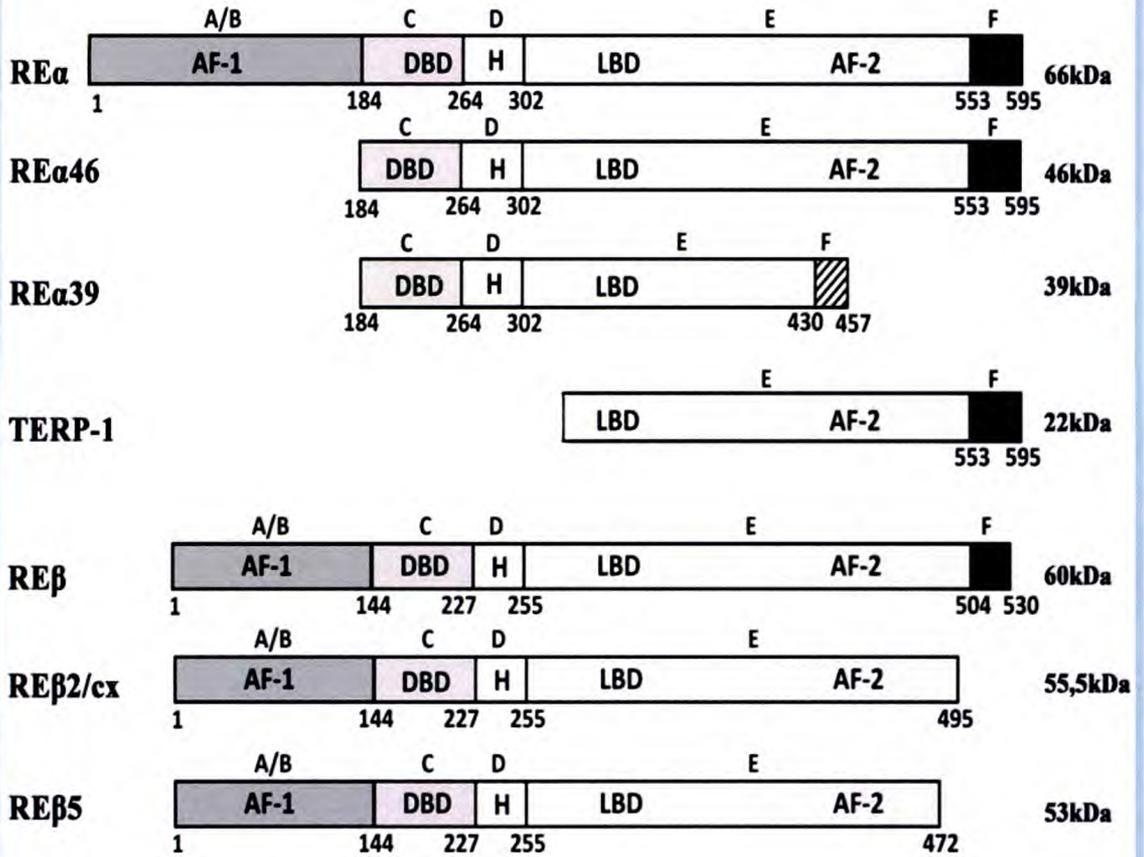


Figura 5: Estructura de los isotipos del RE clásicos y de las variantes de ambos RE. Los RE al igual que otros miembros de la familia de receptores nucleares, presentan los dominios funcionales: A / B: que abarca AF-1, C: que contiene el dominio de unión al ADN (DBD), D: llamado dominio bisagra contiene señales de localización nuclear, E: contiene el dominio de unión al ligando (LBD) y F: que abarca AF-2, dominio regulador de agonistas / antagonistas. RE α 46: una forma truncada de RE α carece AF-1. Otra variante ER α 39 que carece de los dominios AF-1 y AF-2. ER β 2/cx y ER β 5 son dos variantes del RE β que carecen del dominio F. Esquema extraído de Le Romancer 2011 [2] con modificaciones.

Mecanismos de acción de los estrógenos

Acciones genómicas de los estrógenos

El modelo clásico de la activación de los RE implica la unión al ligando produciendo un cambio conformacional ligando-específica del receptor, lo que permite su disociación del complejo de proteínas chaperonas inhibitorias [119]. Este cambio conformacional en el dominio de unión al ligando incluye la formación de un bolsillo hidrofóbico lo que facilita la interacción con proteínas co-reguladoras que pueden ya sea aumentar o suprimir la actividad transcripcional del RE [120]. Estas modificaciones producen la dimerización (homodimerización o heterodimerización) del RE y la unión a sitios blancos del ADN denominados elementos de respuesta específicos de estrógenos (ERE). Después de la unión al ADN, los dímeros interactúan con proteínas co-reguladoras tales como moduladores de la cromatina (histona-acetiltransferasas o histona-metiltransferasas) y con co-activadores o co-represores, moléculas de gran importancia para la modulación de la transcripción de genes blanco [121, 122] (Figura 6A).

Otro mecanismo descrito es el denominado como acciones genómicas "no clásicas", donde los dímeros del RE pueden regular la expresión de genes a través de un mecanismo independiente de la unión al ERE. Así los RE interactúan en forma indirecta con el ADN a través de factores de transcripción [123], entre los que se encuentran la proteína activada 1 (AP-1) [124], la proteína específica 1 (Sp-1) [125] y el factor nuclear kappa B [126] entre otros (Figura 6B).

Por otro lado, la función del RE también está regulada por su activación independiente de la unión del ligando, en la cual participan proteínas quinasas que son activadas a través de receptores de factores de crecimiento (Figura 6C). Ha sido descrito que el EGF por unión a su receptor produce la activación ERK 1/2, la cual fosforila al RE α , induciendo un aumento de la transactivación del RE en ausencia de E2 [70, 127].

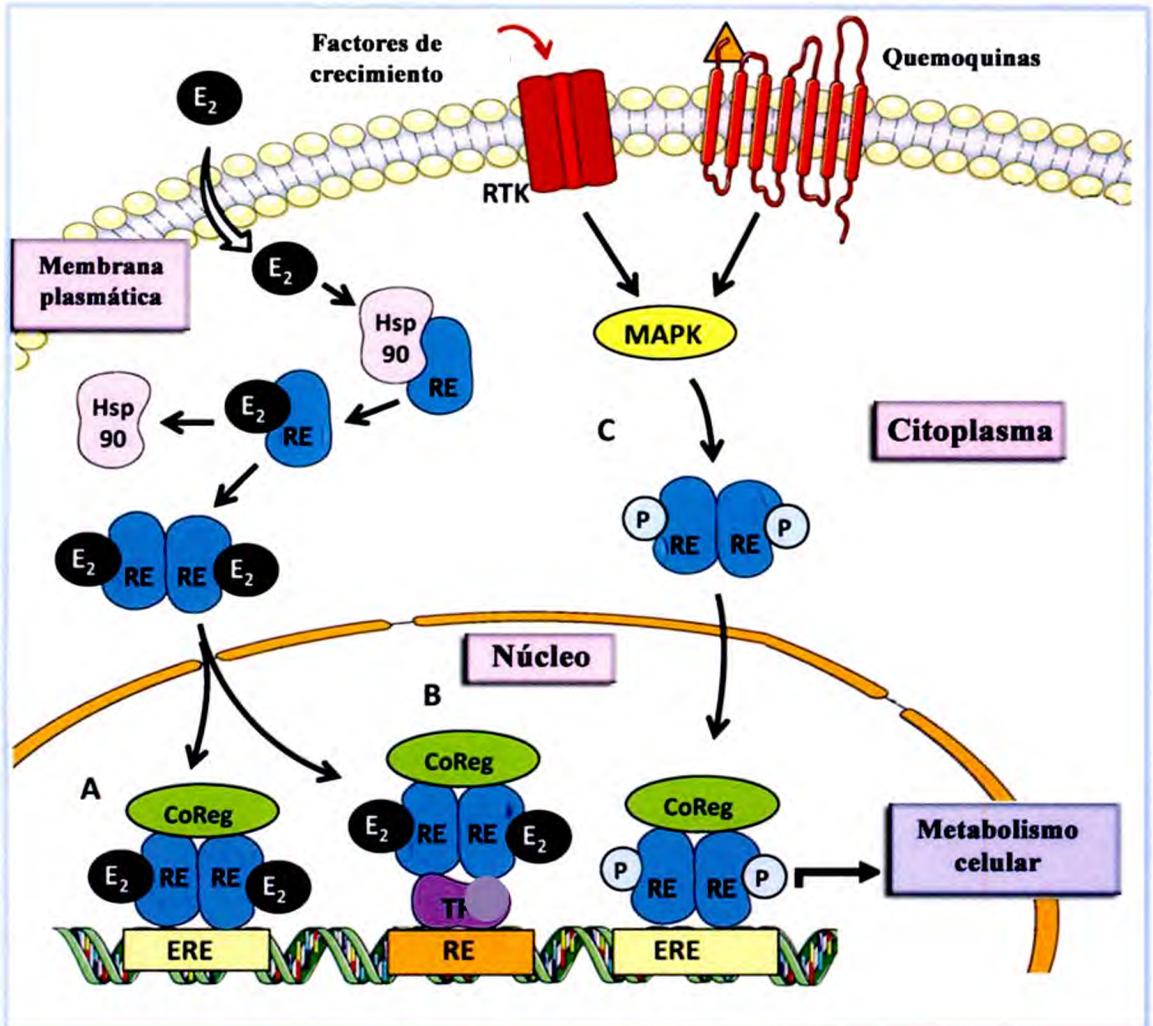


Figura 6: Mecanismo de acción del RE. Las vías son comunes para los RE alfa y beta. Se muestran tres vías de señalización del estrógeno a través del RE. **A: Ruta genómica clásica:** E₂ se une al RE, dimeriza por cambio de su conformación, transloca al núcleo e interacciona con los ERE reclutando co-activadores que activan la transcripción de los genes blanco. **B: Ruta genómica no clásica:** implica interacciones del RE con otros factores de transcripción como AP-1. **C: Vía E₂ independiente:** es activada por la fosforilación del RE inducida por factores de crecimiento. Todas estas vías convergen y pueden regular el metabolismo celular. Esquema extraído de *Le Romancer 2011* [2] con modificaciones.

Acciones rápidas o no-genómicas de los estrógenos

Además de los efectos transcripcionales bien establecidos del E2 que tienen lugar en horas o días, esta hormona también puede inducir efectos rápidos, que se producen en segundos o minutos. Estas acciones fueron descritas por primera vez por el grupo de Szego y colaboradores en 1967 [128] y hasta la actualidad numerosos estudios han contribuido al entendimiento de los efectos rápidos del E2 en diferentes tipos celulares.

La identidad y localización subcelular de los receptores que median los efectos rápidos del E2 sigue siendo un tema de controversia. Sin embargo, existe una clara evidencia de que estos efectos son mediados, al menos en parte, por un pequeño *pool* de RE que se localiza cerca o en la membrana plasmática [129]. Se ha reportado la presencia de RE clásicos (α y β), variantes truncadas ER α -46 o ER α -36 o del receptor de estrógeno acoplado a proteína G (GPER) en la membrana de diferentes tipos celulares normales y tumorales [130-132]. El mecanismo por el cual los RE clásicos translocan a la membrana celular aún no está bien establecido. Varios estudios han sugerido que los RE son modificados post-traduccionalmente por palmitoilación (S-acilación). El agregado de moléculas de lípidos facilitaría la interacción con caveolina-1 y la localización del RE en sitios caveola de la membrana celular [133].

Los mecanismos no genómicos también denominados como señales de esteroides iniciados en la membrana, se caracterizan por ser mediados por la activación de una variedad de vías de transducción de señales. Estos efectos del E2 han sido reproducidos utilizando complejos macromoleculares de E2 acoplados a albúmina, peroxidasa o poliaminas, que no pueden atravesar la membrana plasmática y ni acceder a los RE nucleares [134-136].

La activación de los RE asociados a la membrana rápidamente desencadena múltiples cascadas de transducción de señales a través de la interacción directa del RE con varias proteínas, incluyendo quinasas dependientes de factores de crecimiento y proteínas adaptadoras [137-139]. El complejo multimolecular que se genera de esta interacción fue denominado signalosoma, variando en el contenido de proteínas adaptadoras de acuerdo al tipo de celular (Figura 7).

El RE por acción de enzimas aciltransferasas es palmitoilado, lo que favorece su translocación hacia la membrana celular e interacción con caveolina-1. La unión del E2 al RE induce la dimerización del mismo, el reclutamiento y activación de diferentes proteínas quinasas. Se ha descrito la activación de diferentes vías de traducción de señales dependiendo del tipo celular y el efecto biológico final mediado por esta hormona esteroidea. La participación de la vía del GMPc, la activación de eNOS, la producción de AMP cíclico y óxido nítrico fue reportada en células endoteliales [140]. También la activación de los RE de membrana puede dar lugar a la disociación de las subunidades de proteínas G produciendo finalmente un incremento de calcio intracelular [141].

Por otro lado, los receptores de EGF y IGF-1 presentes en el signalosomas también pueden interactuar con el RE y cooperar en la activación de la vía MAPK. Esto incluye la unión con proteínas adaptadoras: Shc, Grb2, Sos y la activación de Ras-GTPasas, lo que conduce en última instancia a la activación de la cascada de MAPK quinasas: RAF, MEK y ERK. Esta última quinasa puede inducir la activación de factores de transcripción en el núcleo. Además de la activación de la vía MAPK, el E2 puede inducir la activación de la vía de PI3K-proteína quinasa B (PI3K-Akt) [142]. Se ha reportado que en presencia de estradiol, el RE α interactúa con la subunidad reguladora p85 α de PI3K, lo que desencadena la activación de la subunidad catalítica p110, aumentando la producción intracelular de fosfatidilinositoles y finalmente la activación de Akt [143].

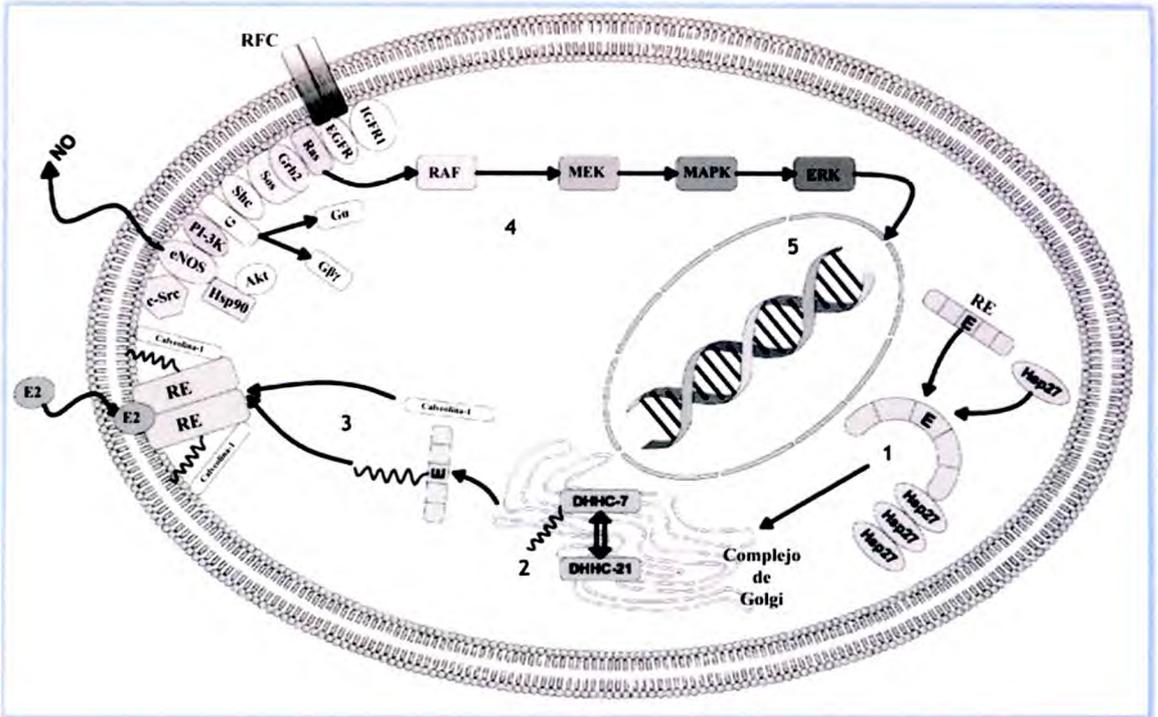


Figura 7: Representación esquemática del mecanismo de acción no genómico del RE: 1- RE estabilizado en el citoplasma por proteínas estabilizadoras (Hps); 2- Modificación post-traducional del RE por aciltransferasas; 3- Interacción del pequeño pool de RE con caveolina-1 en la membrana plasmática; 4- Reclutamiento e interacción con diferentes proteínas quinasas, activando cascadas de señalización que convergen en la activación de la transcripción de genes blanco (5). Esquema extraído de Soltysik, K. 2013 [4]

Los mecanismos de acción, genómicos y no genómicos, son complementarios presentando numerosas interacciones entre ellos. En algunos tipos celulares se ha descrito que los efectos inducidos por el estradiol mediados por ambos mecanismos, se pueden integrar, a través de mediadores en común entre vías de señalización activadas para finalmente regular la actividad transcripcional [144].

En nuestro laboratorio hemos desarrollado investigaciones dirigidas al estudio de los efectos del estradiol como factor modulador de la actividad funcional de células adenohipofisarias principalmente mediados por RE α citoplasmáticos/nucleares y de membrana [61, 145-148]. Mediante inmunocitoquímica ultraestructural identificamos por primera vez el RE α en la membrana plasmática de células lactotropas demostrando que su expresión es incrementada por E2, lo cual permite sugerir que esta hormona estimula la translocación del RE α endógeno a la membrana plasmática

[106, 146]. Además, se determinó que el *pool* de RE de membrana media el efecto inhibitorio del E2 sobre la proliferación de células lactotropas inducida por IGF1 e insulina, dato indicativo de interacciones entre efectos iniciados en la membrana y acciones genómicas como un mecanismo de control celular [146].

Considerando estos antecedentes, en este trabajo de tesis nos propusimos investigar los mecanismos de acción involucrados en el rol modulador del estradiol sobre la actividad secretoria y proliferativa de células lactotropas en interacción con otros factores que regulan directamente estos procesos como TRH y FGF2.

Regulación de la secreción de prolactina por E2y TRH

La **prolactina** es una hormona polipeptídica identificada por el grupo de Riddle, y su denominación responde a su capacidad de promover la producción de leche en respuesta al estímulo de succión [149]. Su función principal es la de estimular el crecimiento y desarrollo de la glándula mamaria, estimular la lactogénesis y mantener la secreción de leche durante la preñez. Sin embargo, se han reportado que esta hormona participa en múltiples funciones en el organismo [3]. Entre las funciones reproductivas se destaca su capacidad de promover la síntesis de progesterona en el cuerpo lúteo, participando además en el mantenimiento de la homeostasis del organismo, regulación del sistema inmune, equilibrio osmótico y en la angiogénesis.

El control de la secreción de PRL involucra una compleja interrelación entre neurohormonas, neurotransmisores, péptidos, factores de crecimiento y esteroides ováricos. Como se describió anteriormente la liberación de PRL es tónicamente inhibida por dopamina, el principal inhibidor de PRL y estimulada por numerosos factores siendo TRH el factor fisiológico más potente en inducir la liberación rápida de PRL [3]. Por otro lado, PRL ejerce un control negativo autocrino sobre su propia secreción [150-152] y a nivel hipotalámico, promueve un incremento en la expresión y actividad de la tirosina hidroxilasa, enzima involucrada en la síntesis de dopamina [153].

En la primera parte de este trabajo de tesis nos centramos en el estudio de la respuesta secretoria de la célula lactotropa inducida por la interacción entre E2 y TRH, la cual es desencadenada por señales iniciadas en la membrana celular.

En ratas hembra, la secreción de PRL presenta marcados cambios en los diferentes estados reproductivos, tales como el ciclo estral [154], preñez [155] y lactancia [156]. Durante el ciclo estral, los niveles de PRL fluctúan, alcanzando un pico en la tarde del proestro en forma coincidente con el máximo nivel de estradiol sérico (Figura 8) [5] y con el aumento de expresión de los RE α totales [157] y de RE de membrana en las células lactotropas [103].

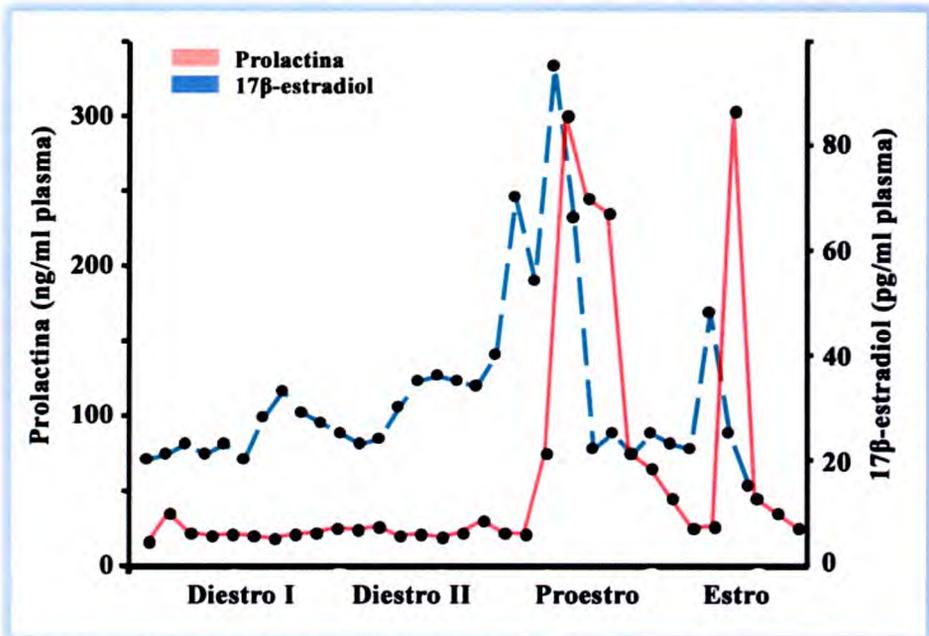


Figura 8: Niveles plasmáticos de prolactina y 17β-estradiol durante las diferentes fases del ciclo estral en ratas. Extraído Butcher y col 1973 con modificaciones [5].

Estos cambios están asociados con una significativa liberación de TRH a la circulación del sistema porta hipofisario [158, 159], la cual antecede en forma inmediata al aumento de la secreción de PRL en esta fase del ciclo estral [160]. El efecto regulatorio de los estrógenos sobre la liberación de PRL inducida por TRH es ejercido a nivel hipotalámico, induciendo la liberación de la neurohormona [161] y a nivel hipofisario estimulando la expresión del ARNm del receptor de TRH en

lactotropas, incrementando el número de los mismos en la membrana y aumentando la afinidad de unión a TRH durante la fase del proestro [162].

La capacidad de TRH de inducir la síntesis y la secreción de PRL implica la interacción con receptores acoplados a proteína G presentes en la membrana de las células lactotropas [163, 164]. La unión de TRH al receptor estimula la actividad de la fosfolipasa C [165], lo cual incrementa los niveles intracelulares de diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5 trifosfato (IP3) [166]. El DAG activa las PKC, específicamente la isoforma ϵ , induciendo la translocación de esta quinasa desde el citosol a la membrana plasmática [167, 168]. Por otro lado, el IP3 por unión a receptores específicos en el retículo endoplasmático liso estimula la liberación del Ca^{+2} [169]. El aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular produce la activación de proteínas dependientes de Ca^{+2} como calmodulina y PKC, proteínas involucradas en la liberación de PRL inducida por TRH. También se ha demostrado que TRH puede activar la vía de señalización MAPK induciendo la fosforilación de ERK en cultivos de la línea celular tumoral hipofisaria GH3 [170]. Por lo tanto múltiples quinasas involucradas en vías de transducción de señales incluyendo PKC, quinasas dependientes de Ca^{+2} y MAPK pueden ser activadas por TRH.

En estudios anteriores, demostramos la participación del RE de membrana en la acción regulatoria del E2 sobre la actividad secretoria y proliferativa de las células lactotropas utilizando cultivos primarios de células adenohipofisarias. El estradiol a través de los RE de membrana es capaz de revertir el efecto proliferativo inducido por insulina a través de la inhibición de la vía de señalización PKC ϵ /ERK1/2/Pit-1 y la estimulación de la vía guanilato ciclasa/GMPc/NO [146, 171]. Así también, se describió que la secreción de PRL inducida por E2 a través de los RE α de membrana es mediada por la activación de la vía PKC/ERK1/2 [146]. Otros autores, también han reportado la participación de los RE de membrana sobre la liberación de PRL promovidos por el aumento del Ca^{+2} intracelular en hipófisis normal [172] y en la línea celular tumoral somatolactrópica GH3/B6, siendo este efecto dependiente de los niveles de los RE α presentes en la membrana plasmática de las lactotropas [173].

Por otro lado, se ha descrito que IGF-1 induce un aumento en la secreción de PRL por activación de la vía PI3K/Akt a través de un mecanismo dependiente de ERK en las células hipofisarias [174]. Sin embargo, aún no ha sido reportada la participación de esta vía en los efectos del E2 sobre la liberación de PRL mediados por los RE α de membrana. Teniendo en cuenta estos antecedentes, fue de interés analizar la participación de otras vías de señalización alternativas diferentes a las clásicamente descritas en la regulación de la respuesta secretoria de las células lactotropas inducida por E2 y TRH mediadas por sus receptores de membrana. Un mejor conocimiento de los mecanismos moleculares involucrados podría contribuir al entendimiento de los cambios rápidos de los niveles de PRL que se producen en diferentes procesos fisiológicos.

Regulación de la población de células lactotropas mediada por E2 y FGF2

La adenohipófisis exhibe una importante plasticidad durante la vida adulta, los cambios son transitorios con una prevalencia de la mitosis sobre la apoptosis. Ambos eventos pueden tener un impacto considerable en la dinámica de las subpoblaciones celulares adenohipofisarias [175, 176]. La población de lactotropas exhibe cambios significativos en el número de células que la componen dependiendo del estado reproductivo y de los requerimientos hormonales durante el ciclo estral, preñez y lactancia. Las lactotropas proliferan activamente en respuesta a diferentes estímulos, hormonas hipotalámicas, neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas esteroideas, entre otros [6, 18, 177-180]; siendo muy complejos los mecanismos que regulan la actividad mitótica de este tipo celular.

Como se describió anteriormente la población de células lactotropas responde al estímulo estrogénico, siendo ampliamente conocido que el tratamiento con E2 *in vivo* e *in vitro*, induce la proliferación celular [147, 148, 181]. Con referencia a la acción mitogénica, se ha observado que este efecto es mediado por un mecanismo paracrino a través de factores de crecimiento secretados por células vecinas que expresan el receptor de estrógeno [6].

La interacción entre E2 y factores de crecimiento tales como EGF o IGF-1, es mediada por vías de señalización iniciadas en la membrana plasmática quienes culminan con la activación de eventos genómicos [182-184], estimulando así la proliferación celular en diferentes tejidos [53, 185, 186]. Este efecto podría ser mediado a través de interacciones directas entre el RE con los receptores del factor de crecimiento quinasa dependiente o con otras proteínas denominadas proteínas de andamiaje [187, 188]. Si bien ha sido clásicamente descrito que la co-incubación de E2 y factores de crecimiento induce un aumento en la proliferación de lactotropas, en nuestro laboratorio hemos demostrado que el E2 fue capaz de revertir el efecto proliferativo inducido por IGF-1 o insulina [61, 171]. Estas acciones aparentemente contradictorias pueden contribuir al equilibrio del tamaño de las poblaciones celulares de adenohipófisis a través de mecanismos intracelulares que aún no han sido completamente esclarecidos.

Con este objetivo, en la segunda parte de este trabajo nos propusimos esclarecer la contribución de los RE citoplasmáticos/nucleares y de membrana y la vía de señalización involucrada en los efectos moduladores del E2 en interacción con FGF2 sobre la proliferación de las lactotropas.

Como se describió previamente el FGF2 es un potente mitógeno, el más abundante en adenohipófisis siendo sintetizado por las células foliculo estrelladas [189]. En nuestro laboratorio se demostró la presencia de FGF2 en membrana plasmática de diferentes tipos celulares adenohipofisarios: somatotropas, gonadotropas y lactotropas por inmunocitoquímica a nivel de microscopía electrónica [190]. En la glándula normal, el FGF2 desempeña un importante rol en la diferenciación de las células lactotropas en ratas neonatas, mientras que en ratas adultas participa en la inducción de la proliferación de esta población celular como así también en la regulación de la secreción de PRL. Los efectos biológicos del FGF2 están mediados por unión a los receptores transmembrana de alta afinidad (RFGF), describiéndose diferentes subtipos [191]. En adenohipófisis ha sido informado que la unión del FGF2 a sus receptores puede activar múltiples intermediarios de las vías de

señalización, incluyendo las isoformas de PKC, las quinasas Src, Ras miembro de familias de proteínas G pequeñas, ERK 1/2 entre otras [192, 193].

Los efectos proliferativos inducidos por el FGF2 serían mediados en parte por la presencia del estradiol, quien estimularía la síntesis y secreción del factor de crecimiento en las células foliculo estrelladas. La interdigitación de las células foliculo estrelladas y lactotropas es indicativo de una comunicación intercelular dinámica [8]. En investigaciones previas realizadas en prolactinomas experimentales inducidos por estrógenos, hemos demostrado un aumento significativo de la expresión de FGF2 directamente relacionado con el grado de estímulo estrogénico [190]. Además, el E2 es capaz de inducir un aumento en la expresión de RFGF, lo cual le otorga a esta hormona un importante rol como modulador de las acciones inducidas por FGF2 [194]. En adenomas hipofisarios humanos, se ha descrito la desregulación de la relación del FGF/RFGF, mostrando además alteraciones en el subtipo de RFGF [195]. En modelos experimentales de tumores hipofisarios desarrollados en ratones knock-out del receptor de dopamina D2, se observó un aumento de los niveles de RFGF [196]. En este último modelo, el desarrollo de los prolactinomas fue más evidente en hembras que en machos, debido principalmente a los niveles estrogénicos plasmáticos presentes en cada sexo [197].

Si bien ha sido informado que E2 ejerce acciones mitogénicas o antimitogénicas mediadas por factores de crecimiento existen evidencias en que sugieren que esta hormona podría influir directamente sobre la proliferación de lactotropas, siendo escasamente descrito el mecanismo de acción involucrado [198]. Para contribuir a este conocimiento clave en la regulación del tamaño de la población de lactotropas inducido por E2 y FGF2, se evaluó la participación de los diferentes subtipos de RE, su localización intracelular y la vía de señalización activada.

Objetivos

Objetivo general

Estudiar los mecanismos involucrados en el rol modulador del estradiol sobre la actividad secretoria y proliferativa de las células lactotropas inducida por TRH o FGF2 respectivamente.

1) Análisis del efecto del estradiol sobre la actividad secretoria de células lactotropas inducida por TRH

Objetivos específicos:

- Determinar la participación de los RE de membrana en los efectos del estradiol sobre la secreción de PRL estimulada por TRH.
- Analizar la translocación intracelular de la isoforma RE α por acción del E2 en interacción con TRH.
- Determinar las vías de señalización involucradas analizando la participación de las vías PI3K/Akt y MAPK-ERK1/2.

2) Estudio del efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas

Objetivos específicos

- Determinar la actividad proliferativa de las células lactotropas inducida por estradiol en interacción con FGF2.
- Establecer el rol de las isoformas α y β del RE y la participación del RE de membrana en la respuesta proliferativa de lactotropas inducida por E2/FGF2.
- Evaluar la asociación del RFGF y RE α en células adenohipofisarias promovida por E2/FGF2
- Analizar las vías de señalización activadas determinando la participación de Akt y MEK-ERK1/2.

Materialles

y

Métodos

Animales

En el presente trabajo se utilizaron ratas Wistar hembras vírgenes, de tres meses de edad, en diferentes períodos del ciclo estral. Los animales fueron exocriados en bioterio y mantenidos en condiciones controladas de temperatura ($21 \pm 3^{\circ}\text{C}$) y fotoperiodo (14h luz/10h oscuridad), con libre acceso a agua corriente y a alimento balanceado para roedores comercial (Cargill, División Nutrición Animal, SACI, Córdoba) suplementado con semillas de girasol, siguiendo las recomendaciones publicadas en la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, NIH (1996)*.

Para los diferentes protocolos experimentales se realizaron cultivos primarios adenohipofisarios utilizando un número de 15 a 20 ratas para homogeneizar la muestra. Todos los protocolos realizados en este trabajo de tesis fueron aprobados por el Comité de Ética de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Córdoba.

Cultivos primarios de células adenohipofisarias

Las ratas fueron decapitadas evitando cualquier estrés originado por estímulos externos de acuerdo a Las Guías Internacionales de Entrenamiento y Manejo de Animales de Laboratorio, publicadas por la Federación Universitaria para el cuidado de animales y el Comité Institucional Local de Cuidado Animal.

Las hipófisis fueron removidas a los 10 segundos siguientes a la decapitación y colocadas en medio de cultivo esencial mínimo suplementado con aditivos (SMEN, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA). Posteriormente, las glándulas fueron cortadas en pequeños fragmentos e incubadas con 0,4% de tripsina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en SMEN durante 20 min. La actividad enzimática de la tripsina fue inhibida utilizando medio con una combinación de suero fetal bovino (8%) y suero de caballo (3%) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA). A continuación, la primera dispersión celular obtenida fue lavada 3 veces con SMEM, centrifugada después de cada lavado por 3min a 1000rpm y luego nuevamente dispersada en forma mecánica con pipetas Pasteur de calibre decreciente para obtener una suspensión celular homogénea. En cada cultivo primario se obtuvo un rendimiento celular de $\approx 1,5\text{-}2 \times 10^6$ células por glándula, siendo

la viabilidad celular analizada por exclusión de azul de tripano superior al 90% en todos los cultivos. Finalmente, la suspensión celular final se ajustó a 1×10^6 células/ml de medio SMEN.

Para el análisis de la secreción de PRL, citometría de flujo, western blot, inmunoprecipitación e inmunocitoquímica ultraestructural, las células fueron sembradas en placas de cultivo estériles de seis pocillos (Corning, New York, USA) con una densidad de 1×10^6 células/pocillo. Mientras que para la técnica de inmunocitoquímica, a nivel fotónico y fluorescencia, las células fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio (13 mm) a una densidad de $1,5 \times 10^5$ células por cada pocillo en placas de cultivo estériles (Corning, New York, USA). Los cultivos celulares fueron mantenidos durante cuatro días para favorecer la adherencia celular, en medio Dulbecco completo (DMEN, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) suplementado con 4% de suero fetal bovino y 8% de suero de caballo (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA) en un incubador termostatzado a 37°C , con una atmósfera saturada de vapor de agua, compuesta por un 95% de O_2 y suplementado con 5% de CO_2 .

Tabla 1. Composición de los medios de cultivos utilizados para los cultivos primarios de células adenohipofisarias.

SMEN completo		DMEN completo	
	pH= 7,4		pH= 7,4
BSA	1 mg/ml	BSA	1 mg/ml
Hepes	13 mM	Hepes	34 mM
Streptomicina	0,03 mM	Streptomicina	0,07 mM
Penicilina G	0,09 mM	Penicilina G	0,18 mM
L-Glutamina	2 mM	L-Glutamina	0,68 mM
SMEN base	100 ml	Anfotericina	0,5 %
		Suero de Caballo	8 %
		Suero fetal bovino	3 %
		DMEN base	89 %

Diseños experimentales

Para cumplimentar los objetivos propuestos en este trabajo, después de 4 días de cultivo, el medio DMEN completo con suero fue remplazado por medio de cultivo DMEM completo sin rojo fenol y sin suero; suplementado con 100 µg/l de hidrocortisona, 400 ng/l de 3,3'-triyodotironina, 10 mg/l de transferrina y con 5 µg/l de selenito de sodio durante 24h. Posteriormente, se realizaron los siguientes diseños experimentales:

1) Análisis del efecto del estradiol sobre la actividad secretoria de células lactotropas inducida por TRH

Para la primera parte de este trabajo, las células adenohipofisarias en el sexto día de cultivo fueron estimuladas con: vehiculo (0,1% de BSA), E2 (10 nM; Sigma), E2-BSA (10 nM, complejo de E2 unido covalentemente a BSA) o TRH (10nM; Sigma), solos o en combinación: E2/TRH o E2-BSA/TRH durante 30 min.

El E2 se disolvió en etanol de modo tal que la concentración final de etanol en el medio fue de 0.01%. La solución del complejo de E2-BSA se preparó por disolución de 1 mg del liofilizado comercial (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en 1 ml de buffer Tris-HCl (50mM, pH 8,5). Una alícuota de la solución fue filtrada en una unidad de filtración con poro de peso molecular de 3000 Da (Millipore) y centrifugada a 13000 g durante 30 min. La solución retenida del filtrado se lavó tres veces con 400µl de buffer Tris-HCl y ajustada a la concentración de trabajo.

Células no estimuladas controles (C), fueron incubadas con los vehículos correspondientes para cada estímulo: 0,01% de Etanol o 0,1% de BSA.



Figura 9: Representación esquemática del protocolo experimental aplicado: desarrollo del cultivo primario de células adenohipofisarias y tratamientos realizados con los diferentes factores por 30 min.

Para confirmar la participación de los RE se utilizó un inhibidor competitivo de unión al E2 (ICI-182780, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en diferentes concentraciones: 100, 500 o 1.000 nM y para el análisis de las vías activadas por los diferentes estímulos se utilizaron los inhibidores específicos de PI3K: LY294002 (10 μ M, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) y wortmanina (100nM, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA), o el inhibidor de MEK: PD 98059 (100 μ M, Calbiochem). Todos los inhibidores fueron aplicados 30 min antes del tratamiento con los diferentes factores los cuales fueron incubados por otros 30min adicionales.

Finalizado el tiempo de estímulo el medio de cultivo fue recogido y almacenado a -20°C para la determinación de los niveles de PRL por radioinmunoensayo (RIA) y las células adenohipofisarias fueron procesadas para técnicas inmunocitoquímicas, Western Blot y citometría de flujo.

2) Estudio del efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas

En la segunda parte de este trabajo, las células adenohipofisarias en el sexto día de cultivo fueron estimuladas con vehículo (0,1% de BSA), E2 (10 nM), E2-BSA (10 nM) y FGF2 (10ng/ml, Sigma) solos o en combinación: E2/FGF2 o E2-BSA/FGF2 por 30

minutos o 4 horas. Después de los tratamientos, el medio de cultivo fue remplazado por medio fresco conteniendo 100 nM de bromodeoxiuridina (BrdU) y mantenido durante 24 h adicionales para el posterior análisis de la proliferación celular.

Para determinar la participación de los subtipos α y β del RE, se utilizaron los agonistas específicos del RE α : 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-tryl) trisphenol (PPT- 10 nM, Tocris Cookson) y del RE β : 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propio-nitrile (DPN- 10 nM, Tocris Cookson) solos o en combinación con FGF2.



Figura 10: Representación esquemática del protocolo experimental aplicado: desarrollo del cultivo primario de células adenohipofisarias y tratamientos realizados con los diferentes factores por 30 min o 4h.

Además, se utilizó el antagonista de los RE ICI182780 (100 nM) y el inhibidor específico de MEK, PD 98059 (100 μ M) que fueron colocados 30 min antes de los estímulos con los factores específicos.

Al finalizar cada condición experimental, las células adenohipofisarias en cultivo fueron procesadas para las técnicas de western blot y de inmunocitoquímica a nivel de microscopía de luz y electrónica.

Determinación de la liberación de PRL por radioinmunoensayo

La concentración de PRL en el medio de cultivo fue determinada mediante RIA, con anticuerpos suministrados por el Dr. AF Parlow del National Hormone and Pituitary Program, del National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK).

La PRL fue marcada con I^{125} aplicando la técnica de cloramina T y purificada a través de una columna con Sephadex G-75 y poliacrilamida agarosa (ACA 54, LKB, Bromma, Suecia). La sensibilidad del ensayo fue de 1 ng/ml de medio y el coeficiente de variación inter e intraensayo fue de 10%. Estas determinaciones fueron realizadas en el Laboratorio de Reproducción y Lactancia, IMBECU-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, Mendoza.

Evaluación de la proliferación celular por incorporación de BrdU

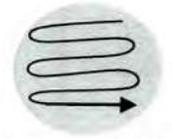
Las células lactotropas en fase S del ciclo celular (síntesis de ADN) fueron identificadas por una doble inmunocitoquímica de PRL y bromodeoxiuridina (BrdU), siguiendo el protocolo establecido por Oomizu y col [199] con modificaciones [61]. Después de los tratamientos por 30 min o 4 h, el medio de cultivo fue reemplazado añadiendo 100 nM de BrdU durante 24 h adicionales. Las células en cultivo adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas con 4% de paraformaldehído en buffer fosfato salino (PBS) durante 30 min a temperatura ambiente (TA), lavadas con PBS y permeabilizadas con 0,5% de Triton X-100 en PBS por 10 min. Para bloquear la inmunoreactividad no específica, las células fueron incubadas con PBS-BSA al 5% por 30min a TA y luego toda la noche con anticuerpo monoclonal contra BrdU (1/100; Amersham, Buckinghamshire, UK) a 4 °C en una cámara húmeda. Después de lavar con PBS se incubaron con un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de ratón (1/100; GE Healthcare; Buenos Aires, Argentina) por 1h a 37°C y finalmente con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC; Vector; Burlingame, USA) por 30min a TA. La inmunorreactividad de la BrdU fue visualizada utilizando como cromógeno el tetrahidro-cloruro de 3, 3-diaminobencidina (DAB) y se consideró una reacción positiva las células con núcleos teñidos de marrón.

Para la detección de las células lactotropas, a continuación se realizó una inmunomarcación para PRL en el mismo cubreobjetos. Las células fueron incubadas con un anticuerpo de conejo anti-PRL de rata (1/3000, NIH-Hormone Program, Bethesda, USA) en una cámara húmeda durante 1h a 37°C, lavadas con PBS, incubadas con un anticuerpo biotinilado dirigido contra IgG de conejo (1/150; GE Healthcare) por

1h a 37°C y finalmente con el complejo avidina-biotina peroxidasa (ABC; Vector; Burlingame, USA) por 30min a TA. La inmunomarcación de PRL fue visualizada utilizando como cromógeno cloronaftol, tomando como positivo las células cuyo citoplasma (región perinuclear) estuvo teñido de un color azul violáceo. Al término de ambas inmunomarcaciones, los cubreobjetos fueron lavados con agua destilada y montados con glicerol.

Los controles negativos de la inmunomarcación fueron realizados en paralelo siguiendo los mismos pasos descritos, pero omitiendo los anticuerpos primarios anti BrdU o PRL.

El recuento de células se realizó a nivel de microscopía fotónica, siguiendo un patrón de diseño estándar, como se muestra en la figura. Un total de 1000 células inmunorreactivas para PRL fueron examinadas en cada cubreobjeto para establecer la proporción de células doble positivas para BrdU y PRL en el total de células PRL positivas. Se analizaron 3 cubreobjetos para cada grupo y los experimentos fueron repetidos en tres cultivos celulares independientes.



Cubreobjeto (13mm)

Identificación del receptor de FGF en células lactotropas por inmunocitoquímica ultraestructural

Para observar la presencia del receptor de FGF (RFGF) en la membrana plasmática de células lactotropas, se realizó una inmunomarcación del receptor en células intactas aplicando la técnica de pre-inclusión [200]. Este procedimiento fue diseñado para la detección de antígenos en la superficie celular antes de la fijación de la muestra, permitiendo así una óptima preservación del antígeno y en consecuencia, excelente inmunomarcación del mismo.

Después de 96 horas de cultivo, las células adenohipofisarias fueron lavadas con solución de Hank, incubadas con 1% de PBS-BSA durante 15 min a 37°C para bloquear los antígenos no específicos y luego con el anticuerpo anti-RFGF (1/50, Flg C-15-121, Santa Cruz Biotechnology, CA-EEUU) por 1h a 37°C. Posteriormente, para detectar los sitios inmunoreactivos, se utilizó el anticuerpo secundario de conejo

conjugado con partículas de oro coloidal de 15 nm (1/20, Electron Microscopy, Hatfield, PA) por 1h a TA.

En paralelo, para validar la especificidad de la inmunomarcación, se realizó el mismo procedimiento pero sustituyendo el anticuerpo primario con 1% de PBS-BSA o pre-incubando con un péptido de bloqueo comercial (sc-121 P, Santa Cruz Biotechnology, CA-EEUU).

Finalizada la inmunomarcación, las células fueron despegadas de la base de las placas con un *scraper*, centrifugadas a 1000 rpm y procesadas siguiendo el protocolo que se detalla a continuación:

- 1- Fijación con solución de Karnovsky compuesta por: glutaraldehído 2%, formaldehído 2% diluidos en bafur cacodilato 0,1M por 2h a TA.
- 2- Post-fijación: con 1% de OsO₄ en buffer cacodilato por 1h y teñido en bloque con 1% de acetato de uranilo en buffer acetato 0,1 M pH 5,2 durante 20 min a TA.
- 3- Deshidratación: con serie de acetonas en concentraciones crecientes,

Acetona 50%	15 min
Acetona 70%	15 min
Acetona 90%	15 min
Acetona 100%	15 min

- 4- Inclusión: en resina epóxica compuestas por:

Araldita 506 (48,5%)
Anhídrido dodecenilsuccínico (DDSA) (48,5%)
Diobutilftalato (DBP) (0,5%)
Acelerador dimetilaminobenceno (BDMA) (2,5%)

Se realizó en primera instancia la infiltración del material con una mezcla de partes iguales del medio de inclusión y acetona 100% durante 3 h.

- 5- Pre-inclusión en Araldita (mezcla epoxi completa) a TA durante 6-8 h.

- 6- Inclusión final en Araldita y posterior polimerización de la resina en estufa a 60°C por 48h.

Una vez incluido el material, se obtuvieron secciones semifinas (60nm) en un ultramicrotomo Jeol JUM-7 provisto de cuchilla de diamante y los cortes ultrafinos fueron recogidos en grillas de níquel de 250 mesh.

Para identificar células lactotropas que expresan el RFGF, las grillas fueron incubadas con H_2O_2 al 10% por 7min, bloqueadas con 1% de suero normal de cabra por 45 min y luego expuestas al anticuerpo de conejo anti-PRL de rata (1/5000) durante toda la noche a 4°C. Luego de 3 lavados con H_2O bidestilada de 5 min cada uno, la unión específica del anticuerpo primario se reveló utilizando un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a oro coloidal de 5nm (1/20 Electron Microcopy Sciences, USA) durante 1h a 37°C.

Para la observación al microscopio electrónico, las secciones de Araldita fueron contrastadas con una solución saturada de uranilo en alcohol al 50% por 1min y posteriormente analizadas con el microscopio electrónico de transmisión Zeiss Leo 906-E equipado con una cámara digital Megaview III (Oberkochen, Alemania).

Tabla 2. Composición de los buffer utilizados en la técnica de inmunocitoquímica ultraestructural aplicando la técnica de pre-inclusión.

Solución de Hank

HEPES	10 mM
NaCl	140 mM
KCl	27 mM
Glucosa	0.1 %
Na_2HPO_4	0,34 mM
$CaCl_2$	0,5 mM
$MgCl_2$	0,5 mM
pH ajustado 7,4	

Solución de Karnovsky

Glutaraldehído	2 %
Formaldehído	2 %
Buffer cacodilato	0,1 M
pH ajustado 7,4	

Determinación del RE α de membrana en la población de células lactotropas mediante citometría de flujo

Las células en cultivo fueron despegadas de las placas utilizando una solución de tripsina al 0,4%, lavadas 3 veces y centrifugadas a 1000 rpm por 5 min con buffer conteniendo PBS, 1% azida sódica y 2% suero fetal bovino para bloquear uniones inespecíficas. Las células dispersadas fueron luego incubadas con un anticuerpo de conejo anti-RE α de rata (1/50; MC-20 con inmunoreactividad para el extremo carboxilo terminal, Santa Cruz Biotechnology, CA-EEUU) o con un control de isotipo apropiado durante 30 min a 4 °C, lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario Alexa Fluor

647 (1/1, 000, Invitrogen, Eugene, Oregon) por 30 min adicionales a 4°C. A continuación, las células fueron fijadas (CITOFIX, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) por 20 min a 4°C.

Para la detección de las células lactotropas, la dispersión celular fue permeabilizada con Perm/Wash (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA) y luego incubada con el anticuerpo anti-PRL (1/20.000) por 30 min a 4 °C, lavadas e incubadas luego con el anticuerpo secundario FITC (1/300, Santa Cruz Biotechnology) por 30 min a 4 °C. Finalmente, las células fueron lavadas, re-suspendidas en PBS filtrado y analizadas (1×10^5 eventos / tratamiento experimental) en un citómetro de flujo FACS Ariall (Ortho Diagnostic System, Raritan, NJ, perteneciente a la Facultad de Ciencias Químicas, UNC).

Como control de isotipo, las células se incubaron con suero normal de conejo en lugar de los anticuerpos anti-PRL o anti-RE α , evaluando así las uniones inespecíficas de los anticuerpos secundarios utilizados.

El análisis de los datos fue realizado utilizando el software FlowJo (Tree Star, Ashland Inc., OR) y el porcentaje del RE α de membrana (RE α m) en células lactotropas positivas se calculó por la ecuación: $[(RE\alpha m + PRL+) / \text{total de células PRL} +] \times 100$. Las variaciones de los niveles de intensidad del RE α m se determinaron utilizando la intensidad de fluorescencia de la media geométrica (Gmean).

Preparación de los lisados celulares para el análisis de proteínas mediante Western Blot

Para el análisis de la expresión de diferentes proteínas, una vez finalizados los protocolos experimentales, las células del cultivo fueron lavadas con PBS y lisadas en hielo mediante la adición de 120 μ l/pocillo con buffer de lisis a 4 °C. Después de 30 minutos, los lisados celulares fueron centrifugados a 13000 rpm durante 20 min a 4 °C para sedimentar el material insoluble y los sobrenadantes fueron almacenados en alícuotas a -20 °C. La concentración total de proteína de los lisados celulares se determinó mediante el método de mini-Bradford (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, EEUU).

Los extractos totales obtenidos de los diferentes protocolos experimentales fueron preparados para ser sembrados en gel de poliacrilamida, mezclando 100µl de homogenato con 20µl de buffer de muestra y calentados durante 5min a 95°C. Luego, 50µg de proteína de los homogenatos fueron sembrados en cada calle y separados por electroforesis en gel de poliacrilamida al 12% (Sigma Chemical Co). En el mismo gel se corrió en paralelo un marcador de peso molecular Rainbow con una gama completa de proteínas de peso molecular conocido (Amersham-Life Science, Bucks, Inglaterra) para estimar el peso molecular de las diferentes proteínas analizadas. Las corridas electroforéticas fueron realizadas a voltaje constante de 200 V utilizando una fuente de poder Bio-Rad Power Pack 200 por 35min. Posteriormente, la transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa Hybond-C (Amersham Pharmacia, Buckinghamshire, UK) fue efectuada a 300mA por 60min.

Tabla 3. Composición de los buffers utilizados en la técnica de Western Blot.

Buffer lisis	pH= 7,4
Tris- HCl	25 mM
NaCl	150 mM
Nonidet- Igep NP40	1,25%
EDTA	1 mM
Inhibidores de proteasas:	
Fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)	0,1mM
Leupeptina	10 mg/ml
Aprotinina	10 mg/ml
Inhibidores de fosfatasas:	
NaF	10mM
Pirofosfato de Sodio	20mM

Buffer Muestra	pH= 6,8
Tris-HCl	0,35M
glicerol	30%
SDS	10 %
DTT	9,3%
Azul de bromofenol	0,12 mg/ml

Terminada la transferencia, los siguientes pasos fueron realizados sobre las membranas de nitrocelulosa con las proteínas transferidas:

1- Bloqueo de sitios de unión no específica: con PBS-Tween 20 (0,1%)-leche 5%; 1h en agitación a temperatura ambiente.

2- Incubación con anticuerpo primario diluido en PBS-Tween-20 0,1%-leche 5% a 37 °C, en agitación. Se emplearon las siguientes diluciones:

-*anti Akt total*: 1/300 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotech, USA)

-*anti Akt 1 fosforilada*: 1/300 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotechnology, USA)

-*anti ERK1/2*: 1/700 (policlonal de conejo anti-rata, Santa Cruz, Biotech, USA)

-*anti ERK1/2 fosforilada (P-ERK1/2)*: 1/700 (monoclonal de ratón anti-rata, Sigma, Chemical Co. St. Louis, MO, USA)

3- Lavado con PBS-Tween-20 por 30 min, en agitación a TA.

4- Incubación con anticuerpo secundario diluido en PBS-Tween20 (0.1 %)-leche 5% por 1 h en agitación a TA:

- *anti-conejo* unido a peroxidasa 1/5000 (Jackson Immunoresearch Labs Inc, West Grove, PA, USA)

- *anti-ratón* unido a peroxidasa 1/2500 (Jackson Immunoresearch Labs Inc, West Grove, PA, USA)

5- Lavado con PBS-Tween-20 por 30 min, en agitación.

6- Incubación con agente de detección quimioluminiscente (Kit ECL Amersham).

7-Exposición de la membrana a una placa fotográfica para la detección de las señales quimioluminiscentes procedentes de los blots de las proteínas (Hyperfilm ECL Amersham).

8- Revelado y fijación de la placa fotográfica (Hyperfilm, Amersham-Pharmacia-Biotech, Bucks, Reino Unido).

Las densidades de las bandas correspondientes a los resultados obtenidos mediante Western Blot fueron analizados con el programa Scion Image (V. 4.0.2 Beta, Scion Image Corp., Frederick, MD, EE.UU.). La cuantificación de la densitometría fue realizada en al menos tres placas por grupo para el posterior análisis estadístico de los valores.

Análisis de interacción del RE α y RFGF por co-inmunoprecipitación

Los extractos totales de las células de cultivo obtenidos de controles y tratados (750 μ g de proteína/tratamiento) fueron incubados e inmunoprecipitados utilizando un anticuerpo anti-RE α (10 μ g/mL) durante 1h a 4°C en rotor. Luego los inmunocomplejos fueron adsorbidos y precipitados usando el complejo de proteína A-partículas de Sepharose (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, EE.UU.) toda la noche a 4 °C en rotor. Posteriormente, las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm por 1 min, el sobrenadante descartado, incubando el precipitado con 1 ml de buffer I a 4°C por 20 min en rotor. Este proceso fue realizado 2 veces con el buffer I, II y III. Luego los precipitados fueron resuspendidos en 15 μ l de buffer de muestra, desnaturalizados a 95 °C por 5min y centrifugados a 13000 rpm por 1 min. Finalmente, los sobrenadantes conteniendo las proteínas inmunoprecipitadas fueron sembrados en geles de poliacrilamida al 12%, desarrollados en corrida electroforética y transferidos a membranas de nitrocelulosa. Las membranas fueron bloqueadas e incubadas con los anticuerpos primarios anti-RFGF (1/200-1 μ g/mL) o anti-RE α (1/200-1 μ g/mL) a 4 °C durante toda la noche y luego reveladas como fue descrito en la sección anterior.

En forma paralela se realizaron controles positivos y negativos de la interacción observada en la co-inmunoprecipitación. Como control positivo se analizó la interacción ya descrita entre RE α y IGF-1R en lisados de células adenohipofisarias [201] y como control negativo se utilizó un lisado de la línea celular Hela, que no expresa RE.

Tabla 4. Composición de los buffers utilizados en la técnica de co-inmuno precipitación

Buffer I		Buffer II	
Tris-HCl	120 mM	Tris-HCl	120 mM
NaCl	140 mM	NaCl	60 mM
NP-40	0,5 %	NP-40	0,25 %
Inhibidores de proteasas:		Inhibidores de proteasas:	
Leupeptina	10 mg/ml	Leupeptina	10 mg/ml
Aprotinina	10 mg/ml	Aprotinina	10 mg/ml
Inhibidores de fosfatasas:		Inhibidores de fosfatasas:	
NaF	10mM	NaF	10mM
Pirofosfato de Sodio	20mM	Pirofosfato de Sodio	20mM
pH ajustado 7,4		pH ajustado 7,4	

Buffer III

Tris-HCl	1,2 mM
NP-40	0,01 %
Inhibidores de proteasas:	
Leupeptina	10 mg/ml
Aprotinina	10 mg/ml
Inhibidores de fosfatasas:	
NaF	10mM
Pirofosfato de Sodio	20mM
pH ajustado 7,4	

Determinación de la interacción del RE α y RFGF mediante inmunocitoquímica ultraestructural

Esta técnica fue realizada para evaluar la localización subcelular a nivel de microscopía electrónica del RE α y el RFGF en respuesta a los diferentes estímulos; para lo cual las células de cultivo adenohipofisarios fueron incluidas en una resina hidrofílica (*LR-White*, London Resin Corporation, UK). Los pellets celulares fueron procesados siguiendo los pasos que se detallan a continuación:

- 1- Fijados con solución de Karnovsky para inmunocitoquímica compuesta por glutaraldehído 0,75%, formaldehído 2% diluidos en cacodilato 0,1 M con sucrosa 7% durante 1h.

2- Deshidratación: con serie creciente de alcohol etílico,

Etanol 50%	15 min
Etanol 70%	15 min
Etanol 90%	15 min
Etanol 100%	15 min

3- Pre- inclusión en una mezcla 1/3 de resina acrílica LR White (The London Resin Co. Berkshire, Reino Unido) con etanol 100%, durante 4 h. Seguido por una mezcla de partes iguales de resina y alcohol por 2 h.

4- Inclusión: la inclusión en la resina acrílica LR White y en estufa (50 °C) durante 24 h para que la resina polimerice.

Secciones ultrafinas del material incluido fueron obtenidas en un ultramicrotomo y montadas en grillas de níquel.

Los cortes se inmunomarcaron sobre gotas de los reactivos depositados sobre parafilm. Se realizó una doble inmunomarcación en las grillas que contienen las secciones ultrafinas, realizando los siguientes pasos:

- Bloqueo de uniones inespecíficas con PBS/BSA al 1 % por 30 min a TA.
- Incubación con anticuerpo primario de conejo anti-RFGF (1/200) toda la noche a 4 °C.
- Lavado 3 veces con PBS por 5 min cada uno.
- Revelado de la unión específica del anticuerpo primario con un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a oro coloidal de 15nm (1/30, Electron Microcopy Sciences, USA) durante 1h a 37°C.

Posteriormente, en las mismas secciones ultrafinas obtenidas en el paso anterior se realizaron todos los pasos descritos utilizando el anticuerpo anti- RE α (1/50) y el complejo inmune se reveló utilizando un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado a oro coloidal de 5nm (1/20 Sigma, USA).

Para validar la especificidad de la inmunomarcación, se realizaron controles negativos reemplazando el anticuerpo primario por albúmina bovina al 1 % en PBS, seguido del correspondiente anticuerpo secundario.

Finalmente, se realizó el contraste de los cortes utilizando una solución saturada de acetato de uranilo acuosa por 1min, seguido de lavados con agua bidestilada. Las grillas fueron observadas y las imágenes fueron obtenidas en un microscopio electrónico Zeiss LEO 906E.

Tabla 5. Composición de los buffers utilizados en la técnica de inmunocitoquímica ultraestructural post-inclusión.

Solución de Karnovsky	pH=7,4
Glutaraldehído	0,75 % (v/v)
Formaldehído	2 % (v/v)
Buffer cacodilato	0,1 M
Sucrosa	7 %
Solución de Bloqueo:	pH=7,4
Suero Normal de cabra	5 %
Albúmina Sérica Bovina (BSA)	5%
Gelatina de pescado de agua fría	0,1 mM
PBS	100 ml
Conserva a -20°C.	

Localización subcelular de proteínas por microscopía laser confocal

Para el análisis de la localización subcelular de diferentes proteínas, células controles y tratadas adheridas a los cubreobjetos fueron fijadas en 4% de paraformaldehído y permeabilizados con 0,25% de Tritón X-100 en PBS. Luego, las uniones no específicas fueron bloqueadas con 5% de PBS-BSA por 1 h.

Para la detección del RE α las células fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti -RE α (1/50) a 4 °C toda la noche en cámara húmeda, luego lavadas tres veces con PBS y los inmunocomplejos revelados con un anticuerpo secundario anti-conejo Alexa Fluor 594 (1/1000; Invitrogen, Carlsbad, EE.UU.) por 1 h a 37 °C. Adicionalmente, las muestras fueron incubadas con el conjugado de Concanavalina A-Alexa Fluor 488 (100 μ g/ml; Invitrogen, Eugene, OR) por 20 min a TA. Esta molécula es una lectina que se une específicamente a los α -manosil sacáridos de las glicoproteínas de membrana plasmática, utilizado como un marcador de la misma.

Para el análisis de la co-expresión de p85 α , un intermediario de la vía PI3K, en células lactotropas se realizó una doble-inmunodetección de p85 α /PRL en células de cultivo. En primera instancia los cubreobjetos fueron incubados con un anticuerpo policlonal anti-p85 α (1/50; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.) a 4 °C toda la noche en cámara húmeda, lavados con PBS y seguido por incubación con un anticuerpo secundario anti conejo Alexa Fluor 594 (1/1000) por 1 h a 37 °C. A

continuación, las muestras fueron lavadas e incubadas con un anticuerpo anti-PRL (1/300) por 1 h a 37 °C y luego con el anticuerpo secundario anti conejo conjugado a FITC (1/300; Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, EE.UU.) por 1h a 37 °C.

Para validar la especificidad de las inmunomarcaciones, se realizaron controles aplicando el mismo protocolo pero sustituyendo el anticuerpo primario con 1% de PBS-BSA, seguida por la incubación de los diferentes anticuerpos secundarios.

Las imágenes fueron obtenidas utilizando un microscopio invertido confocal con láser de barrido FluoView FV 1.000 (Olympus, Tokio, Japón; perteneciente al laboratorio de microscopía óptica de la Facultad de Ciencias Químicas, UNC). Un láser de ion-Ar a 488 nm fue utilizado para la excitación de la fluorescencia verde y uno a 543 nm para la excitación de fluorescencia roja. Se recolectaron imágenes de una serie de secciones del eje Z utilizando un objetivo de 60 o 100X. El análisis de las imágenes fue realizado usando el software FV10-ASW 1,6 Viewer.

Análisis estadístico

El análisis estadístico se llevó a cabo con los datos obtenidos de al menos tres repeticiones de cada medida correspondientes a tres cultivos celulares independientes, para lo cual se determinó la media \pm error estándar de la media para cada parámetro evaluado. Los datos fueron analizados realizando el análisis de la varianza (ANOVA) de una vía y aplicando el post-test Tukey utilizando el programa informático InfoStat 1,5 (versión InfoStat 2004; Grupo InfoStat, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina). En todos los casos se realizó un análisis de varianza para un diseño en bloques (Cultivos) con 3 repeticiones y el efecto de bloque no fue significativo. Las diferencias entre los tratamientos fueron comparadas aceptando como significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados

Caracterización del cultivo primario de células adenohipofisarias

En este trabajo de tesis se emplearon cultivos primarios de células adenohipofisarias provenientes de ratas hembras en distintos fases del ciclo estral, compuestos por diferentes poblaciones celulares endocrinas. Los protocolos experimentales se realizaron en el sexto día de cultivo, periodo en el cual la población de células lactotropas presenta mayor tasa proliferativa, por pérdida del control inhibitorio, alcanzando aproximadamente un 65% de la población total. En la figura 11A se observa la inmunofluorescencia para PRL de una monocapa de células en cultivo en la cual se observa una alta proporción de células lactotropas, que también fue evidenciado mediante citometría de flujo (Figura 11B).

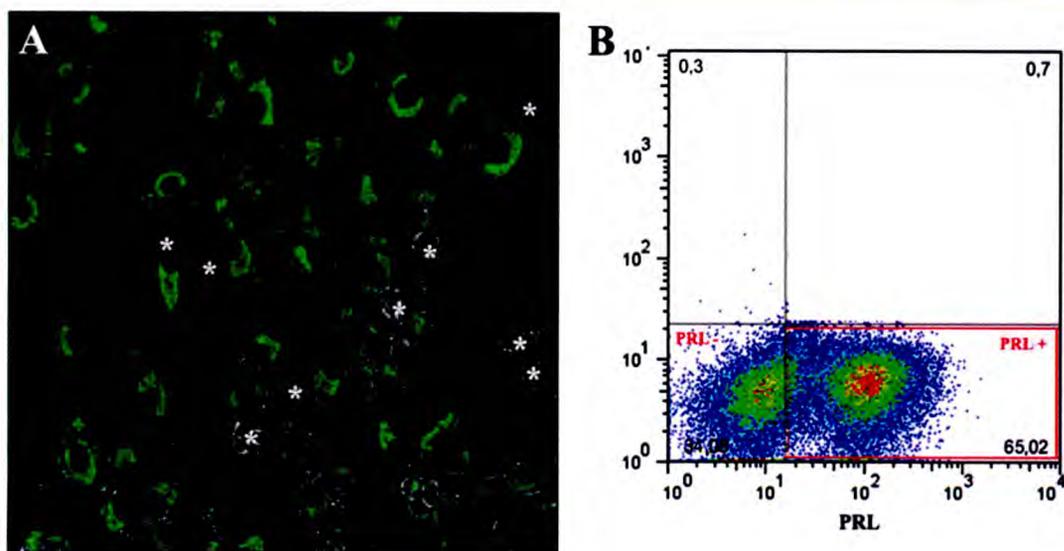


Figura 11: Caracterización del cultivo primario adenohipofisario

A- Células lactotropas en cultivo: imagen representativa de inmunofluorescencia para PRL en monocapa, superpuesta con imagen de transmitancia. La señal correspondiente a PRL presenta distribución principalmente perinuclear, siendo más débil en el resto del citoplasma. (*) Células negativas para PRL. **B-** Diagrama de puntos de la población de células lactotropas determinadas por citometría de flujo que muestra el 65% de células PRL+ del total de la población.

La población de células lactotropas en cultivo presenta sub-poblaciones que son morfológica y funcionalmente diferentes. Por inmunocitoquímica ultraestructural, (Figura 12) se identificaron en mayor proporción las células lactotropas tipo I, caracterizada por presentar gránulos secretorios de 500-900 nm de diámetro, resultado que se correlaciona lo observado en citometría de flujo donde se observa una población principal con alta intensidad de fluorescencia para PRL. Así también, se observaron algunas células lactotropas tipo II con gránulos secretorios esféricos de 300-500 nm de diámetro, que correspondería a la población con menor intensidad de fluorescencia para PRL observada en citometría de flujo.

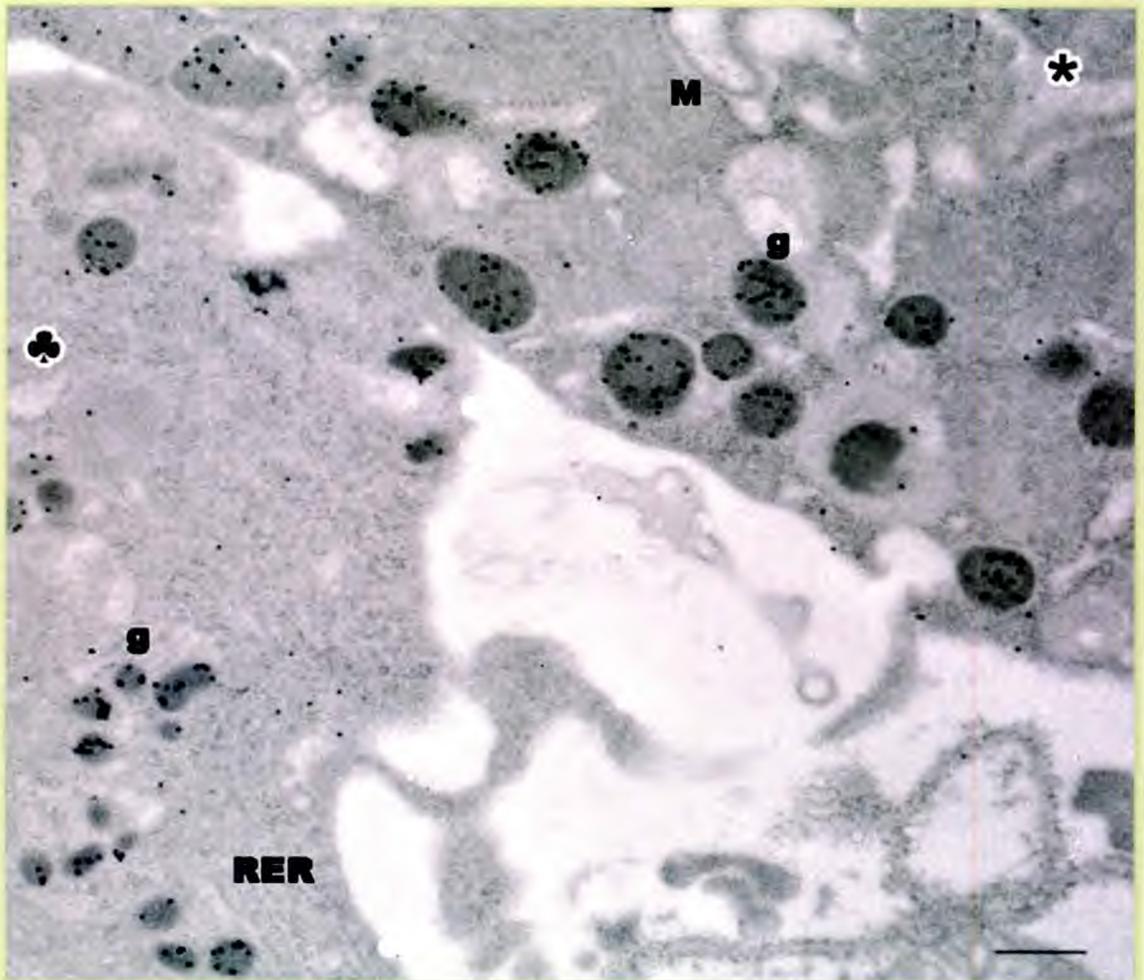


Figura 12: Células lactotropas tipo I y II. Inmunomarcación de PRL en células adenohipofisarias en cultivo a nivel ultraestructural. Porción de lactotropa tipo I (*) y lactotropa tipo II (♣). g: gránulo secretorio; M: mitocondria; RER: retículo endoplasmático rugoso. Magnificación original: 30000x; barra= 0,5µm.

1) Análisis del efecto del estradiol sobre la actividad secretoria inducida por TRH en células lactotropas

Secreción de PRL en cultivo primario de células adenohipofisarias

En primer lugar nos propusimos analizar si E2 es capaz de modular la liberación de PRL inducida por TRH y luego de comprobar este efecto determinar la participación de los RE asociados a la membrana. Para alcanzar este objetivo utilizamos como herramienta un complejo de E2 unido covalentemente a BSA (E2-BSA). Ha sido descrito que la membrana plasmática es impermeable a los esteroides conjugados a BSA por lo cual, estos complejos han sido ampliamente utilizados para evaluar los efectos de los esteroides iniciados a nivel de la membrana plasmática [134].

Los niveles de PRL liberada al medio de cultivo fueron analizados en cultivos primarios incubados con E2, E2-BSA o TRH solos o combinados: TRH con E2 o E2-BSA por 30 min. Se observó que E2 indujo un aumento significativo en la liberación de PRL, efecto que fue aún mayor en las células estimuladas con E2-BSA, alcanzando valores de un 180% en comparación a los controles. Como era esperado, la secreción de PRL exhibió un incremento significativo (\approx de 3 veces) en respuesta al estímulo con TRH, mientras que la co-incubación con E2/TRH produjo un incremento similar a TRH.

Un hallazgo muy interesante fue observado luego de la incubación con E2-BSA/TRH donde se registraron los niveles más altos de liberación de PRL en el medio de cultivo, alcanzando valores de 5 veces en comparación con células control y de aproximadamente el 60% con respecto a los niveles inducidos por TRH (Figura 13).

Estos resultados sugieren que el E2 actuaría a través de los RE de membrana en el efecto potenciador ejercido por E2 sobre la liberación rápida de PRL inducida por TRH.

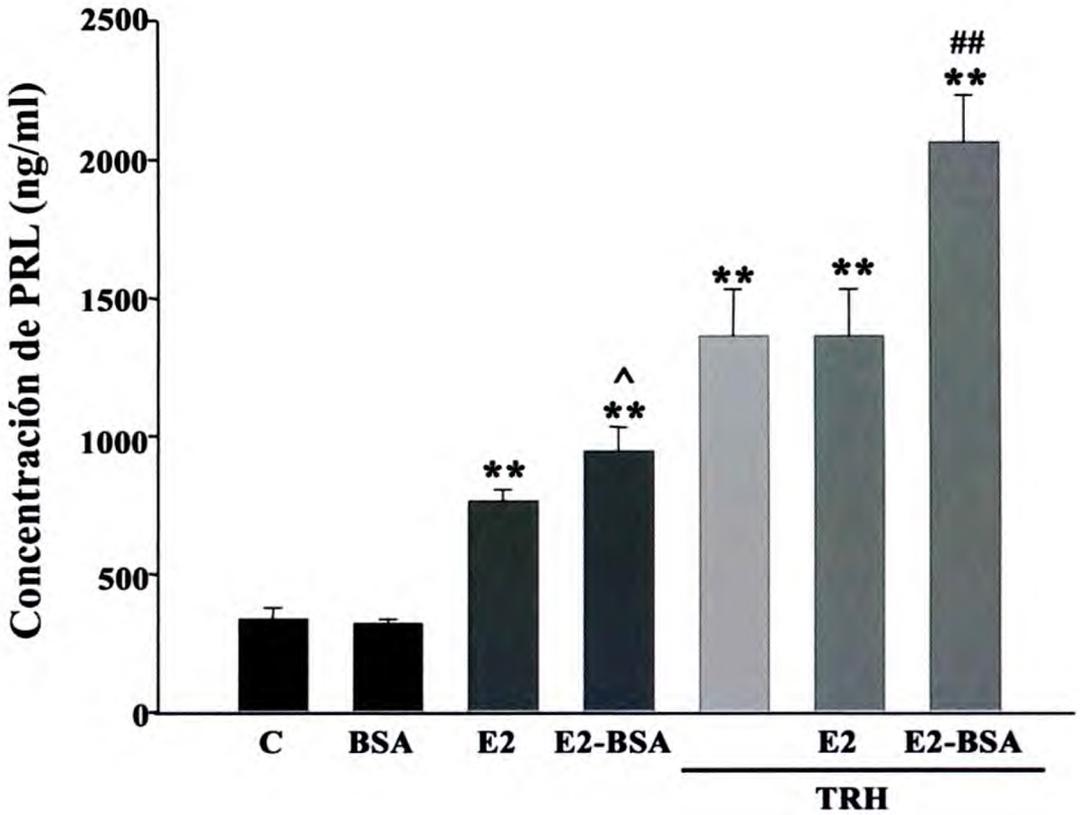


Figura 13: Secreción de PRL inducida por el tratamiento de E2 y TRH: La PRL liberada al medio de cultivo alcanzó los máximos valores luego del tratamiento de E2-BSA/TRH. Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: ** $P < 0,01$ vs control; ^ $P < 0,05$ vs E2 y ## $P < 0,01$ vs TRH.

Para confirmar que el efecto del E2 sobre la secreción de PRL es mediado por los RE, se utilizó un antagonista específico de los mismos: ICI 182,780 (ICI). Las células adenohipofisarias fueron pre-incubadas con ICI a diferentes concentraciones (100, 500 y 1000 nM) 30min antes de la exposición a E2 o E2-BSA por 30min adicionales. En todas las concentraciones de ICI utilizadas se observó una disminución significativa de la secreción de PRL promovida por E2 o E2-BSA, (Figura 14).

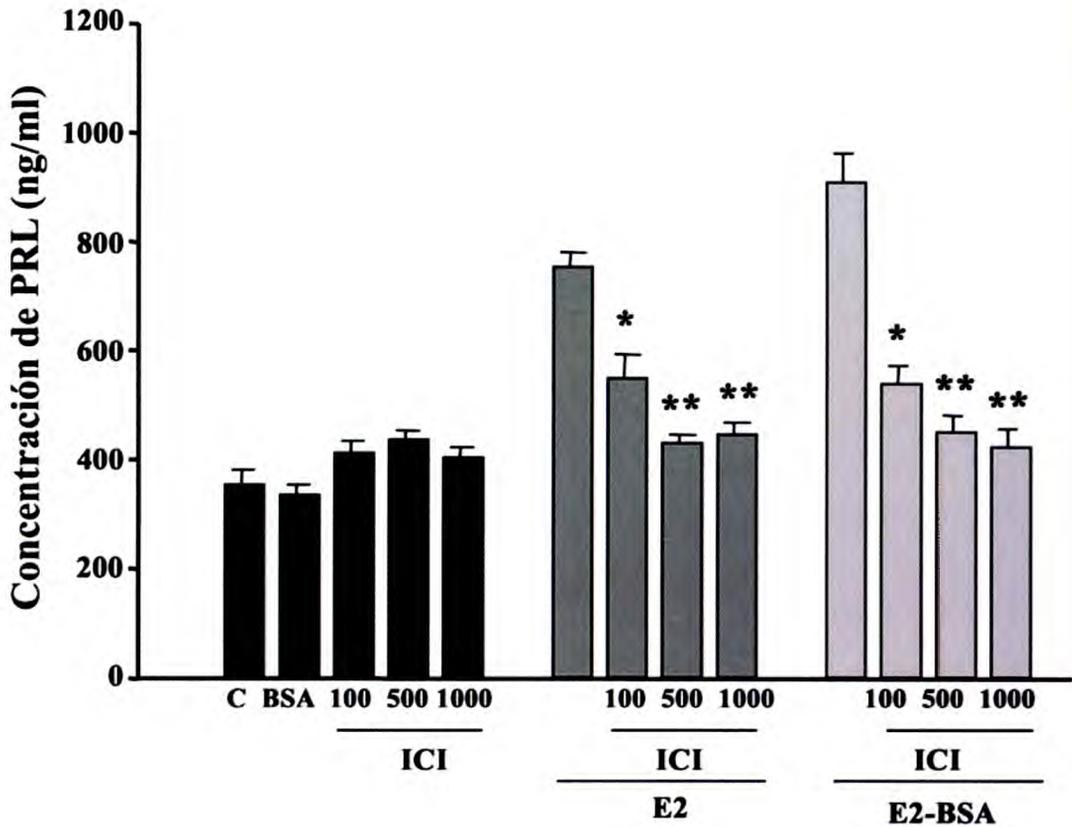


Figura 14: Efecto de ICI 182780 sobre la secreción de PRL inducida por el E2 o E2-BSA.

La liberación de PRL al medio de cultivo fue inhibida por ICI en todas las concentraciones utilizadas. Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: * $P < 0,05$ y ** $P < 0,01$ comparados con E2 o E2-BSA.

A continuación, basado en las respuestas obtenidas en el experimento anterior se seleccionó la dosis más baja del inhibidor ICI (100 nM) para analizar el efecto del mismo sobre la liberación de PRL inducida por E2/TRH y E2-BSA/TRH. El antagonista específico de los RE inhibió la liberación de PRL inducida por E2 o E2-BSA en co-incubación con TRH. Un resultado esperado fue que ICI no modificó la liberación de PRL inducida por TRH (Figura 15).

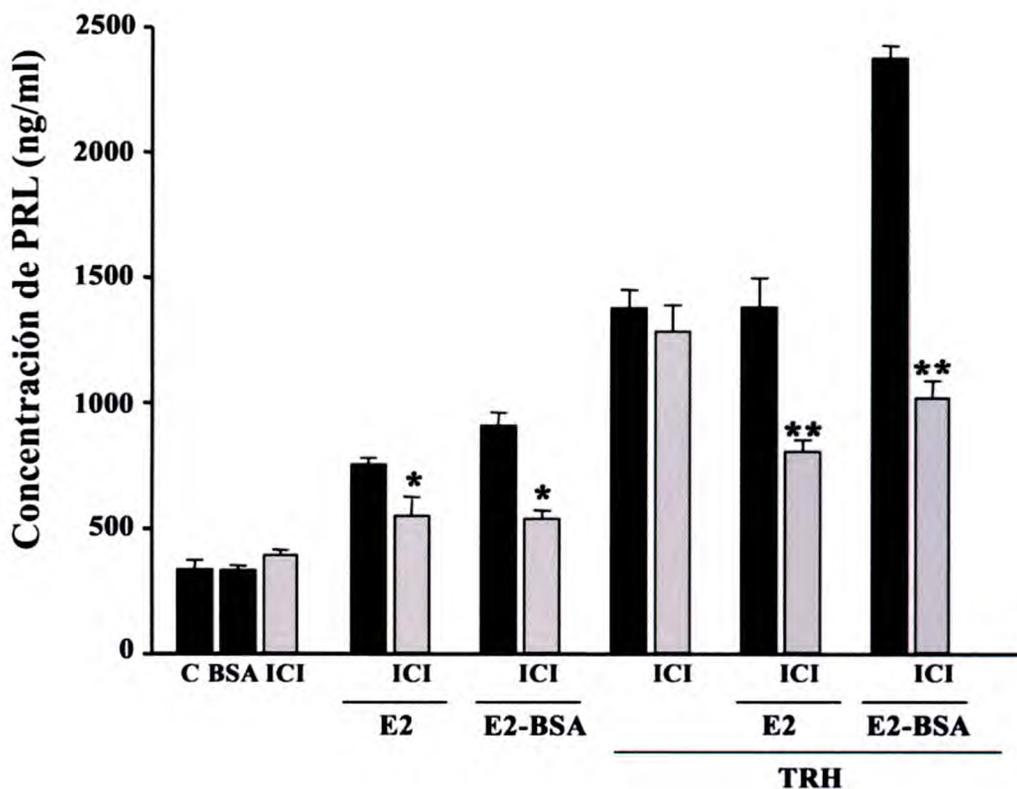


Figura 15: Efecto de ICI 182780 sobre la secreción de PRL inducida por el tratamiento combinado de E2 y TRH. La liberación de PRL al medio de cultivo fue inhibida parcialmente por ICI en los cultivos celulares tratados con E2/TRH o E2-BSA/TRH. Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: * $P < 0,05$ vs E2 o E2-BSA y ** $P < 0,01$ vs E2/TRH o E2-BSA/TRH.

Participación de la vía PI3K/Akt en la liberación de PRL

Se ha descrito la activación de la vía fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)/Akt a través de un mecanismo dependiente de ERK en las células hipofisarias por IGF-1 induciendo un aumento de la secreción de PRL por [174]. Sin embargo, aún no ha sido reportada la participación de esta vía en los efectos del E2/TRH sobre la liberación de PRL mediados por los RE α de membrana. Para analizar si la vía de señalización PI3K/Akt está involucrada en la actividad secretoria de las células lactotropas inducida por E2 o E2-BSA y TRH, se utilizaron dos inhibidores de PI3K: LY-294002 y wortmanina.

La pre-incubación con los inhibidores de PI3K no modificó la secreción de PRL inducida por E2, mientras que la liberación de PRL en respuesta a E2-BSA, TRH o E2/TRH fue bloqueada parcialmente. Sin embargo, la actividad secretoria de las células lactotropas promovida por E2-BSA/TRH fue bloqueada totalmente en presencia de los inhibidores de PI3K, alcanzando niveles similares a los del control (Figura 16).

Estos resultados sugieren que los RE de membrana estarían mediando el efecto del E2 sobre la liberación de PRL inducida por TRH a través de la vía PI3K.

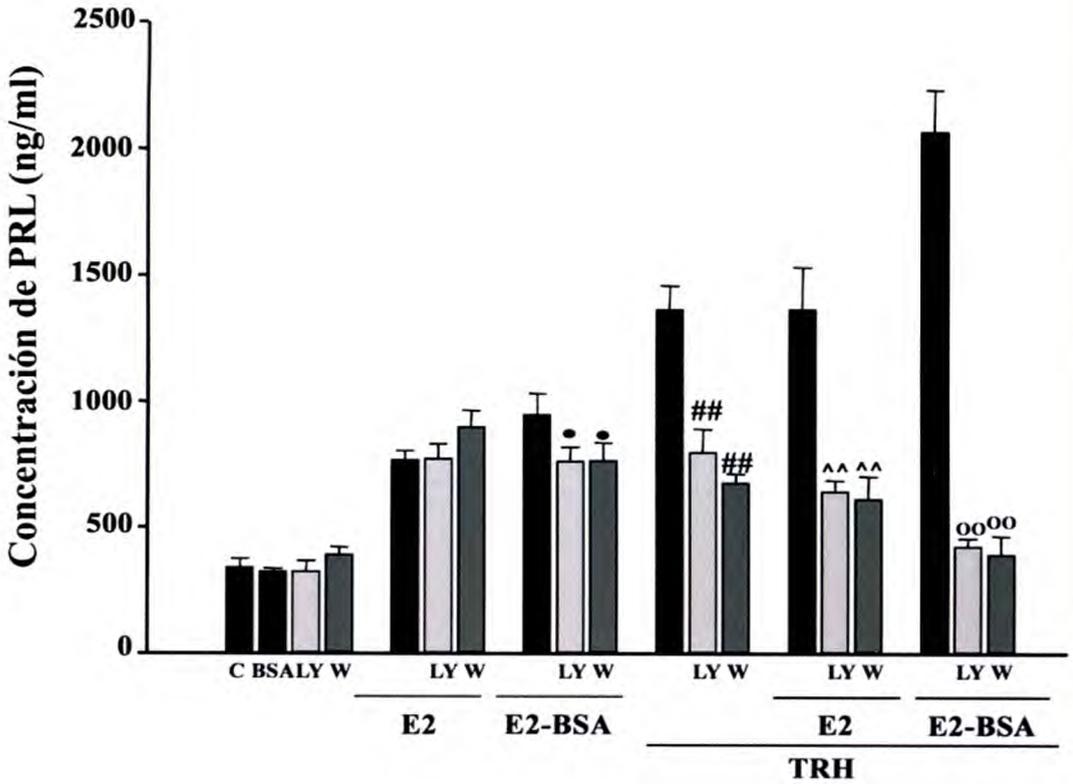


Figura 16: Efecto de los inhibidores de PI3K sobre la secreción de PRL. Ambos inhibidores, LY-294002 (LY) y wortmanina (W) disminuyeron los niveles de PRL, siendo total en cultivos celulares estimulado con E2-BSA/TRH. Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: • $P < 0,05$ vs E2-BSA, ## $P < 0,01$ vs TRH; ^^ $P < 0,01$ vs E2/TRH y oo $P < 0,01$ vs E2-BSA/TRH.

Teniendo en cuenta que los inhibidores LY-294002 y wortmanina modificaron la liberación de PRL, se evaluó la activación de la vía PI3K. Esto fue realizado mediante el análisis de translocación de p85 α , subunidad reguladora de PI3K, en las células lactotropas por inmunofluorescencia. Con este objetivo, las células en cultivo se estimularon con E2, E2-BSA o TRH solos o co-incubados por 30 min y posteriormente procesadas para una doble inmunocitoquímica de p85 α y PRL utilizando dos fluoroforos diferentes.

En células lactotropas controles, la inmunomarcación correspondiente a la subunidad p85 α fue observada principalmente a nivel del citoplasma, lo cual sería indicativo de un estado inactivo de la vía PI3K. Mientras que el E2 libre no modificó la

distribución sub-celular de esta subunidad (fig. 17-A), el tratamiento con E2-BSA y TRH solos o co-incubados indujeron la translocación de la subunidad p85 α desde el citoplasma hacia la membrana plasmática de las células lactotropas, pudiendo ser interpretadas como una activación inicial de la vía PI3K (fig 17-B).

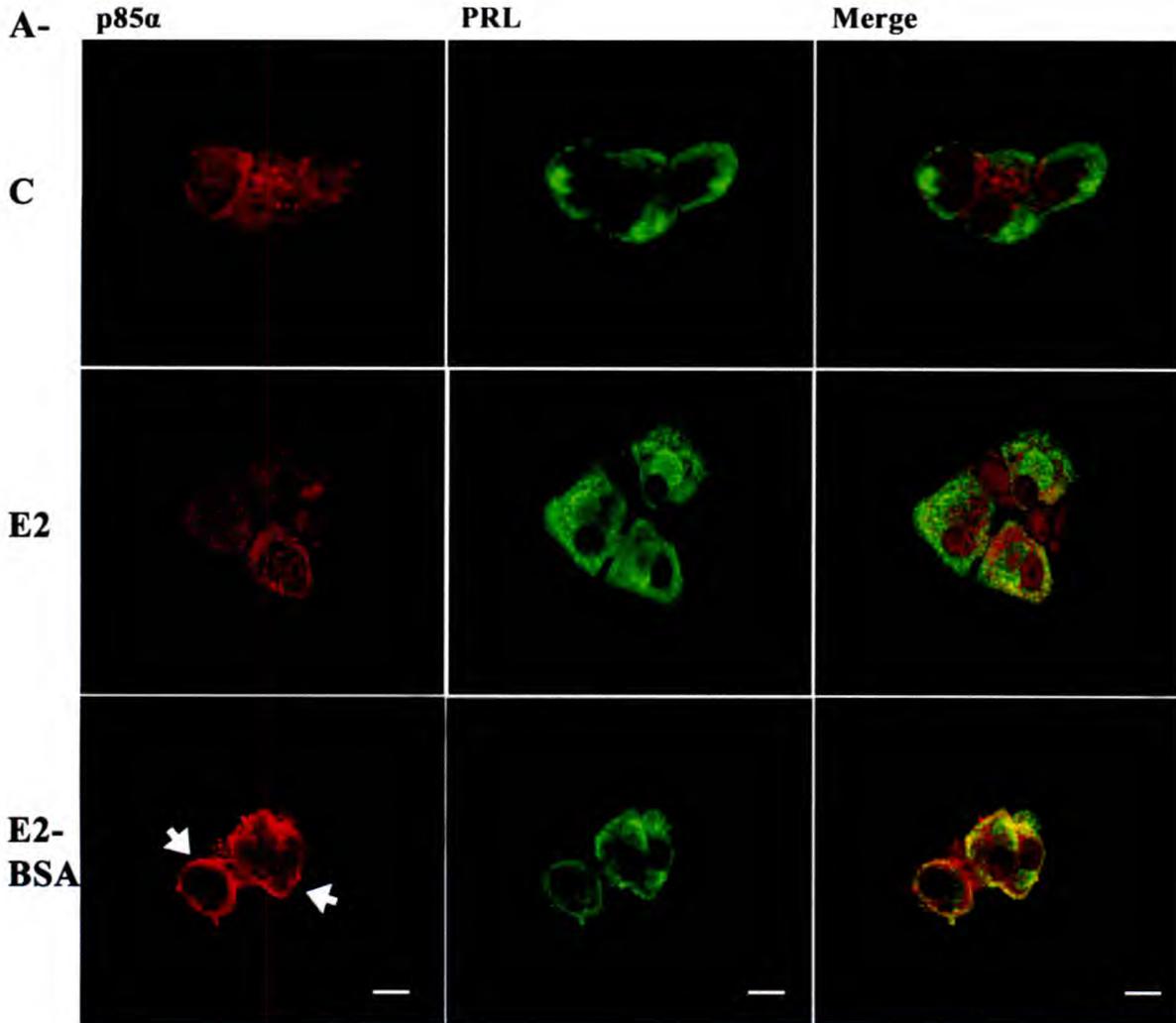


Figura 17-A: Translocación de la subunidad reguladora de la vía PI3K, p85 α , a la membrana plasmática de células lactotropas. Imágenes representativas de inmunofluorescencia para la subunidad p85alfa (rojo) en células positivas para PRL (verde). La translocación de p85 alfa desde el citoplasma hacia la membrana plasmática (flechas) de las lactotropas fue observada en las células estimuladas con E2-BSA. Magnificación original: 60x; barra: 10 μ m.

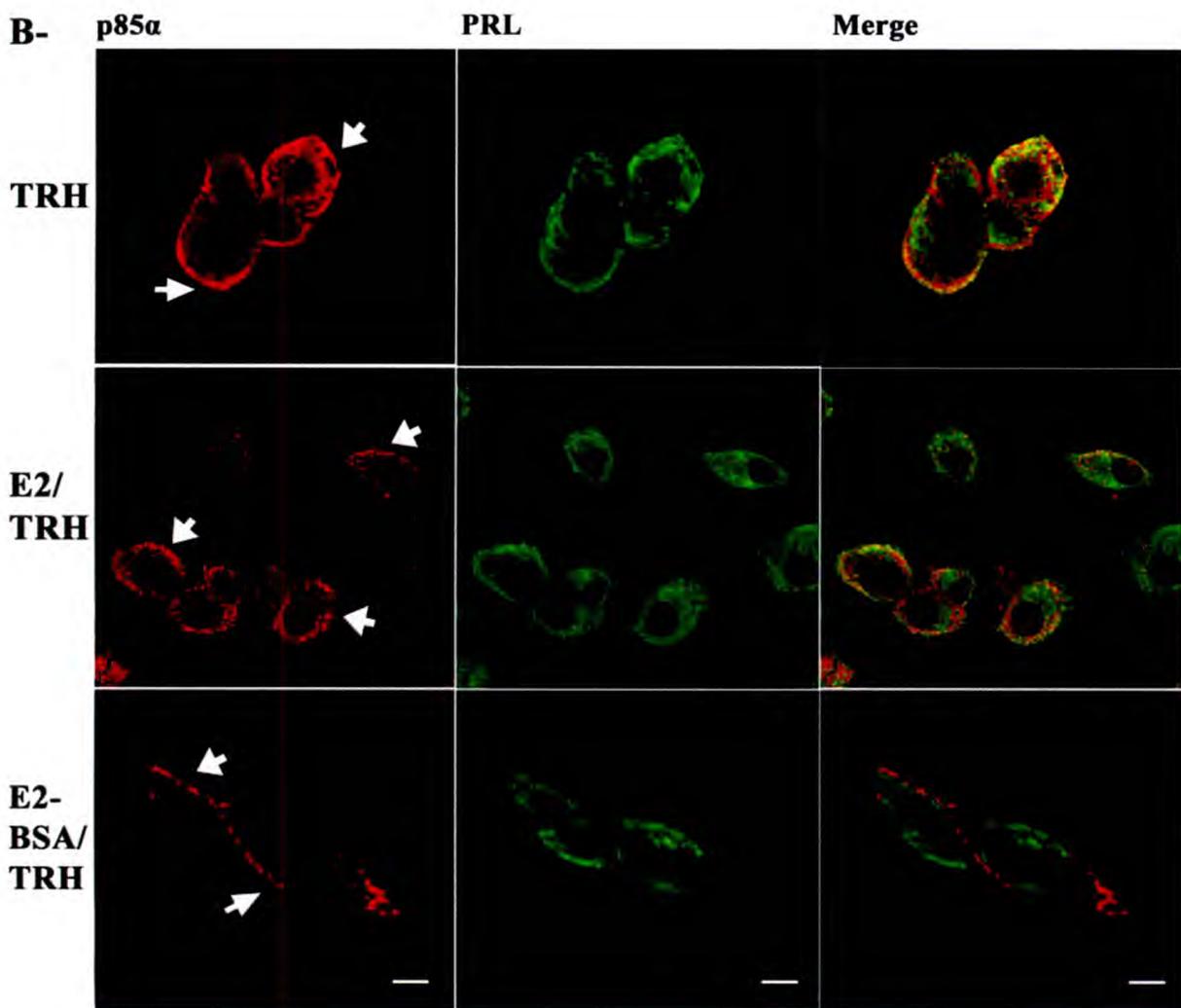


Figura 17-B: Una notable translocación de p85 alfa desde el citoplasma hacia la membrana plasmática (flechas) de las lactotropas fue observada en las células estimuladas con E2/TRH o E2-BSA/TRH. Magnificación original: 60x; barra: 10 μ m.

Finalmente en el análisis de la vía PI3K, evaluamos por Western Blot la expresión la proteína Akt, que se considera la principal quinasa de esta vía. Como se muestra en la figura 18, la incubación de las células en cultivo con E2, E2-BSA, TRH o E2/TRH no indujeron cambios en la expresión de Akt fosforilada mientras que el tratamiento con E2-BSA/TRH por 30 min indujo un aumento significativo de Akt fosforilada en comparación con sus controles. La expresión de Akt total fue similar en todos los tratamientos y utilizada como un control interno para confirmar la carga equivalente de proteínas en todas las calles (Figura 18).

En resumen, tanto la translocación de p85 α hacia la membrana plasmática de células lactotropas como el aumento de la fosforilación de Akt estarían indicando la activación de la vía PI3K en respuesta al estímulo con E2-BSA/ TRH.

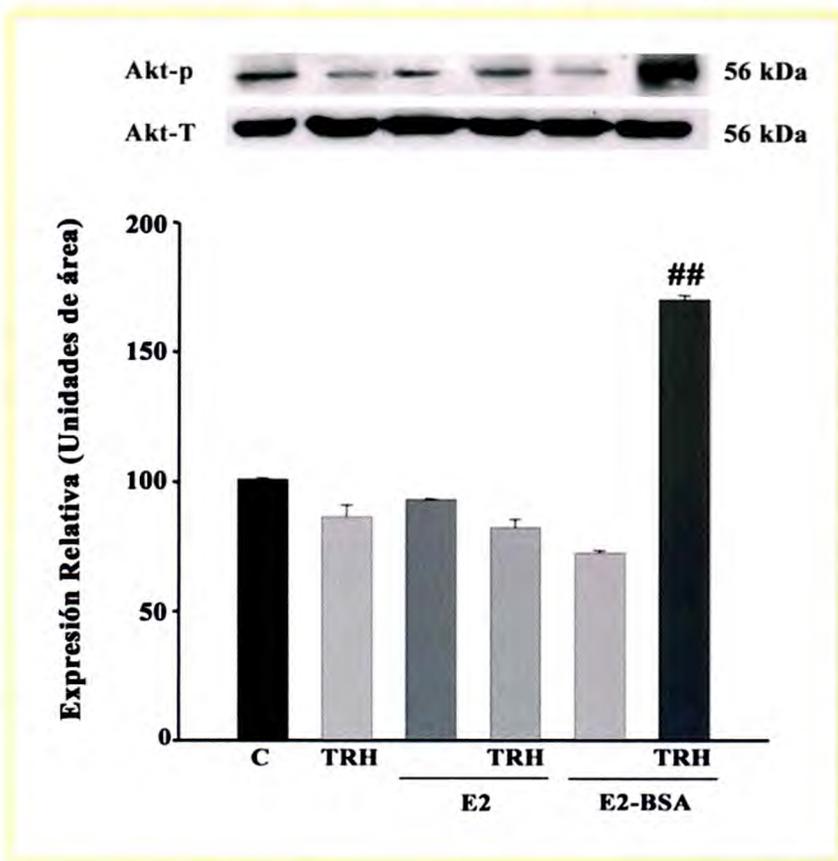


Figura 18: Expresión de Akt en cultivo de células adenohipofisarias: Bandas de western blot representativas y análisis densitométrico de la relación entre la expresión de Akt fosforilada (Akt-p)/Akt totales (Akt-T). Un significativo aumento de la expresión de Akt fosforilada fue observada luego del estímulo con E2-BSA/TRH. Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: ^{##}P<0,01 vs TRH o E2-BSA.

Participación de la vía MEK/ERK 1/2 en la liberación de PRL

En estudios anteriores, se describió que la secreción de PRL inducida por E2 a través de los RE α de membrana es mediada por la activación de la vía PKC/ERK1/2 [146]. Por lo cual se analizó a continuación la activación de la vía MEK/ERK 1/2 y su posible participación en el aumento de la secreción de prolactina observada en los tratamientos con los factores en forma combinada de los diferentes modelos experimentales. En los extractos totales de los cultivos de células adenohipofisarias estimuladas con E2, E2-BSA o TRH solos o en combinación, se determinó la expresión de ERK 1/2 fosforilada. Un aumento de la expresión de la misma fue observado en células estimuladas con los factores solos, siendo mayor luego del tratamiento con E2/TRH y E2-BSA/TRH. La respuesta secretoria inducida por ambos estímulos no mostró diferencias significativas (Figura 19).

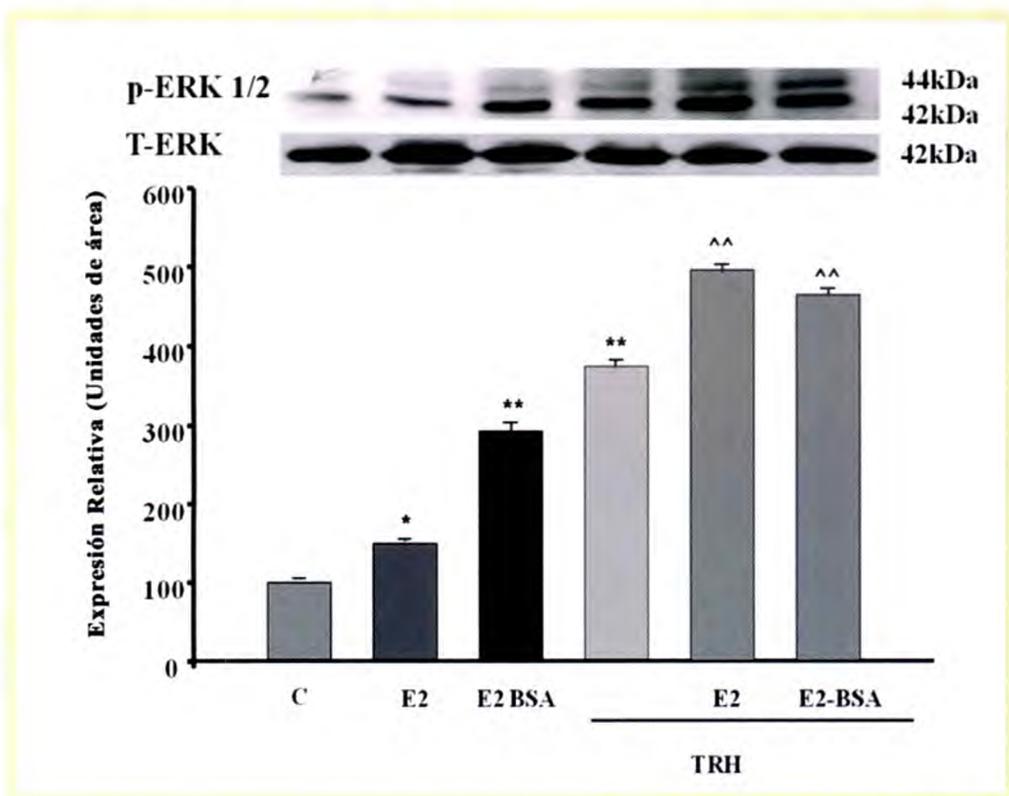


Figura 19: Expresión de ERK 1/2 en cultivo de células adenohipofisarias. Bandas de Western Blot representativas y análisis densitométrico de la relación entre la expresión de ERK fosforilada (p-ERK)/ ERK total (T-ERK). Los estímulos E2/TRH y E2-BSA/TRH indujeron la mayor expresión de ERK1/2 fosforilada. Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey. ** P < 0,01 vs C, * P < 0,05 vs C; ^^ P < 0,01 vs TRH.

La participación de la vía MEK/ERK 1/2 fue confirmada utilizando el inhibidor específico de la activación de la quinasa MEK. Como se observa en la figura 20 la secreción de PRL inducida por E2, E2-BSA o TRH solos o en combinación fue bloqueada en forma parcial en presencia del inhibidor de MEK. Este resultado indicaría que esta vía estaría participando en forma conjunta con la vía PI3K en la secreción de PRL.

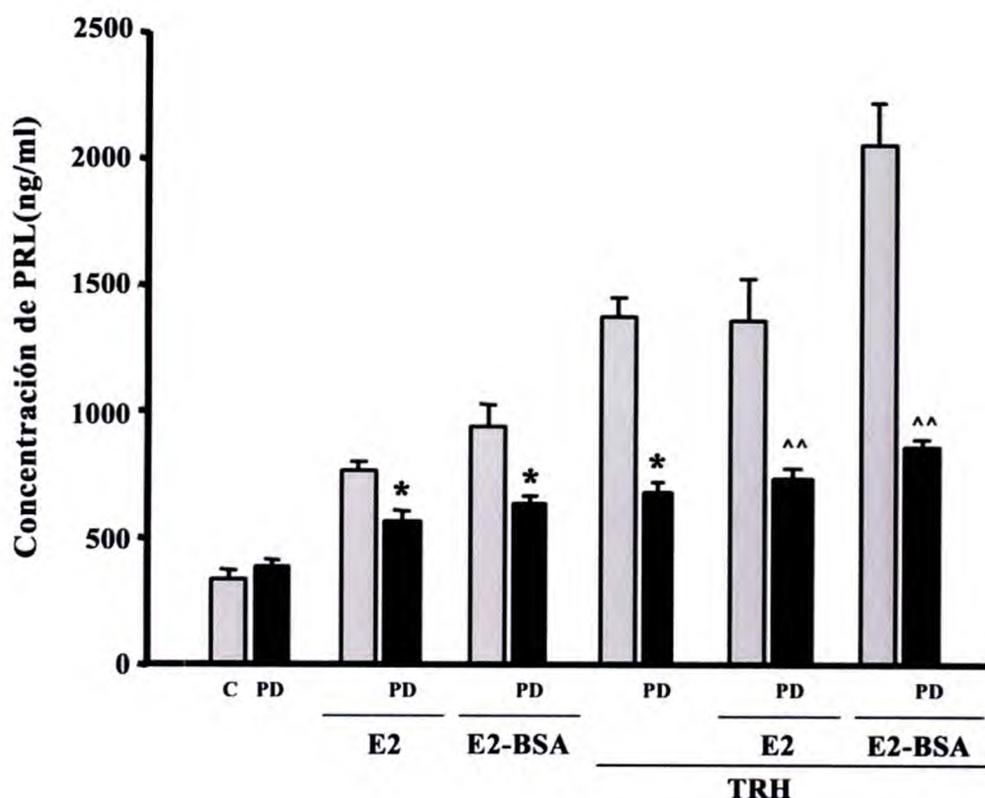


Figura 20: Efecto del inhibidor de MEK sobre la secreción de PRL. La liberación de PRL inducida por los diferentes factores fue bloqueada parcialmente en presencia del inhibidor de MEK (PD). Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: ** P < 0,01 vs factores sin PD; ^^P < 0,01 vs E2/TRH y E2-BSA/TRH sin PD.

De acuerdo a los resultados obtenidos es posible postular que ambas vías (PI3K/Akt–MEK/ERK1/2) estarían participando en el aumento de la secreción de PRL observado. Para evaluar la posible interacción entre ambas vías, las células adenohipofisarias en cultivo fueron pre-incubadas con el inhibidor de PI3K (LY-294002), estimuladas con los diferentes factores y posteriormente determinada la expresión de la proteína ERK 1/2 en extractos totales por Western Blot. Como se observa en la figura 21, la aplicación del inhibidor no produjo variaciones en la expresión de ERK 1/2 fosforilada inducida por los diferentes tratamientos aplicados. Estos resultados indicarían que la vía PI3K/Akt y MEK/ERK 1/2 son activadas de manera independiente y no presentarían mediadores en común.

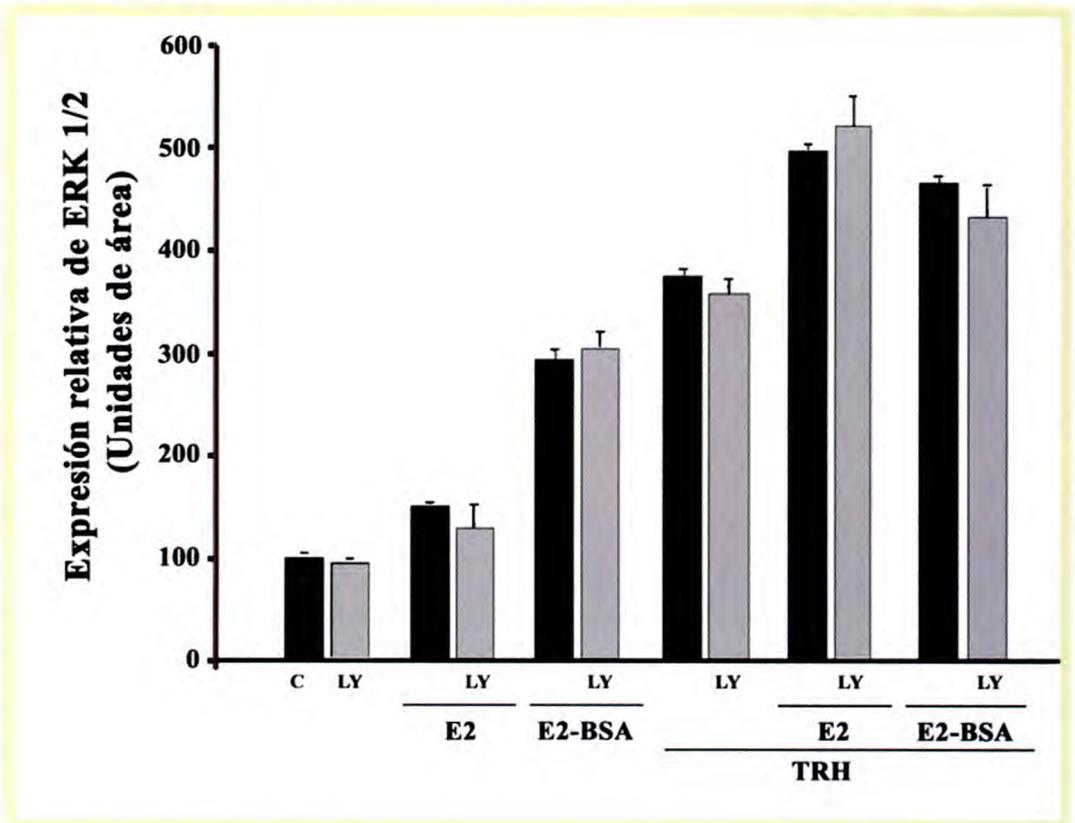


Figura 21: Expresión de ERK 1/2 en cultivo de células adenohipofisarias. Análisis densitométrico de la relación de la expresión de ERK 1/2/ERK total en extracto total de células adenohipofisarias pre-incubadas con el inhibidor de PI3K (LY). No se encontraron variaciones significativas en la expresión de ERK 1/2 en presencia de LY. Los datos se evaluaron por ANOVA.

Movilización del ER α hacia la membrana plasmática en células adenohipofisarias

Considerando que los RE de membrana estarían mediando los efectos moduladores del E2 sobre la secreción de PRL inducida por TRH, se analizaron los cambios de expresión del RE α en la membrana plasmática de células adenohipofisarias mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo.

En la figura 22 se observa que en células no estimuladas, la inmunomarcación específica del RE α endógeno, es principalmente nuclear y además se observa dispersa en el citoplasma. Sin embargo, en las células estimuladas con E2 o E2/TRH por 30 min se observó un aumento de la localización del RE α en la membrana plasmática de células adenohipofisarias (Fig. 22A). La presencia del RE α en membrana plasmática fue confirmada utilizando Concaivalina A (Con-A) acoplado a Alexa Fluor 488 como marcador de membrana. Como se ilustra en la figura 23B, se observó co-localización del RE α y Con-A a nivel de la membrana plasmática en células adenohipofisarias estimuladas con E2/TRH (Figura 22).

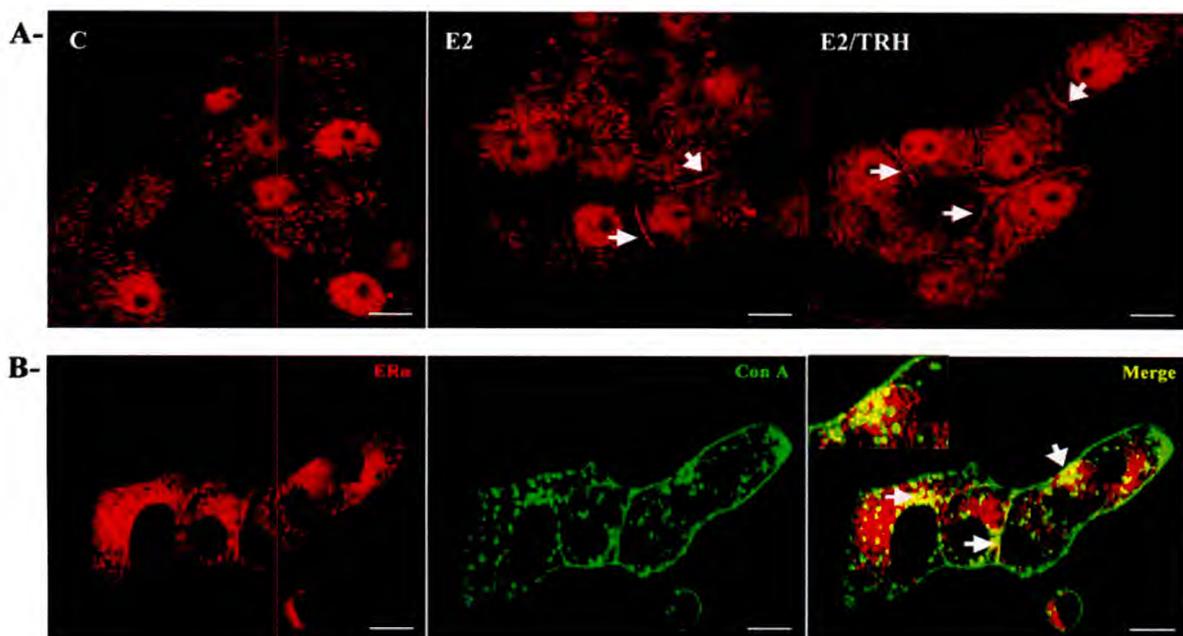


Figura 22: Movilización de RE α a la membrana plasmática de células adenohipo-fisarias en cultivo. A- Imágenes representativas de la inmunofluorescencia para RE α (flechas) en la membrana celular. **B-** Colocalización del RE α (rojo) y Con-A (verde) en la membrana plasmática (flechas, recuadro) de las células adenohipofisarias estimuladas con E2/TRH. Magnificación original: 60x; barra= 10 μ m.

Además, se evaluaron los cambios en la expresión del RE α en la membrana plasmática de la población de células lactotropas inducidos por los diferentes estímulos por citometría de flujo. Se observó que del total de las células analizadas el 69% corresponden a la población de células lactotropas. La detección simultánea de esta población celular con el RE α indicó que el 6% las lactotropas expresan el receptor de estrógeno en la superficie celular.

El porcentaje de lactotropas que expresa el RE α en su membrana no tuvo variaciones luego de la estimulación con E2, E2-BSA o TRH solos o co-incubados por 30 min. Por otra parte, la expresión basal del RE α en la superficie de las lactotropas no fue modificada por TRH, E2-BSA, o E2-BSA/TRH, mientras que el tratamiento con E2 y E2/TRH si indujo cambios que se vieron reflejados en un notable aumento de la intensidad de fluorescencia del RE α (Figura 23A). Este incremento fue evaluado por el análisis de la media geométrica de la población doble positiva para el RE α y PRL. La expresión del RE α en células lactotropas no mostró diferencias significativas entre los tratamientos con E2 y E2/TRH (Figura 23B).

Estos resultados indicarían que la movilización de los RE intracelulares hacia la membrana plasmática en la población de células lactotropas es solo inducida por E2.

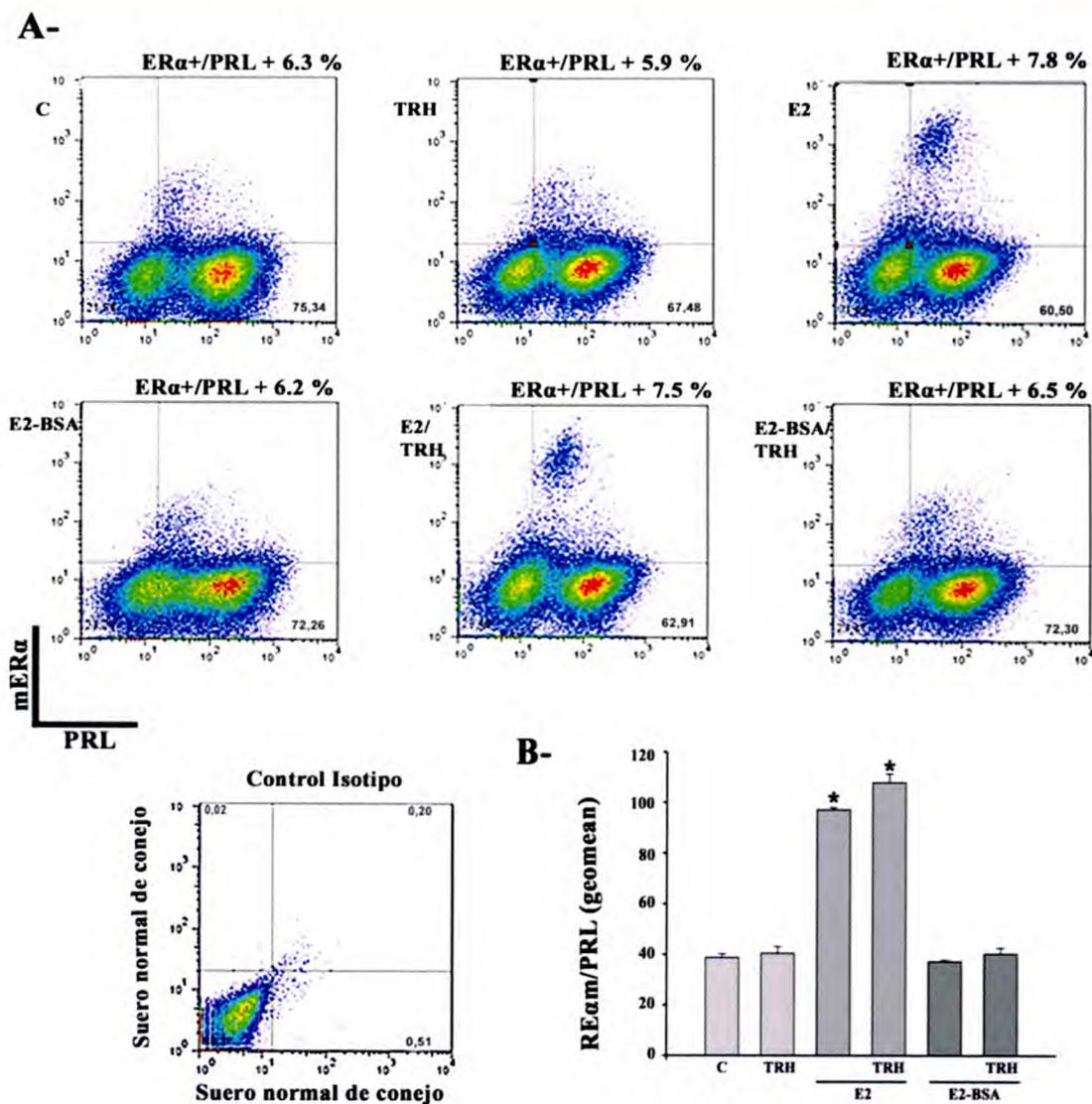


Figura 23: Expresión del RE α de membrana en la superficie de las células lactotropas. A- Diagramas de puntos representativos para la expresión de PRL y RE α de membrana en células lactotropas controles o estimuladas. Un aumento de la intensidad de fluorescencia fue inducido por E2 y E2/TRH. Controles de isotipo representado por células doble negativas para RE α m y PRL.

El eje X representa la expresión de PRL y el eje Y la expresión del RE α m en la superficie celular. Las variaciones de porcentajes de células positivas se muestran en el cuadrante superior.

B- Gráfico de barras de la media geométrica (geomean) del RE α m/PRL para los diferentes tratamientos aplicados. Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: *P<0,01 vs C.

2) Estudio del efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas

Respuesta proliferativa de lactotropas en cultivo inducida por E2 y FGF2

En primer lugar analizamos el efecto de E2 y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas en cultivo, que fue evaluada mediante la incorporación nuclear de BrdU, un análogo de la timidina. Por doble inmunocitoquímica de BrdU y PRL utilizando dos cromógenos se determinó la proporción de células lactotropas positivas para BrdU.

En condiciones basales (controles), el 2,5% de las células lactotropas incorporaron BrdU. El tratamiento con E2 (10 nM) o FGF2 (10ng/ml) por 4h, en condiciones libre de suero, no indujeron modificaciones en la captación de BrdU en la población de lactotropas, mientras que el tratamiento con E2/FGF2 promovió la actividad mitogénica de las mismas (≈ 2 veces) comparadas con las células tratadas con E2 o FGF2 (Figura 24A-B).

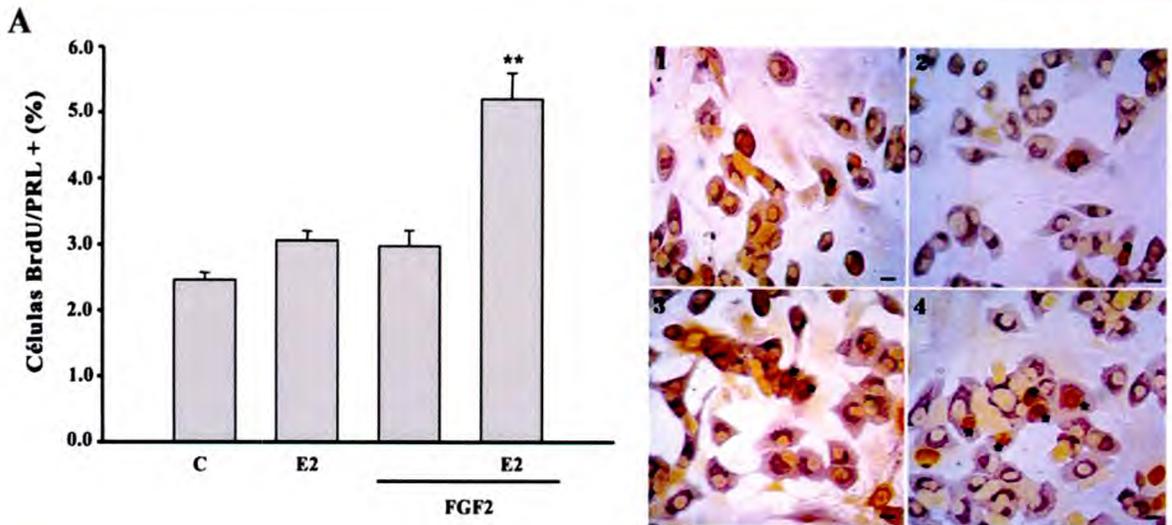


Figura 24: Proliferación de células lactotropas inducida por E2/FGF2 **A-** El tratamiento con E2/FGF2 por 4h indujo un aumento en la captación de BrdU. Los datos representan la proporción de células BrdU-PRL+ del total de células PRL positivas y se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: ** $P < 0,01$ vs E2 y FGF2. **B-** Imágenes representativas de la doble inmunomarcación para BrdU y PRL de células no estimuladas (1) o estimuladas con E2 (2), FGF2 (3) y E2/FGF2 (4). La PRL presenta una distribución perinuclear en las lactotropas (violeta) y la BrdU se localiza en el núcleo (marrón). Células doble + BrdU/PRL (*). Magnificación original 40x; barra=10 μ m.

Participación de los receptores estrogénicos en la proliferación de células lactotropas

Para determinar si el efecto proliferativo del E2 en interacción con FGF2 fue mediado por los RE α o β , se utilizaron PPT y DPN, agonistas del RE α y β respectivamente.

Los cultivos primarios adenohipofisarios fueron incubados con PPT (10 nM), DPN (10 nM) o FGF2 (10ng/ml) solos o co-incubados con los agonistas del E2 por 4 h. Se observó que el número de células lactotropas en mitosis no cambió con el estímulo de PPT o DPN. Sin embargo, la co-incubación de PPT/FGF2 indujo un aumento significativo de la proporción de células doble positivo para BrdU/PRL, casi duplicando los valores observados con PPT o FGF2 solos. Esta respuesta proliferativa fue similar a la alcanzada luego del tratamiento combinado con E2/FGF2 como se observa en la figura 25A. En contraste, el tratamiento con DPN/FGF2 no mostró cambios en el número de células lactotropas que incorporaron BrdU.

Estos resultados sugieren la participación de los RE α en el efecto inducido por de E2/FGF2 sobre la proliferación de la población de células lactotropas.

Con el objetivo de confirmar la participación de los RE en el efecto del E2 sobre la proliferación, las células adenohipofisarias fueron pre-incubadas con el antagonista de los RE ICI 182780 (100 nM) y luego estimulados con los factores específicos por 4h. Como se muestra en la Figura 25B, ICI 182780 bloqueó el efecto proliferativo promovido por E2/FGF2 o PPT/FGF2, resultado que confirma la participación específica del RE α en la proliferación de células lactotropas.

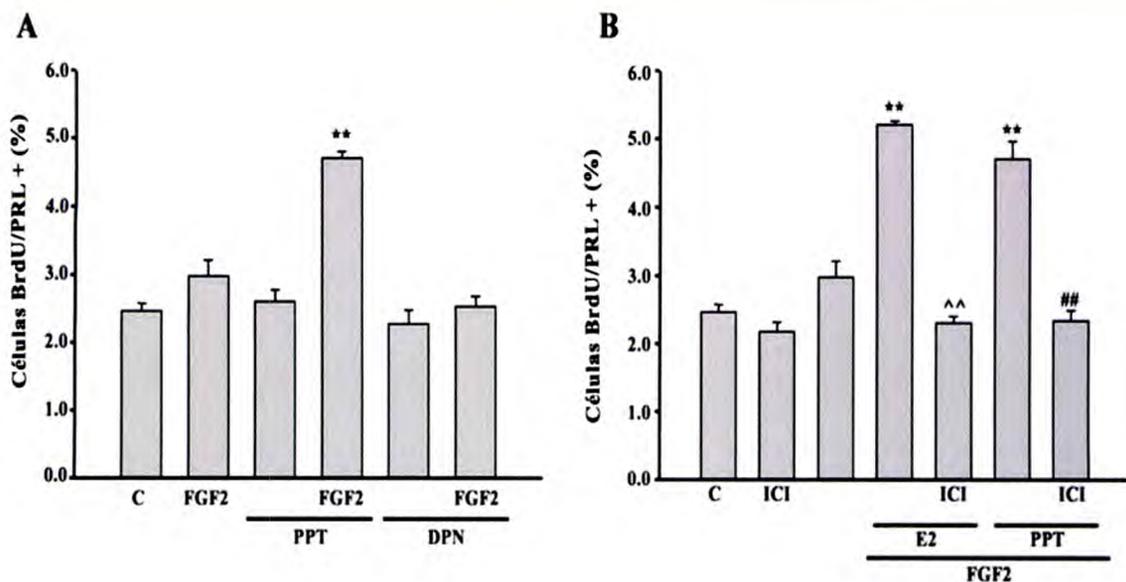


Figura 25: Participación de los subtipos α y β del RE en la proliferación de células lactotropas.

A- El tratamiento combinado por 4h con PPT/FGF2 incrementó la captación de BrdU. Los datos representan la proporción de células BrdU-PRL del total de células PRL positivas y se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: ** $P < 0,01$ vs PPT y FGF2. **B-** La proliferación de lactotropas inducida por E2/FGF2 y PPT/FGF2 fue bloqueada en presencia de ICI. ** $P < 0,01$ vs C, ^^ $P < 0,001$ vs E2/FGF2 sin ICI y ## $P < 0,01$ vs PPT/FGF2 sin ICI.

Participación de los RE de membrana en la actividad mitogénica de lactotropas inducida por E2/FGF2

Con el objetivo de analizar si señales iniciadas en la membrana desencadena efectos proliferativos, se analizó si el RE de membrana en las células lactotropas estaba involucrado en el aumento de la proliferación observado con el tratamiento de E2/FGF2. Para este análisis las células adenohipofisarias en cultivo fueron estimuladas con E2-BSA y FGF2 solos o en combinación por 30 min. En la figura 26 se observa que el estímulo de E2-BSA/FGF2 produjo un aumento en el porcentaje de células lactotropas/BrdU positivas que fue similar a la promovida por E2/FGF2 en el mismo periodo de tiempo.

Estos resultados sugieren la participación de los RE de membrana en la actividad mitogénica promovida por E2/FGF2, indicando la convergencia entre efectos iniciados en la membrana y acciones genómicas.

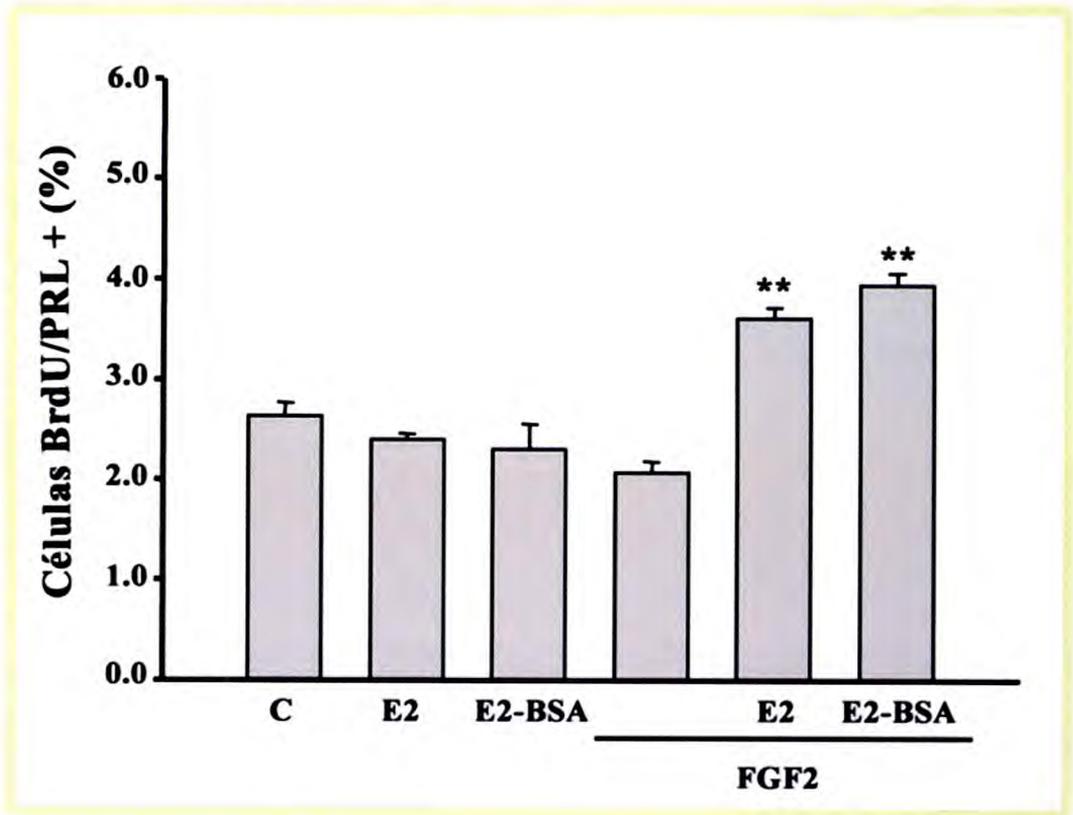


Figura 26: Participación de RE de membrana en la proliferación de lactotropas. El tratamiento por 30min con E2/FGF2 y E2-BSA/FGF2 incrementó la captación de BrdU. Los datos representan la proporción de células BrdU-PRL+, del total de células PRL positivas y se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: ** P <0,01 vs E2, E2-BSA y FGF2.

Análisis de la expresión del receptor de FGF en células lactotropas

Considerando el efecto cooperativo de E2/FGF2 observado sobre la respuesta proliferativa de células lactototropas resultó de interés analizar la expresión del RFGF en la membrana plasmática de las diferentes sub-poblaciones de lactotropas presentes en cultivo. Se utilizó la técnica de pre-inclusión de células intactas, que permite conservar la antigenicidad además de los detalles morfológicos ultraestructurales. Mediante esta metodología se evidenciaron las células positivas para el RFGF con

partículas de oro coloidal de 15nm a nivel de la membrana plasmática así como otras adheridas a membranas de vesículas endocíticas.

Luego, mediante la inmunomarcación para PRL (técnica de post-inclusión) en las mismas secciones, fue posible identificar las células lactotropas marcados con partículas de oro coloidal de 5 nm. Se observaron células lactotropas tipo I que contienen gránulos secretorios electrodensos de forma irregular (500-900 nm de diámetro) y lactotropas tipo II con gránulos esféricos (300-500 nm), ambas subpoblaciones co-expresaron el RFGF en la membrana plasmática (Figura 27).

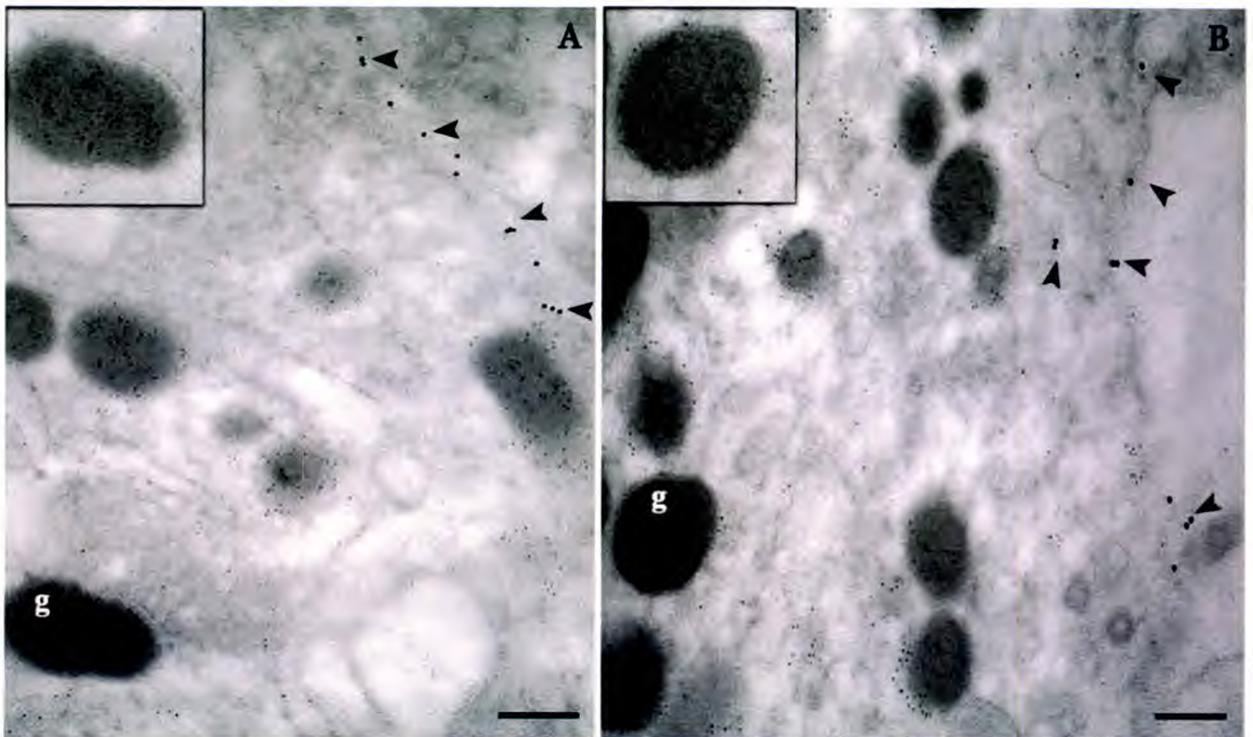


Figura 27: Inmunomarcación de células lactotropas que expresan el RFGF por microscopía electrónica. A- Porción de célula lactotropa tipo I con gránulos secretorios (g) de diámetro de 500-900nm. **B-** Porción de célula lactotropa tipo II con gránulos de secreción de diámetro de 300-500nm. Recuadro de A y B: gránulo secretorio identificado para PRL (partículas de oro de 5 nm). Ambos tipos celulares exhiben el RFGF en la membrana (partículas de oro de 15 nm, flechas). Barra = 500nm.

Evaluación de la interacción de los RE α y RFGF

En diferentes tejidos ha sido descrito que la interacción entre el E2 y factores de crecimiento (EGF, IGF-1) promueve un máximo efecto proliferativo [185, 202]. El E2 por unión al RE puede promover la proliferación modulando la actividad de factores de transcripción y la expresión de genes a través de la activación de vías de señalización iniciadas a nivel de la membrana plasmática. La activación de estas vías estaría mediada por interacción del RE con receptores de factores de crecimiento o con moléculas adaptadoras [187, 188]. Para evaluar una posible interacción física entre el RE α y el receptor de FGF (RFGF) inducida por el tratamiento de E2 y FGF2 en las células adenohipofisarias en cultivos, se llevó a cabo el ensayo de co-inmunoprecipitación. El RE α endógeno fue inmunoprecipitado en los extractos totales de células adenohipofisarias estimulados con E2 y FGF2 solos o en combinación durante 30 min. Luego se realizó la inmunodetección del RFGF por Western Blot de los inmunoprecipitados en los diferentes tratamientos.

Como se muestra en la figura 28, el tratamiento con E2 no promovió la interacción entre ambos receptores, mientras que el tratamiento con FGF2 induce una asociación significativa entre los dos receptores, que fue mayor después del estímulo con E2/FGF2. Este efecto fue evidenciado por un aumento de densidad en la banda obtenida por Western Blot.

La interacción ya descrita entre el RE α y el receptor de IGF-1 (RIGF-1) fue detectada en el lisado total de células adenohipofisarias estimuladas con E2, la cual fue utilizada como un control positivo (Figura 28C izquierda). Como control negativo, se utilizó el extracto total de la línea celular HeLa, tipo celular que no expresa el RE (Figura 28C derecha).

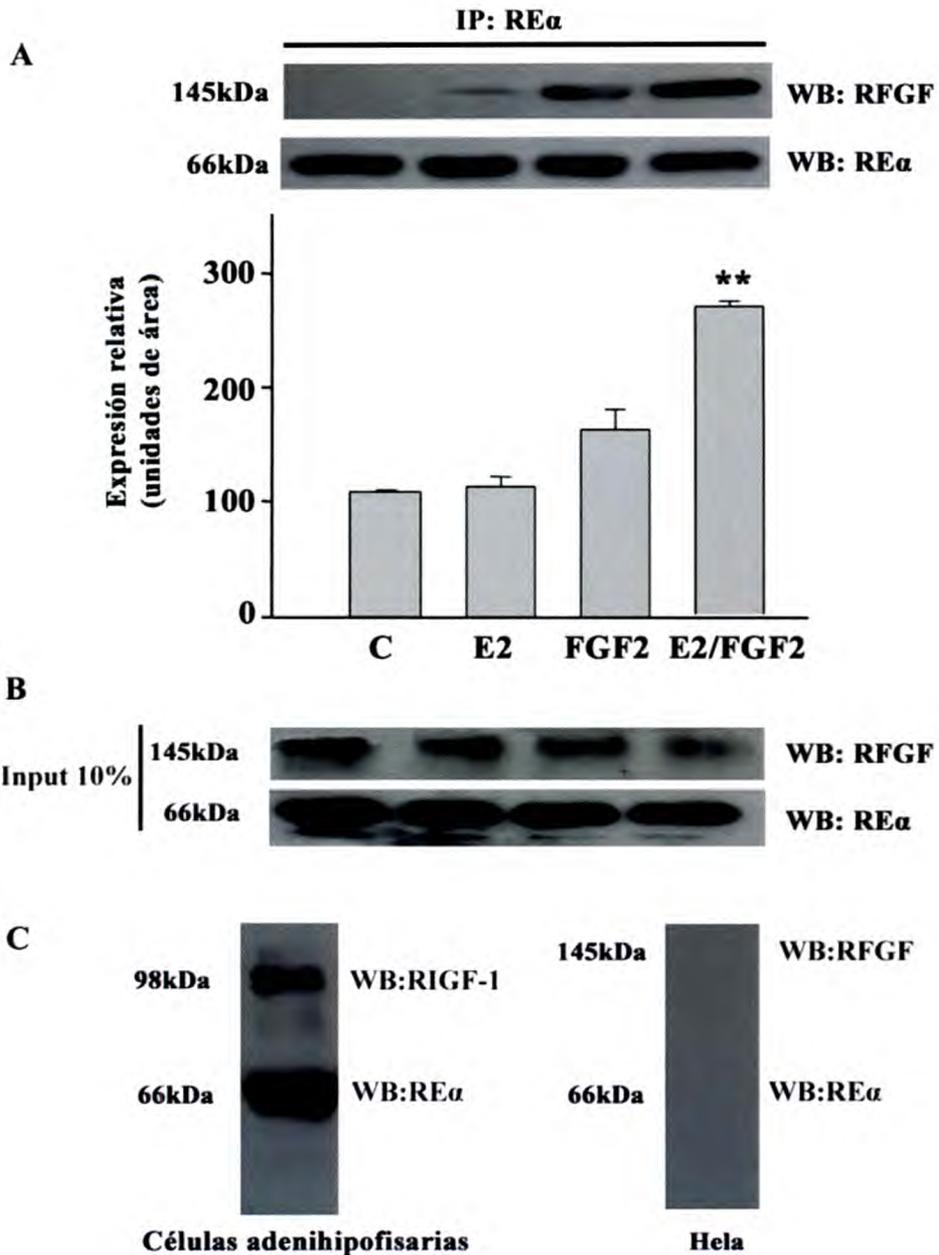


Figura 28: Interacción entre los RE α y RFGF en células adenohipofisarias. A- Extractos celulares totales de los diferentes tratamientos inmunoprecipitados (IP) con anti-RE α y posterior inmunodetección por Western Blot para el RFGF. Se muestra un panel representativo de las bandas de western blot y el gráfico expresa la expresión relativa de RFGF/ RE α . Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey ** P < 0,01 vs E2. B- Input 10%: Western Blot del extracto del lisado de células adenohipofisarias en cultivo identificando el RE α y el RFGF. C- Control positivo (izquierda): RE α interactúa con RIGF-1R en lisado de células adenohipofisarias. Control negativo (derecha): extracto total de la línea celular HeLa que no expresa el RE α .

Además, en las células adenohipofisarias incubadas con E2/FGF2, estímulo en donde se observó la mayor interacción entre los receptores por co-inmunoprecipitación, se analizó la localización de los RE α y RFGF a nivel ultraestructural. La inmunomarcación en las células tratadas con E2/FGF2 se observó la asociación entre el RE α (5nm) y el RFGF (15nm) a nivel de la membrana plasmática. La distancia observada entre las partículas de oro coloidal de los dos tamaños fue ≤ 10 nm (Figura 29).

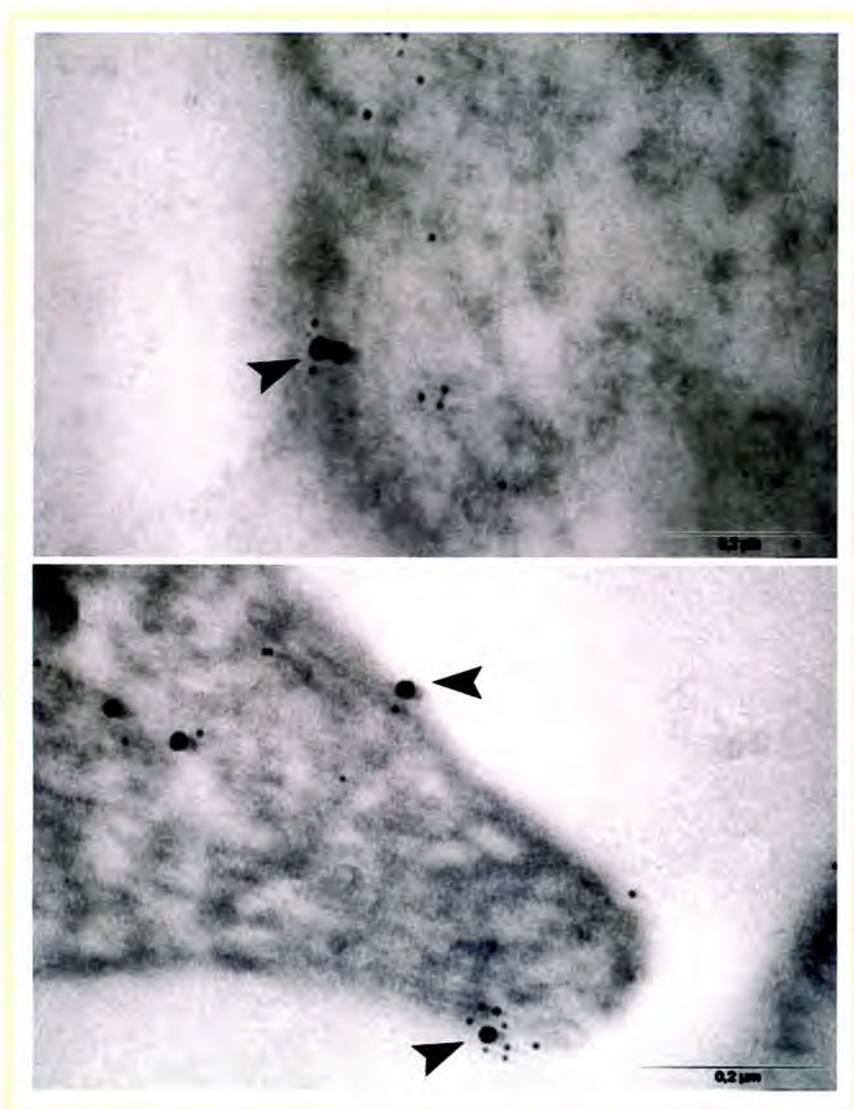


Figura 29: Doble inmunomarcación del RE α y RFGF ultraestructural de células adenohipofisarias. Imágenes representativas de porciones de células estimuladas con E2/FGF2 por 30 min e inmunomarcadas para RE α (complejo de oro 5nm) y RFGF (complejo de oro 15nm) localizadas a nivel de la membrana plasmática celular (flechas). Distancia aproximada entre partículas de oro de 15 y 5 nm ≤ 10 nm. Magnificación original: 100000x Barra = 0,2 μ m.

Análisis de la señalización intracelular involucrada en la proliferación de las células lactotropas inducida por E2 y FGF2

Para evaluar las vías de señalización iniciadas en la membrana por E2 en interacción con FGF2 implicadas en la proliferación de las células lactotropas, se analizó la activación de Akt y ERK1 / 2 fosforilada por western blot. Con este objetivo, cultivos de células adenohipofisarias fueron tratados con E2, E2-BSA o FGF2 solos o en co-incubación durante 30 min. Como se muestra en la figura 30, la expresión de Akt fosforilada no exhibió ninguna variación significativa en ninguno de los tratamientos aplicados.

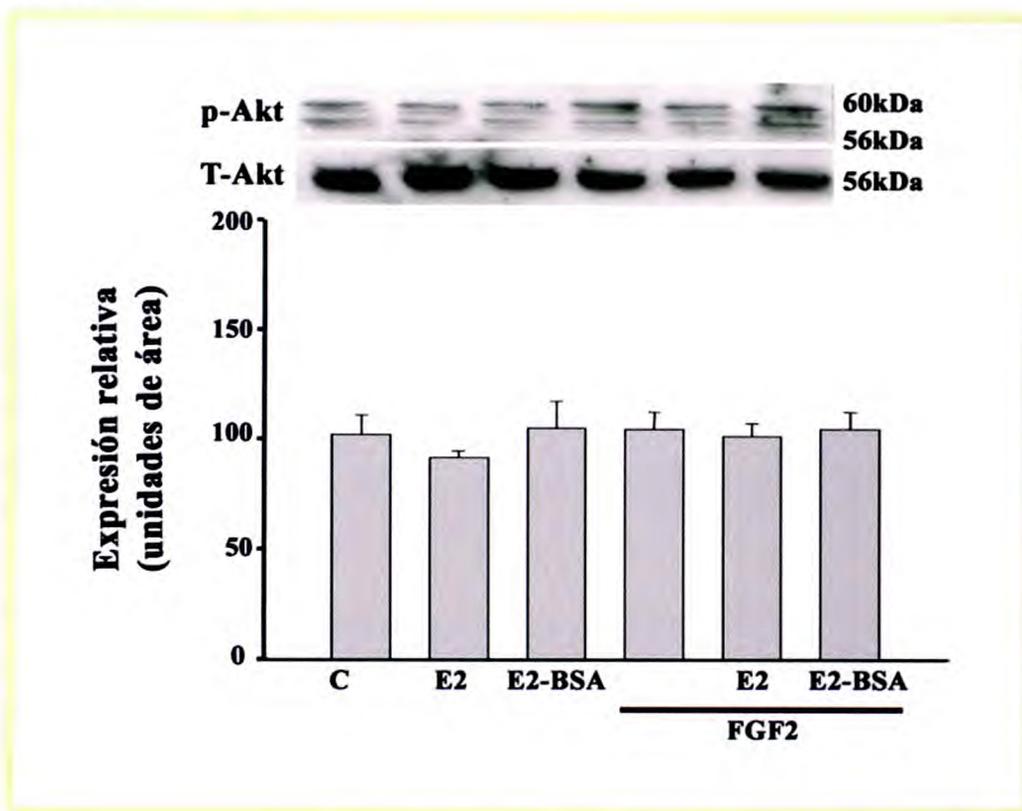


Figura 30: Expresión de Akt en cultivo de células adenohipofisarias. Panel representativo de western blot y análisis densitométrico de la relación entre la expresión de Akt fosforilada (p-Akt)/Akt total (T-Akt). Los diferentes tratamientos no modificaron la expresión de Akt fosforilada. Los datos se evaluaron por ANOVA.

Por otro lado, en el análisis de la expresión de ERK se observó un aumento significativo de ERK 1/2 fosforilada cuando los cultivos celulares fueron tratados con E2, E2-BSA o FGF2 que fue aún mayor con los estímulos combinados de E2/FGF2 o E2-BSA/FGF-2 por 30 min (Figura 31A).

Considerando que la proteína ERK 1/2 puede presentar aumentos de activación a diferentes tiempos en respuesta a diferentes estímulos, se analizó el grado de fosforilación de ERK1/2 en células adenohipofisarias estimuladas con E2, PPT o FGF2 solos o co-incubados por 4h. Un aumento significativo de la expresión de ERK1/2 fosforilada fue observado luego del estímulo con E2, PPT o FGF2. Así también, la co-incubación con E2/FGF2 o PPT/FGF2 provocaron un notable incremento de la expresión de ERK1/2 fosforilada. (Figura 31B).

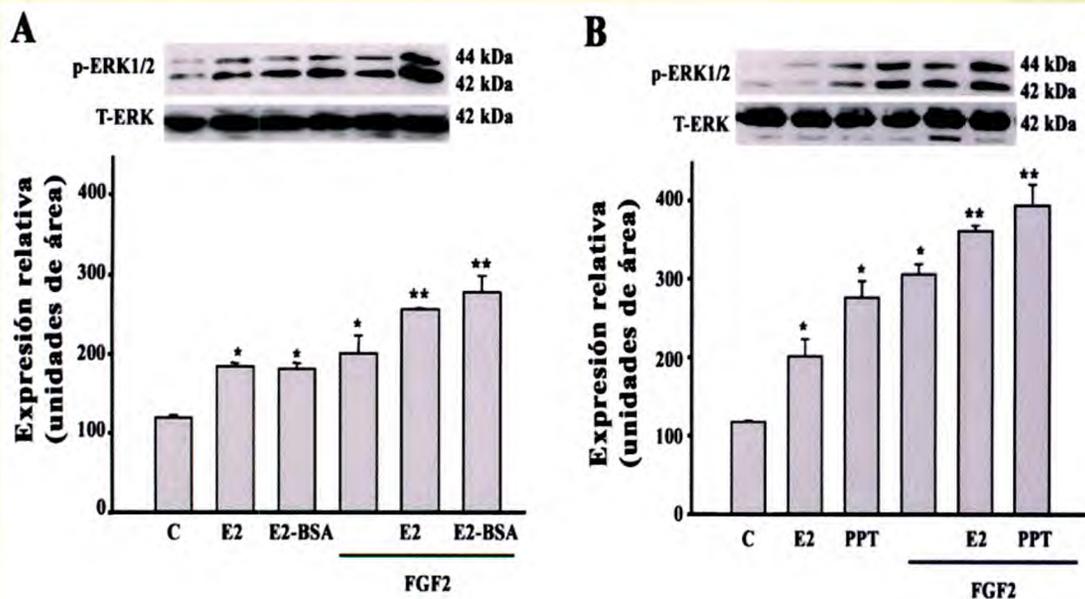


Figura 31: Expresión de ERK 1/2 en cultivo de células adenohipofisarias. Panel representativo de western blot y análisis densitométrico de la relación de la expresión de ERK fosforilada (p-ERK) / ERK total (T-ERK) a los 30 min y 4h de estímulo con los diferentes factores. La expresión de ERK 1/2 fosforilada presentó un notable incremento ante los estímulos combinados de E2-BSA/FGF2 (30 min) y PPT/FGF2 (4h). Los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: * P < 0,01 vs C, ** P < 0,01 vs E2, E2-BSA y FGF2 a los 30 min; * P < 0,01 vs C, ** P < 0,01 vs E2, PPT y FGF2 en 4h.

Finalmente, para confirmar la participación de la vía MEK/ERK1/2 sobre el efecto proliferativo inducido por el E2 y FGF2, los cultivos de células adenohipofisarias fueron pre-incubados con PD 98059 (inhibidor de MEK) antes de la adición de E2, E2-BSA, PPT o FGF2 solo o en co-incubación durante 30 min o 4 h. El efecto proliferativo inducido por E2-BSA/FGF2 y E2/FGF2 aplicado por 30 min, así como la inducida por el tratamiento por 4h con E2/FGF2 y PPT/FGF2 fue bloqueado en presencia del inhibidor (Figura 32).

En conjunto, estos resultados demuestran que la vía de MEK/ERK1/2 estaría implicada en el efecto proliferativo inducido por E2/FGF2 en las células lactotropas.

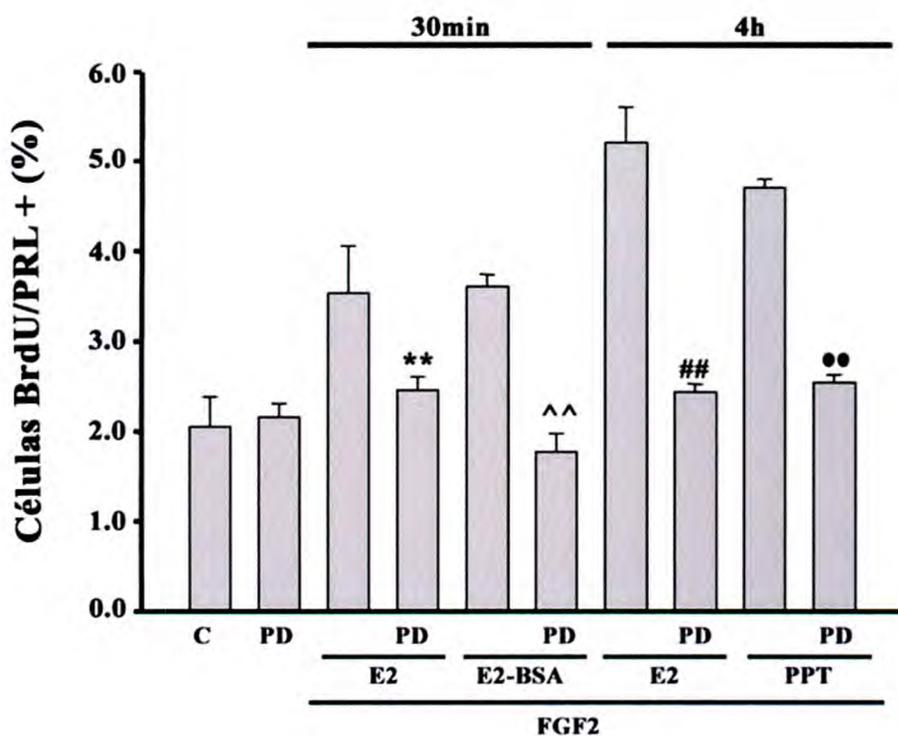


Figura 32: Efecto del inhibidor de MEK en la proliferación de células lactotropas. La captación de BrdU inducida por los factores en co-incubación fue bloqueada en presencia del inhibidor PD. Los datos representan la proporción de células BrdU-PRL + en el total de células PRL positivas y los datos se evaluaron por ANOVA seguido por el test de Tukey: ** P <0,01 vs E2/FGF2 y ^ ^ P <0,01 vs E2 -BSA/FGF2 en 30 minutos y sin PD; ## P <0,01 vs E2/FGF2 y •• P <0,01 vs PPT/FGF2 en 4h sin PD.

Discusión

El presente trabajo de tesis está centrado en el estudio de la regulación de la actividad secretoria y proliferativa de las células lactotropas, inducida por la interacción de diferentes factores estimulatorios tales como TRH, FGF2 y E2. Para alcanzar este objetivo general, se estudiaron los mecanismos de acción involucrados incluyendo, participación de receptores específicos, vías de señalización y respuesta celular, los cuales fueron abordados utilizando diversas metodologías que permitieron realizar un análisis integral de la modulación de la actividad funcional de la población de lactotropas.

Todas las experiencias fueron realizadas *in vitro*, para evaluar las acciones e interacciones de los factores antes mencionados, evitando los efectos que *in vivo* ejercen numerosos agentes, principalmente hipotalámicos, que a través del sistema porta-hipofisario regulan la actividad de la glándula. La población de células lactotropas, tipo celular de interés en nuestro estudio, presenta la mayor tasa proliferativa en los cultivos primarios adenohipofisarios debido a la ausencia de los controles inhibitorios ejercidos *in vivo*, representando aproximadamente el 70% del total de las células del cultivo.

De acuerdo a lo descrito en el capítulo de Introducción, son numerosos los factores que regulan la actividad metabólica de las células lactotropas, incluyendo factores hipotalámicos, factores producidos en la misma hipófisis y hormonas liberadas por glándulas endocrinas periféricas [3, 6, 46]. En el presente trabajo se seleccionaron TRH, una neurohormona considerada como el principal factor fisiológico que estimula la secreción de PRL; FGF2, un potente mitógeno abundante en la adenohipófisis; y E2, principal hormona periférica que regula la actividad funcional de las células lactotropas.

1) Efecto del estradiol sobre la actividad secretoria de células lactotropas inducida por TRH

Es ampliamente conocido que el E2 actúa como un importante modulador de las señales neuroendocrinas que clásicamente controlan la liberación de prolactina por un mecanismo dependiente del proceso de transcripción [3, 28]. Sin embargo, la participación de los diferentes "pools" de RE, citoplasmáticos/nucleares y de membrana, en estos efectos no ha sido completamente dilucidado. De allí surge el interés en analizar vías de señalización alternativas, diferentes a las clásicamente descritas, que involucran efectos rápidos de esta hormona sobre la secreción de prolactina. Para ello, en la primera parte de este trabajo, analizamos la participación del RE de membrana en el efecto modulador del E2 sobre la secreción de PRL inducida por TRH.

Nuestros resultados mostraron que la incubación de las células adenohipofisarias con E2, E2-BSA o TRH durante 30 min, incrementó diferencialmente la secreción de las células lactotropas, alcanzando los niveles más altos después del estímulo con E2-BSA/TRH. El uso de E2-BSA fue una herramienta útil para analizar los efectos iniciados en la superficie celular, debido a que la membrana plasmática es impermeable a estos esteroides conjugados. Por este motivo, no pueden acceder a los RE citoplasmáticos/nucleares, activando únicamente receptores de membrana [134]. El efecto obtenido con E2 solo o conjugado, a los 30 min de estímulo, sugiere fuertemente que los mismos serían mediados por la unión del E2 a los RE localizados en la membrana celular. Además, debido al corto periodo de tiempo de estimulación, se puede inferir que tanto E2 como E2-BSA estimulan la liberación de PRL pre-existente almacenada en gránulos secretorios, sin modificar la síntesis de la hormona. En un trabajo previo se ha descrito que los efectos del E2 sobre la liberación rápida de PRL serían mediados por los RE asociados a la membrana, independientemente de la transcripción del ADN, sin involucrar los RE nucleares [172].

La cuantificación de PRL liberada al medio de cultivo por efecto de E2-BSA fue significativamente mayor que la promovida por el E2 libre. Esto podría ser explicado por la presencia sostenida de E2 conjugado a BSA en la membrana plasmática, donde

continúa estimulando los RE de membrana. Mientras que, el E2 libre luego de activar los RE de membrana, difunde rápidamente dentro de la célula activando además los RE intracelulares. Esta interpretación está fundamentada en trabajos previos de nuestro grupo [146] y de otros investigadores quienes utilizaron las dos líneas tumorales de células somatolactotróficas GH3 con baja y alta expresión de los RE α de membrana [173]. En este último trabajo, los niveles de secreción de PRL fueron altamente dependientes de la presencia de los RE de membrana, obteniendo mayor respuesta en las células con mayores niveles de los mismos. Alternativamente, se sugirió que debido a que los conjugados de E2 pueden contener más de una molécula de E2, este complejo puede unirse a varios RE de membrana cercanos amplificando así la señal intracelular.

Los niveles de PRL liberada en respuesta a la estimulación con TRH y E2/TRH fueron similares. Sin embargo, el pre-tratamiento con ICI-182780 redujo la liberación de PRL, sugiriendo la participación de los RE en el efecto del E2 sobre la secreción de PRL promovida por E2/TRH. Una posible explicación para estos resultados podría ser que la estimulación rápida de los RE de membrana inducida por el E2 podría quedar encubierta por el potente estímulo que TRH ejerce sobre la secreción PRL. Para confirmar la contribución de los RE de membrana en el efecto inducido por E2-BSA/TRH, se realizó el pre-tratamiento con ICI-182780, observándose una reducción significativa de la secreción de PRL.

Otro punto de interés en este trabajo de tesis el estudio sobre las vías de señalización involucradas en los efectos regulatorios del E2 sobre la secreción de PRL inducida por TRH. Para ello, se analizó la participación de las vías PI3K/Akt y MEK/ERK 1/2. Nuestros resultados mostraron que el pre-tratamiento con los inhibidores de PI3K no modificaron la secreción de PRL estimulada por E2, sugiriendo la contribución de otras cascadas de señalización intracelular en este efecto. Al analizar la vía MEK/ERK 1/2, se observó que la activación de la misma media en parte el aumento de la liberación de PRL inducida por esta hormona esteroidea. Respecto a esta evidencia, se ha propuesto la participación de diferentes cascadas de señalización que participan en la liberación de PRL tales como la activación de AMPc [203], la fosforilación de ERK

[204] y/o el aumento de calcio intracelular [173, 205]. Así también, en un trabajo anterior, demostrando la activación de la vía de señalización PKC/ERK1/2 que a través del RE α de membrana estimula la liberación de PRL en células lactotropas normales [146].

En referencia a la respuesta secretoria de las lactotropas inducida por E2-BSA, se observó que LY-294002 y wortmanina inhibieron parcialmente la PRL liberada al medio de cultivo, lo que indicaría la participación de PI3K en este efecto mediado por los RE de membrana. La activación de esta quinasa fue confirmada por la translocación de subunidad p85 α desde el citoplasma hacia la membrana plasmática en células lactotropas lo cual es indicativo de activación de PI3K. Considerando los resultados obtenidos sobre la participación de la vía PI3K mediando la respuesta a E2 y E2-BSA, se infiere que una estimulación sostenida de los RE de membrana inducida por el esteroide conjugado podría ser necesaria para la activación de PI3K en las condiciones experimentales utilizadas en este trabajo. Por otro lado, los efectos observados con el inhibidor de MEK sobre la secreción de PRL inducida por E2-BSA, fueron similares a los descritos con LY-294002 y wortmanina, lo cual permite sugerir una cooperación entre ambas vías PI3K/Akt y MEK/ERK 1/2. Ha sido descrito que estas dos vías de señalización estarían involucradas en la liberación de PRL inducida por IGF-1 en células somatolactotróficas GH4 y además, un "crosstalk" entre PI3K/Akt y MEK/ERK 1/2 mediando la secreción de PRL, ha sido observado en esta línea tumoral. Los resultados obtenidos muestran que IGF-1 induce un aumento de la activación de la vía Rap1/Raf1/ERK 1/2 y de la secreción de PRL, siendo ambos efectos bloqueados por la inhibición farmacológica de la vía PI3K/Akt [69]. A diferencia de estos resultados, en nuestras condiciones experimentales, la aplicación del inhibidor de PI3K no modificó la expresión de ERK 1/2 fosforilada inducida por E2/TRH o E2-BSA/TRH, indicando que las vías PI3K/Akt y MEK/ERK 1/2 actuarían de manera paralela, sin la participación de mediadores en común, regulando así la liberación rápida de PRL.

Un hallazgo interesante obtenido en este trabajo fue la máxima respuesta secretoria de PRL promovida por E2-BSA/TRH, siendo este efecto totalmente bloqueado por la pre-incubación con los inhibidores LY-294002 y wortmanina. Esto

sugiere que la activación de los RE de membrana podría potenciar la acción de TRH sobre la liberación de PRL principalmente a través de la vía PI3K. Otros ejemplos de amplificación de diferentes respuestas celulares mediadas por receptores de membrana con participación de la vía PI3K, han sido descritas en neuronas estimuladas con leptinas, las que fueron capaces de incrementar el efecto inducido por TRH [174, 206].

Continuando con el análisis de la vía PI3K, se evaluó la contribución de la fosforilación de Akt, principal quinasa efectora “*downstream*”. La expresión de Akt fosforilada observada en células tratadas con E2, E2-BSA, TRH o E2/TRH no tuvo variaciones comparada con la expresión basal obtenida en células controles. Sin embargo, un notable aumento de la fosforilación de Akt fue inducido por E2-BSA/TRH. Este hallazgo conjuntamente con la translocación de la subunidad p85 α a la membrana, refuerza la hipótesis sobre el grado de participación de la vía PI3K/Akt en el efecto inducido por E2-BSA/TRH, promoviendo finalmente los mayores niveles de liberación de PRL. Trabajo previos han informado que E2 en interacción con IGF-1 fue capaz de aumentar la fosforilación de Akt en células de diferentes zonas del sistema nervioso central, incluyendo hipocampo, corteza cerebral, hipotálamo y cerebelo [207].

Resumiendo lo descrito en la primera parte de este trabajo de tesis, se demuestra por primera vez la participación del RE de membrana en el efecto potenciador ejercido por E2 sobre la liberación rápida de PRL inducida por TRH. Este efecto regulador del E2 sería mediado por la activación de PI3K/Akt, a través de una señalización convergente involucrada en el aumento de la actividad secretoria de las células lactotropas. Una posible extrapolación de nuestros resultados, puede ser realizada en diferentes condiciones fisiológicas tales como las fases del ciclo estral, embarazo y lactancia activa, en las que se describen fluctuaciones significativas en los niveles de estrógeno, induciendo cambios dinámicos en la actividad secretoria de células adenohipofisarias. En estos estadios reproductivos es posible proponer una importante contribución de los RE de membrana y posterior activación de la vía PI3K en los efectos de E2, tal como se observó en nuestras condiciones experimentales

luego de la incubación con E2-BSA/TRH. Este estímulo indujo los mayores niveles de PRL, efecto mediado por RE de membrana. Es posible sugerir que la vía PI3K/Akt es activada por un efecto cooperativo de los RE de membrana con los receptores de TRH, sin descartar la participación de otras proteínas intracelulares localizadas en cercanía de la membrana celular. Con respecto a esto, se ha reportado que la activación de mediadores de las diferentes cascadas de señalización sería llevada a cabo en cooperación con los RE y otras moléculas en las que se encuentran la familia de proteínas G con actividad GTPasa tales como Gαq y Gas [142, 208], formando un complejo multimolecular que varía su composición dependiendo del tipo de celular [4].

Como se mencionó en introducción, los efectos del E2 son muy variados en distintos tejidos y estarían mediados por diferentes “pools” subcelulares del RE. La regulación de los mismos permitiría modificar el número de receptores en los diferentes compartimientos intracelulares y finalmente activar distintas vías de señalización, promoviendo así acciones rápidas iniciadas en la membrana y acciones genómicas [209-211]. Estos antecedentes nos motivaron a analizar los cambios en la expresión del REα en la membrana plasmática de células adenohipofisarias bajo los diferentes estímulos. Nuestros resultados mostraron un aumento en la expresión del REα en esta localización subcelular, específicamente en la superficie de la población de lactotropas estimuladas con E2 o E2/TRH. El rápido aumento en la intensidad del REα de membrana detectado en este estudio (30 min de estimulación) indicaría que E2 estimula la translocación del RE hacia la membrana de las células lactotropas siendo poco probable la inducción de efectos transcripcionales tales como síntesis *de novo* del RE. Estudios previos de nuestro grupo y de otros investigadores avalan nuestros hallazgos siendo demostrada la participación del REα de membrana en los efectos rápidos del E2 sobre diferentes respuestas de las lactotropas incluyendo la actividad proliferativa, antiproliferativa y muerte celular [29, 146, 184]. Así también, en diferentes tipos celulares tales como las células de Sertoli [212], células hipotalámicas [213], neuronas [214] y astrocitos [215], se demostró que E2 regula la translocación del RE intracelular hacia la membrana plasmática. Cabe destacar que este mecanismo regulatorio ejercido por E2 sobre sus RE, fue descrito por primera vez en nuestro laboratorio en células adenohipofisarias [106] y específicamente en lactotropas [216].

Con respecto a los resultados obtenidos sobre la expresión del RE α en la superficie de las lactotropas en respuesta al estímulo con E2 o E2-BSA, la misma solo fue modificada por E2. Esto nos permite sugerir que la hormona libre actuaría sobre los RE intracelulares estimulando su movilización a la membrana de esta población de células adenohipofisarias. Un aspecto a considerar es que la estimulación crónica de un receptor lleva a su internalización como un mecanismo regulatorio para atenuar una excesiva respuesta celular [217]. Con estos antecedentes, es posible especular que la ausencia de respuesta a E2-BSA reflejada en la expresión del RE de membrana, podría ser indicativo de la internalización del RE de superficie, promoviendo así un equilibrio dinámico entre los “pools” del RE. En sistema nervioso central se ha sugerido que E2-BSA unido a los RE se internalizan y transportan a los endosomas para el reciclaje o la degradación mediada por β -arrestina [218].

Un aspecto interesante que se debe mencionar es la baja expresión del RE α en la superficie de células lactotropas, la cual puede ser regulada por E2 incrementando el “pool” del RE de membrana. Estos resultados concuerdan con publicaciones de otros autores que muestran que aproximadamente el 5-10% del total del RE se localizada en la membrana plasmática de diferentes tipos celulares, incluyendo los subtipos α y β [129, 219, 220]. Resultados previos de nuestro laboratorio describieron la presencia del RE α y ausencia del RE β en la membrana de lactotropas [146], a partir de lo cual se podría postular que el subtipo α sería el principal mediador de las señales esteroideas iniciadas en la membrana plasmática de células lactotropas. Otros estudios han propuesto la presencia de las variantes de ER α 39 y TERP-1 que carecen tanto del dominio AF-1 y AF-2, en la membrana plasmática de células adenohipofisarias, las cuales mediarían los efectos rápidos del estradiol en esta glándula [103, 184]. Estas evidencias denotan que la variabilidad de subtipos de RE localizados en diferentes tipos celulares mediaría un espectro diverso de acciones biológicas ejercidas por E2, siendo aún motivo de debate en numerosas investigaciones.

El mecanismo de translocación del RE α a la membrana plasmática es una temática de relevancia actual. Uno de los requerimientos para la localización del RE en membrana es la existencia de un segmento hidrofóbico que forme parte de la

molécula. Con respecto a esto, se han descrito modificaciones post-traduccionales del RE, entre las que se incluyen la adición de un ácido graso (S-acilación, más comúnmente denominada como palmitoilación) en la cisteína 447 de la región de unión al ligando de los receptores de esteroides gonadales [221-223]. El agregado de residuos lipídicos aumentaría la hidrofobicidad del RE y favorecería la localización de los receptores esteroideos en la membrana celular. La S-acilación del receptor promueve la interacción física del RE α con caveolina-1 [224] y facilita el desplazamiento del RE a las caveolas de la membrana plasmática [225, 226]. Se ha sugerido que la naturaleza reversible de la palmitoilación proporcionaría un mecanismo potencial para la movilización de las proteínas entre los diferentes compartimentos intracelulares [227]. Por lo tanto, el agregado del residuo palmitato sería un paso crítico para los efectos rápidos inducidos por el E2, ya que posibilitaría el tráfico de los RE hacia la membrana plasmática, siendo aún desconocido si este mecanismo ocurre en células adenohipofisarias. Recientemente, se han identificado las enzimas DHHC-7 y -21 como palmitoiltransferasas (PATs) que catalizan la palmitoilación de los RE endógenos en células tumorales de mama, ovario y próstata; convirtiéndolas en posibles blancos para inhibir la localización de los RE en la membrana [228]. Además, se ha sugerido que la proteína Hsp27, quien estabiliza al monómero del RE manteniéndolo en el citosol, regularía el proceso de palmitoilación, cambiando la conformación del receptor y favoreciendo así la unión de las PATs [229]. Considerando estos antecedentes se puede postular que en nuestras condiciones experimentales, la presencia de los RE en la membrana plasmática de lactotropas, podría facilitarse por modificaciones post-traduccionales del RE que incluyen el agregado de residuos lipídicos. Este mecanismo contribuiría a la regulación de los diferentes "pools" del RE α , su movilización subcelular y consecuentemente la sensibilidad en la respuesta de las células lactotropas ante la demanda de PRL en distintas condiciones fisiológicas.

En resumen, nuestros resultados muestran que el estradiol puede actuar como un modulador de la respuesta secretoria de las células lactotropas inducida por TRH, a través de los RE de membrana, con la contribución de la vía PI3K/Akt como principal involucrada (Figura 33). Es posible que éste sea uno de los mecanismos implicados en

la variaciones de los niveles de PRL observados en diferentes estados reproductivos, tales como el ciclo estral, embarazo y lactancia, estrechamente asociados a fluctuaciones en los niveles de estrógeno y TRH. Los hallazgos obtenidos en la primera parte de este trabajo de tesis, aportan nuevos conocimientos sobre los mecanismos que subyacen en las acciones no genómicas del E2 regulando la actividad secretoria de células adenohipofisarias.

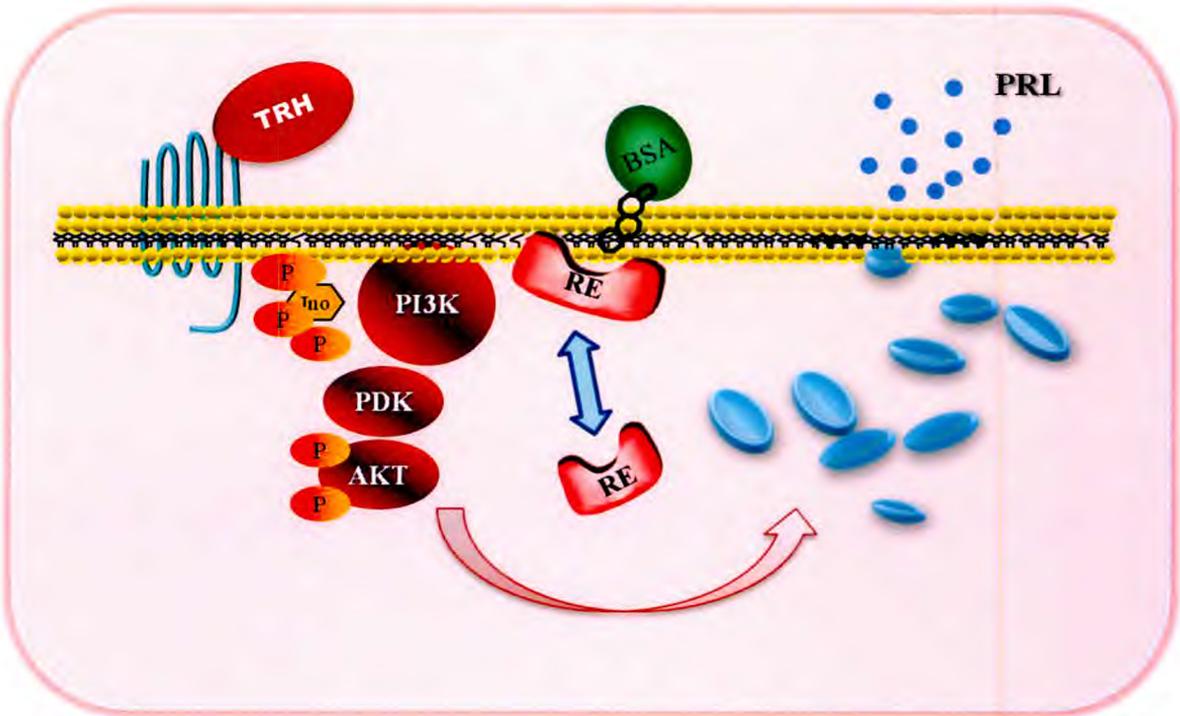


Figura 33: Representación esquemática del efecto modulador de E2 sobre la respuesta secretora de las células lactotropas inducida por TRH a través de los RE de membrana, con la participación de la vía PI3K/Akt.

2) Efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas

Las distintas poblaciones celulares que componen la adenohipófisis están sometidas a ajustes dinámicos para responder adecuadamente a los requerimientos hormonales en diferentes estados de la vida adulta como la pubertad, ciclo estral, preñez y lactancia [230]. En condiciones basales, la renovación diaria de las células de la glándula hipofisaria en adultos es de aproximadamente 1,5% [175], mientras que la actividad mitótica aumenta aproximadamente al doble en estados reproductivos de alta demanda hormonal [231]. Trabajos realizados en nuestro laboratorio y por otros investigadores han descrito cambios morfológicos y morfométricos que manifiestan las células adenohipofisarias en respuesta a diferentes estímulos tales como neuropéptidos, factores de crecimiento y hormonas periféricas tanto en condiciones fisiológicas como patológicas [6, 18, 19, 147, 177-180].

Dentro de los factores tróficos de la glándula hipofisaria, los estrógenos son considerados potentes estimuladores del crecimiento induciendo proliferación de células adenohipofisarias, principalmente de lactotropas, lo que se correlaciona además con una marcada hiperprolactinemia [232]. La actividad mitogénica inducida por estrógenos en condiciones fisiológicas, sería transitoria y no impulsaría un crecimiento persistente de la glándula hipofisaria [233]. Además, se ha descrito que el efecto proliferativo del E2 sería mediado por factores de crecimiento y citoquinas producidos localmente en la adenohipófisis [176], actuando de manera indirecta sobre la actividad proliferativa de las células lactotropas [6, 234]. Como se mencionó en el capítulo de Introducción, los factores de crecimiento sintetizados en adenohipófisis, FGF2, TGF α , TGF β 3, IGF-1 y EGF, están involucrados en el aumento de la proliferación de las lactotropas mientras que TGF β 1 ejerce efectos inhibitorios sobre la misma. El E2 actúa modulando en forma positiva o negativa las acciones de los factores de crecimiento, regulando la expresión de genes asociados al ciclo celular, controlando así la actividad mitogénica de la población de lactotropas.

Para contribuir al conocimiento sobre la regulación del tamaño de la población de lactotropas, en la segunda parte de este trabajo de tesis nos propusimos establecer si E2 en interacción con FGF2 están implicados en la proliferación de las lactotropas. Se

observó que la actividad mitogénica de estas células no fue modificada con la incubación por 4 h con E2 o FGF2 solos en medios libres de suero. Sin embargo, el tratamiento combinado con E2 y FGF2 en este período de tiempo dio como resultado un aumento de la actividad mitogénica de las lactotropas, sugiriendo que ambos factores actúan de manera cooperativa promoviendo la proliferación celular. Los resultados reportados en la literatura sobre los efectos proliferativos de E2 y factores de crecimiento varían dependiendo del protocolo experimental aplicado. En términos generales, la respuesta proliferativa de las células lactotropas *in vitro* son descriptas después de tratamientos prolongados con estradiol y factores de crecimiento. Ha sido informado que la incubación por 96h con FGF2 (10ng/ml) y E2 (10nM) en medio con suero, estimula la proliferación de células lactotropas en cultivo provenientes de ratas Fischer-344 ovariectomizadas previamente sensibilizadas con E2 [8]. Por otro lado, una acción cooperativa entre E2 y EGF fue observada recién a las 18-24h de estímulo con ambos factores en la línea tumoral hipofisaria GH3, resultando en un aumento de la proliferación celular que fue mayor a la alcanzada por los ligandos solos [53]. Cabe destacar que a diferencia de los resultados obtenidos por otros autores, en este estudio el estímulo con E2/FGF2 produjo un aumento significativo de la proliferación de lactotropas luego de 4 h de incubación en condiciones libre de suero.

Otro punto de interés fue investigar el mecanismo por el cual la co-incubación con E2/FGF2 indujo un efecto mitogénico sobre las células lactotropas. En primer lugar, la participación de los RE en el efecto promovido por el E2/FGF2, fue corroborado utilizando el antagonista específico del RE, quien revirtió completamente la proliferación de lactotropas inducida con la co-incubación de ambos. A continuación, se evaluó el subtipo de RE involucrado en el efecto proliferativo, utilizando antagonistas específicos del RE α y β , PPT y DPN, respectivamente. Nuestros resultados evidenciaron que la proliferación de células lactotropas fue incrementada con el estímulo con PPT co-incubado con FGF2 induciendo el mismo efecto observado con E2/FGF2. En contraste, la actividad mitogénica basal de este tipo celular no fue modificada por el tratamiento combinado, DPN/FGF2. En conjunto estos hallazgos avalan la participación del RE α mediando el efecto mitogénico cooperativo de E2/FGF2 en la población de lactotropas. Teniendo en cuenta que ambos subtipos de RE (α y β)

son co-expresados en esta población celular [93], el RE α sería el principal subtipo de RE que media el efecto de E2 sobre la población de células lactotropas ejerciendo diferentes acciones sobre la actividad secretoria y proliferativa incluyendo tanto efectos mitogénicos como antimitogénicos [70, 146, 171, 184, 216]. Con respecto al RE β es muy poco lo que se conoce sobre sus acciones, siendo sugerido que una de las funciones del RE β sería regular la actividad del RE α , actuando como un modulador negativo en diferentes tipos celulares [92, 235-237]. El RE β estaría relacionado con la inhibición de la proliferación celular, regulando negativamente genes que promueven la inducción del ciclo celular, previniendo así el crecimiento tumoral en diversos tejidos [109-113]. De esta manera, la diversidad de efectos biológicos del E2 podría resultar, al menos en parte, del balance de la expresión de los diferentes subtipos de RE (α y β) en las diferentes poblaciones celulares adenohipofisarias.

Siguiendo con el análisis de la participación de los diferentes “pools” de RE, otro objetivo fue establecer la contribución de los RE de membrana mediando la proliferación de las lactotropas inducida por E2/FGF2, para lo cual se utilizó el complejo del esteroide unido a BSA. Se observó que el número de células lactotropas en mitosis aumentó dos veces con el estímulo con E2-BSA/FGF2 durante 30 min comparada con la proliferación basal. Este resultado sugiere que la proliferación celular observada es mediada, al menos en parte, por señales de esteroides iniciadas en membrana. Además, la contribución del “pool” de RE citoplasmático/nuclear fue evidenciada en el mayor índice de incorporación de BrdU observado después de la incubación con E2/FGF2 por 4 h comparada con la inducida por E2/FGF2 durante 30 min. Por lo tanto, estos resultados reflejan la integración de las acciones del E2 mediadas por los diferentes “pools” de RE en el efecto combinado de la hormona esteroidea y FGF2 sobre la proliferación lactotropas. Una posible extrapolación de estos resultados puede ser relacionada con lo que ocurre en el ciclo estral, en donde se describe un aumento de la actividad mitogénica de lactotropas en el estro que es precedida por un pico de E2 en la tarde del proestro [231, 238]. Este evento se correlaciona con un aumento en la expresión del RE α de membrana en esta fase del ciclo [103]. La proliferación de la población de células lactotropas observada en el estro, es de aproximadamente un 2,5%, posiblemente en respuesta a factores de

crecimiento intrahipofisarios los cuales en general son sensibilizados por E2 [20, 180]. En conjunto estas evidencias podrían estar asociadas con los máximos niveles de secreción de PRL observados en la fase del proestro del ciclo estral [5].

Los mecanismos de acción genómicos y no genómicos del E2 pueden ser complementarios y presentar interacciones entre ellos. El E2 al unirse a los RE de membrana activaría cascadas de señalización rápidas, que terminarían impactando sobre la transcripción nuclear, siendo esto descrito en células de neuroblastoma [183]. En células de cáncer de mama RE positivas, una importante proporción de esta población expresa el RE de membrana, lo que tiene un impacto adicional en el aumento de la tasa proliferativa [239]. En contraposición a la participación de los RE de membrana en los efectos proliferativos inducidos por el E2 junto a factores de crecimiento, se ha descrito que este “*pool*” de RE también está involucrado en el efecto antimitogénico del E2 regulando la proliferación inducida por insulina en células lactotropas [146].

La interacción entre los mecanismos de señalización del E2 con factores de crecimiento puede ocurrir a diferentes niveles de las vías involucradas [188, 240]. Una estrecha relación entre el mecanismo de acción de factores de crecimiento y E2 fue reportada en SNC, observándose un aumento transitorio de la asociación del receptor de IGF-1 (RIGF-1) y RE α después de la administración de E2 en cerebro [241]. Esto sugiere que la interacción entre el RIGF-1/RE α es uno de los mecanismos implicados en la señalización de la hormona esteroidea y el factor de crecimiento [242]. Por otro lado, la presencia de otros receptores esteroideos diferentes de los RE clásicos α y β han sido sugeridos como receptores de membrana que median los efectos del E2. Se ha descrito que la activación del receptor GPER por E2, induce la interacción del mismo con moléculas de la superficie celular entre los que se encuentran los receptores de la familia tirosina quinasa de los factores de crecimiento [243]. La asociación entre ambos receptores ha sido implicada en los mecanismos de señalización involucrados en el crecimiento tumoral, angiogénesis y metástasis [244]. Varios autores han reportado que la acción estimuladora de factores de crecimiento tales como EGF e IGF-1 es ejercida en cooperación con la activación de los receptores

GPER [245-248]. Además, la activación de los receptores de EGF e IGF-1 induce proliferación celular en diferentes tejidos a través de mecanismos que incluyen la interacción con GPER como así también con otros mediadores de las vías de señalización [249]. Por otra parte una cooperación entre GPER y RE α fue sugerida en células que co-expresan ambos receptores en las cuales el estímulo estrogénico induce interacción física entre ambos receptores [247].

Teniendo en cuenta estos antecedentes, otro de los objetivos de este trabajo, fue evaluar la posible asociación del RFGF y RE α en células adenohipofisarias promovida por E2/FGF2, estímulo que indujo la mayor respuesta proliferativa de las células lactotropas [250]. Un hallazgo importante fue observar en células adenohipofisarias la asociación entre el RFGF y el RE α inducida por el tratamiento combinado con E2/FGF2. Es posible que la interacción observada entre RFGF y el RE α sea mediada por otras proteínas que se unen a ambos receptores, dando lugar a la formación de un complejo multiproteico, de acuerdo a datos publicados por otros autores. Se ha descrito la asociación del RE α con proteínas tales como NMAR, striatin o p130Cas promoviendo la unión, ligando-dependiente, del RE α con Src quien se asocia directamente con los receptores de factores de crecimiento y moléculas de señalización [251]. Debido a que los RE no tienen actividad quinasa, otras moléculas como la quinasa Src deben mediar la activación de vías de señalización citoplasmáticas inducidas por la unión del E2 al RE. Estas moléculas son conocidas como proteínas de andamiaje que actúan mediando la activación de las vías MAPK/MEK/ERK 1/2 o PI3K/AKT [252]. Relacionado a esto, los esteroides y factores de crecimiento pueden estimular la proliferación de diferentes tipos celulares a través de la activación de intermediarios de señalización comunes ubicados "downstream" [253]. Ha sido reportado un "crosstalk" entre señales inducidas por E2 e IGF-1 que median la proliferación celular e inducen resistencia a la apoptosis en células de cáncer de mama [254, 255]. Por otro lado, se ha propuesto que el estímulo estrogénico activa metaloproteinasas induciendo liberación hacia la superficie celular de un activador de los receptores de EGF, activando finalmente la vía MAPK por transactivación del receptor de EGF [245].

En nuestro laboratorio se ha descrito que la vía MEK/ERK1/2 media la proliferación inducida por diferentes factores estimulatorios tanto en células lactotropas provenientes de hipófisis normales como hiperplásicas [61, 145, 256, 257]. Además, considerando la participación de la vía PI3K/Akt en la regulación de la actividad metabólica de células lactotropas demostrada en la primera parte de este trabajo [216], nos propusimos analizar el mecanismo de señalización involucrado en el aumento de la actividad mitogénica inducida por E2/FGF2. Con este objetivo se evaluó la fosforilación de Akt y ERK1/2 que son los mediadores finales de las vías PI3K/Akt y MEK/ERK1/2. En nuestras condiciones experimentales, la expresión de Akt fosforilada no mostró variaciones significativas luego de los tratamientos con E2, E2-BSA o FGF2 solos o en co-incubación por 30 min. Mientras que un aumento significativo en la expresión de la fosforilación de ERK1/2 fue observada después del estímulo con los ligandos solos, siendo este aumento más notable luego de los tratamientos combinados de la hormona esteroidea y FGF2. Este resultado fue coincidente con la mayor actividad proliferativa cuantificada en las lactotropas. La participación de la vía MEK/ERK 1/2 fue confirmada con la pre-incubación con el inhibidor de MEK, el cual bloqueó totalmente el efecto mitogénico ejercido por la combinación de E2/FGF2 y PPT/FGF2. Estos resultados sugieren la convergencia MEK/ERK1/2 como una vía común inducida a partir de la activación de los RFGF y RE α de membrana con la contribución del "pool" del RE α intracelular, desencadenando el aumento de la actividad mitogénica en células lactotropas. Además, es posible inferir que la interacción observada entre los receptores del E2 y FGF2 estaría estrechamente asociada a la activación sinérgica de la vía MEK/ERK 1/2 observada en células tratadas con E2/FGF2. Este mecanismo molecular podría estar participando en el desarrollo de prolactinomas experimentales inducidos por estrógenos donde previamente hemos demostrado un aumento significativo de la expresión de FGF2 directamente relacionado con el grado de estimulación estrogénica [190].

En resumen, los resultados de este estudio proporcionan nuevas evidencias acerca de un efecto cooperativo ejercido por E2 y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas, principalmente a través de una vía de señalización común

MEK/ERK 1/2 iniciada en la membrana plasmática, regulando así la población de lactotropas (Figura 34) y contribuyendo a la plasticidad adenohipofisaria.

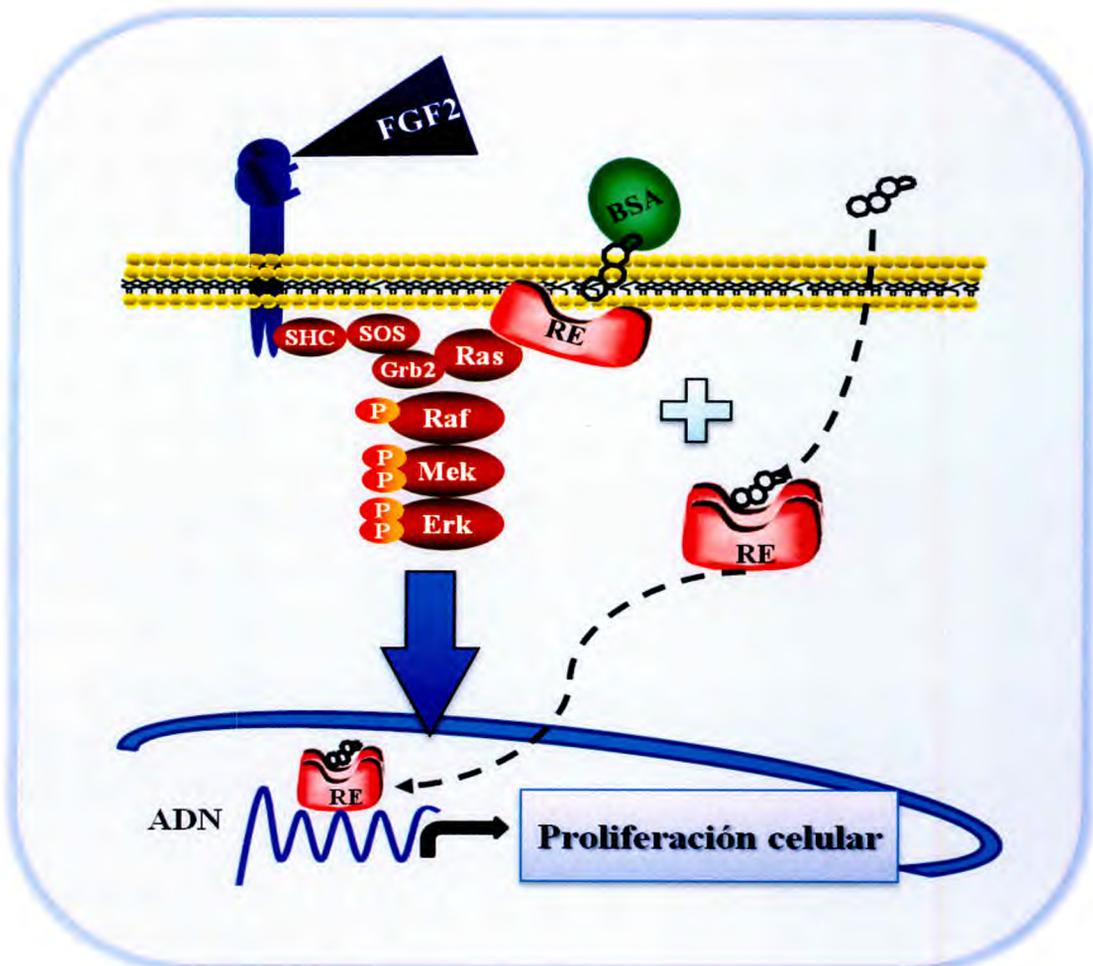


Figura 34: Representación esquemática del efecto cooperativo sobre la proliferación inducida por E2/FGF2 a través de la vía MEK/ERK 1/2.

En conjunto ambas partes de este trabajo de tesis contribuyen al conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que participan en el rol modulador y cooperativo del E2 sobre TRH y FGF2, factores que regulan la actividad metabólica de células lactotropas. Estos mecanismos podrían estar involucrados en las fluctuaciones de los niveles séricos de PRL y en la plasticidad que presenta la población de células lactotropas en diferentes estadios reproductivos en respuesta a mayores requerimientos hormonales.

Conclusions

Efecto del estradiol sobre la actividad secretoria de células lactotropas inducida por TRH

- E2 indujo un efecto modulador, potenciando la liberación rápida de PRL inducida por TRH el cual sería principalmente mediado por la unión del E2 a los RE localizados en la membrana plasmática de células lactotropas.
- El efecto modulador del E2 sobre la actividad secretoria de las lactotropas sería mediado por la activación de receptores de membrana a través de una vía de señalización convergente que involucra PI3K/Akt.
- La vía de señalización MAPK/ERK 1/2 contribuiría parcialmente en el efecto regulador del E2 sobre la secreción de PRL inducida por TRH.
- E2 estimula la translocación de los RE α intracelulares a la membrana plasmática de las lactotropas, lo cual fue evidenciado por un aumento en la expresión de los mismos en la superficie de estas células.

Efecto combinado del estradiol y FGF2 sobre la proliferación de células lactotropas

- El estímulo conjunto de E2/FGF2 promueve un efecto cooperativo sobre la proliferación de células lactotropas.
- El aumento de la actividad mitogénica de células lactotropas en respuesta a E2/FGF2 sería inducido por señales iniciadas en la membrana plasmática a nivel de sus receptores.
- La respuesta proliferativa de las lactotropas inducida por E2/FGF2 fue mediada por la isoforma α del RE.

- La co-incubación de E2/FGF2 promueve la interacción de sus receptores de membrana (RE α y RFGF) la cual estaría estrechamente asociada a la activación sinérgica de la vía MEK/ERK 1/2.
- La actividad mitogénica de las lactotropas en respuesta a E2 /FGF2 estaría mediada principalmente por activación de la cascada de señalización MEK/ERK 1/2.

Este trabajo de tesis contribuye al conocimiento acerca de los mecanismos moleculares que participan en el rol modulador y cooperativo del E2 sobre TRH y FGF2, factores que regulan la actividad metabólica de células lactotropas. Estos mecanismos podrían estar involucrados en las fluctuaciones de los niveles séricos de PRL y en la plasticidad que presenta la población de células lactotropas en diferentes estadios reproductivos en respuesta a mayores requerimientos hormonales.

**Publicaciones
y
presentaciones
en
congresos**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis formaron parte de las siguientes publicaciones:

- Cooperative effect of E2 and FGF2 on lactotroph proliferation triggered by signalling initiated at the plasma membrane. **Sosa LdV**, Gutiérrez S, Petiti JP, Vaca, A. M. dV, De Paul AL, Torres AI. Am J Physiol Endocrinol Metab 305(1):E41-9, 2013.
- 17 β -estradiol modulates the prolactin secretion induced by TRH through membrane estrogen receptors via PI3K/Akt in female rat anterior pituitary cell culture. **Sosa LdV**, Gutiérrez S, Petiti JP, Palmeri CM, Mascanfroni ID, Soaje M, De Paul AL, Torres AI. Am J Physiol Endocrinol Metab. 1; 302(10):E1189-97, 2012.

Parte de los resultados presentados en esta tesis forman parte del trabajo ganador del Premio IRENE FARYNA DE RAVEGLIA al mejor trabajo del área de endocrinología 2010, otorgado por la Sociedad Argentina de Investigación Clínica.

“17 β -estradiol actúa como modulador de la secreción y proliferación de células lactotropas inducida por TRH y FGF-2: participación de RE α intracelulares y de membrana”.

Sosa, LdV; Gutiérrez, S; Petiti, J; Palmeri, C; Mascanfroni, I; Soaje, M; Pellizas, C; De Paul, A; Torres, A.

Asimismo los resultados fueron presentados en los siguientes congresos y reuniones nacionales e internacionales:

- Effect of estrogen and FGF-2 interaction on lactotroph cell proliferation mediated by membrane-initiated signaling. **Sosa, LdV**; Gutiérrez, S; Petiti, J P; Vaca, A M; De Paul, A L; Torres, A I. 15th International Congress of Endocrinology, ICE-ECE 2012. Florence, Italy. May 2012.
- Efecto cooperativo del 17 β -estradiol y FGF-2 sobre la proliferación de células lactotropas iniciado por la activación de receptores de membrana. **Sosa, LdV**; Gutiérrez, Silvina; Petiti, Juan Pablo; Vaca, Alicia Maldré; De Paul, Ana Lucia; Torres, Alicia Inés. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, 2011. Medicina 71 (Supl III);, 2011. Estudio Sigma S.R.L., Buenos Aires, Argentina.
- 17 β -estradiol actúa como modulador de la secreción y proliferación de células lactotropas inducida por TRH y FGF-2: participación de RE α intracelulares y de membrana. **Sosa, LdV**; Gutiérrez, S; Petiti, J; Palmeri, C; Mascanfroni, I; Soaje, M; Pellizas, C; De Paul, A; Torres, A. Reunión Anual de la Sociedad Argentina de

Investigación Clínica (SAIC). Mar del Plata, 2010. Medicina 70 (Supl II): 58, 2010. Estudio Sigma S.R.L., Buenos Aires, Argentina.

- 17-beta estradiol and Thyrotrophin-releasing hormone interaction modulated prolactin secretion through membrane estrogen receptors via phosphoinositide 3-kinase/Akt. **Sosa, L;** Gutiérrez, S; Petiti, J; Palmeri, C; De Paul, A; Torres, A. III Congreso Iberoamericano de NeuroInmunoModulación. Abril de 2009 - Buenos Aires, Argentina.
- *PKCε/ERK1/2 partipation in the proliferative effect of estradiol in interaction with fgf-2 on lactotrophs.* **Sosa, L;** Gutiérrez, S; Petiti, J; Palmeri, C; De Paul, A; Torres, A. Presentación oral. X Jornadas Multidisciplinarias de la Sociedad Argentina de Biología. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Diciembre, 2008. Biocell, ISSN 0327-954533(2) A220. 2009.
- Modulación de la secreción de prolactina y proliferación de células lactotropas por estradiol-BSA en interacción con TRH y FGF2. **LdV Sosa, S** Gutiérrez, M Soaje, JP Petiti, CM Palmeri, AL De Paul, AI Torres. Resumen publicado en la Revista Medicina 67 (Supl III): 127. 2007. ISSN 0025.7680.

ABREVIATURAS

°C: grados centígrados

µg/ml: microgramos/mililitro

ACTH: adrenocorticotrofina

ADN: ácido desoxirribonucleico

AF-1: dominio de activación independiente de ligando

AF-2: dominio de activación dependiente de ligando

Akt: proteína quinasa B

AMPc: adenosina monofosfato cíclico

AngII: angiotensina II

AP-1: proteína activada 1

BrdU: bromodeoxiuridina

DA: dopamina

DAB: diaminobencidina

DAG: diacilglicerol

DBD: dominio de unión al ADN

DPN: 2,3-bis(4-hydroxyphenyl)-propio-nitrilo

E1: estrona

E2: 17β-estradiol

E3: estriol

EGF: Factor de crecimiento epidérmico

EGFR: receptor del Factor de crecimiento epidérmico

ERK1/2: extracellular-signal-regulated kinases ½

FGF2: factor de crecimiento fibroblástico básico

FICT: Fluoresceína de isotiocianato

FSH: hormona folículo estimulante

g: gramo

g: gránulo

g: gravedad

GABA: g-aminobutírico ácido

GnRH: hormona liberadora de gonadotropina

GPER: receptor de estrógeno acoplado a proteína G

h: hora

H: región bisagra del RE

Hsp: proteína de shock térmico

IGF-1: Factor de crecimiento tipo Insulina uno

IgG: inmunoglobulina G

IL: interleucina

IP3: inositol 1,4,5 – trifosfato

kDa: kilodalton

LBD: dominio de unión al ligando
LH: hormona leutinizante
M: mitocondria
M: molaridad
MAPK: proteínas quinasas activadas por mitógenos
min: minutos
mM: milimolar
ng/ml: nanogramos/mililitro
nm: nanometros
nm: nanómetros
nM: nanomolar
NT: neurotensina
OT: oxitocina
PBS: solución salina taponada con fosfato
PBS-BSA: solución salina taponada con fosfato- albúmina bovina
PI3K: fosfatidilinositol 3 quinasa
PIF: factores de inhibición de prolactina
PKA: proteína quinasas A
PKC: proteínas quinasas C
PLC: fosfolipasa C
pM: picomolar
PPT: 4,4',4''-(4-propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-tryl) trisphenol
PRF: factores de liberación de PRL
PRL: prolactina
PrRP: Péptido liberador de prolactina
RE: receptor estrogénicos
RER: retículo endoplasmico rugoso
RFGF: receptor de FGF
Sp-1: proteína específica 1
TERP: productos de respuesta al estrógeno truncados
TGFβ: factor de crecimiento transformante beta
TNFα: factor de necrosis tumoral alfa
TRH: hormona liberadora de tirotropina
TSH: tirotrofina
VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular
VIP: Péptido intestinal vasoactivo

Bibliografía

1. Jeng YJ, Kochukov M, Watson CS Combinations of physiologic estrogens with xenoestrogens alter calcium and kinase responses, prolactin release, and membrane estrogen receptor trafficking in rat pituitary cells. *Environ Health* 9: 61, 2010.
2. Le Romancer M, Poulard C, Cohen P, Sentis S, Renoir JM, Corbo L Cracking the estrogen receptor's posttranslational code in breast tumors. *Endocr Rev* 32: 597-622, 2011.
3. Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523-631, 2000.
4. Soltysik K, Czekaj P Membrane estrogen receptors - is it an alternative way of estrogen action? *J Physiol Pharmacol* 64: 129-42, 2013.
5. Butcher RL, Collins WE, Fugo NW Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17beta throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94: 1704-8, 1974.
6. Denef C Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *J Neuroendocrinol* 20: 1-70, 2008.
7. Hedinger CE, Farquhar MG [Electron microscopic examination of two types of acidophilic anterior pituitary cells in the rat]. *Schweiz Z Pathol Bakteriol* 20: 766-8, 1957.
8. Hentges S, Boyadjieva N, Sarkar DK Transforming growth factor-beta3 stimulates lactotrope cell growth by increasing basic fibroblast growth factor from folliculo-stellate cells. *Endocrinology* 141: 859-67, 2000.
9. Gloddek J, Pagotto U, Paez Pereda M, Arzt E, Stalla GK, Renner U Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide, interleukin-6 and glucocorticoids regulate the release of vascular endothelial growth factor in pituitary folliculostellate cells. *J Endocrinol* 160: 483-90, 1999.
10. Amano O, Yoshitake Y, Nishikawa K, Iseki S Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in the rat pituitary gland. *Arch Histol Cytol* 56: 269-76, 1993.
11. Vankelecom H, Carmeliet P, Van Damme J, Billiau A, Denef C Production of interleukin-6 by folliculo-stellate cells of the anterior pituitary gland in a histiotypic cell aggregate culture system. *Neuroendocrinology* 49: 102-6, 1989.
12. Vankelecom H, Matthys P, Van Damme J, Heremans H, Billiau A, Denef C Immunocytochemical evidence that S-100-positive cells of the mouse anterior pituitary contain interleukin-6 immunoreactivity. *J Histochem Cytochem* 41: 151-6, 1993.
13. Oomizu S, Chaturvedi K, Sarkar DK Folliculostellate cells determine the susceptibility of lactotropes to estradiol's mitogenic action. *Endocrinology* 145: 1473-80, 2004.
14. Pawlikowski M Endocrine/paracrine control of pituitary cell proliferation and its involvement in pituitary tumorigenesis. *Pituitary* 1: 251-6, 1999.
15. Torres AI, Pasolli HA, Maldonado CA, Aoki A Changes in thyrotroph and somatotroph cell populations induced by stimulation and inhibition of their secretory activity. *Histochem J* 27: 370-9, 1995.

16. Bonaterra M, De Paul A, Aoki A, Torres A Residual effects of thyroid hormone on secretory activity of somatotroph population. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* 106: 494-9, 1998.
17. Payette RF, Gershon MD, Nunez EA Two types of secretory granules in gonadotrophs: discrimination by the simultaneous EM immunocytochemical localization of serotonin and beta-follicle stimulating hormone. *Anat Rec* 219: 394-401, 1987.
18. Haggi ES, Torres AI, Maldonado CA, Aoki A Regression of redundant lactotrophs in rat pituitary gland after cessation of lactation. *J Endocrinol* 111: 367-73, 1986.
19. Aoki A, Pasolli HA, Torres AI Pituitary plasticity as correlate of secretory activity. *Exp Toxicol Pathol* 46: 435-6, 1994.
20. Hashi A, Mazawa S, Kato J, Arita J Pentobarbital anesthesia during the proestrous afternoon blocks lactotroph proliferation occurring on estrus in female rats. *Endocrinology* 136: 4665-71, 1995.
21. Smets G, Velkeniers B, Finne E, Baldys A, Gepts W, Vanhaelst L Postnatal development of growth hormone and prolactin cells in male and female rat pituitary. An immunocytochemical light and electron microscopic study. *J Histochem Cytochem* 35: 335-41, 1987.
22. Nogami H, Yoshimura F Fine structural criteria of prolactin cells identified immunohistochemically in the male rat. *Anat Rec* 202: 261-74, 1982.
23. Takahashi S Immunocytochemical and immuno-electron-microscopical study of growth hormone cells in male and female rats of various ages. *Cell Tissue Res* 266: 275-84, 1991.
24. De Paul A, Pons P, Aoki A, Torres A Different behavior of lactotroph cell subpopulations in response to angiotensin II and thyrotrophin-releasing hormone. *Cell Mol Neurobiol* 17: 245-58, 1997.
25. Nagy GM, Boockfor FR, Frawley LS The suckling stimulus increases the responsiveness of mammotropes located exclusively within the central region of the adenohypophysis. *Endocrinology* 128: 761-4, 1991.
26. De Paul AL, Pons P, Aoki A, Torres AI Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochem* 99: 277-89, 1997.
27. Childs GV, Iruthayanathan M, Akhter N, Johnson BW Estrogen mediated cross talk between the ovary and pituitary somatotrope. Pre-ovulatory support for reproductive activity. *Mol Cell Endocrinol* 247: 60-3, 2006.
28. Ben-Jonathan N, Lapensee CR, Lapensee EW What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev* 29: 1-41, 2008.
29. Zarate S, Zaldivar V, Jaita G, Magri L, Radl D, Pisera D, Seilicovich A Role of estrogens in anterior pituitary gland remodeling during the estrous cycle. *Front Horm Res* 38: 25-31, 2010.
30. Greenspan RJ, Van Swinderen B Cognitive consonance: complex brain functions in the fruit fly and its relatives. *Trends Neurosci* 27: 707-11, 2004.
31. D'angelo SA, Wall NR, Bowers CY, Rosa CG Effects of acute and chronic administration of TRH on TSH and prolactin secretion in normal and hypothyroid rats. *Neuroendocrinology* 18: 161-75, 1975.

32. Yu R, Hinkle PM Effect of cell type on the subcellular localization of the thyrotropin-releasing hormone receptor. *Mol Pharmacol* 51: 785-93, 1997.
33. Hizume T, Watanobe H, Yoneda M, Suda T, Schioth HB Involvement of prolactin-releasing peptide in the preovulatory luteinizing hormone and prolactin surges in the rat. *Biochem Biophys Res Commun* 279: 35-9, 2000.
34. Hinuma S, Habata Y, Fujii R, Kawamata Y, Hosoya M, Fukusumi S, Kitada C, Masuo Y, Asano T, Matsumoto H, Sekiguchi M, Kurokawa T, Nishimura O, Onda H, Fujino M A prolactin-releasing peptide in the brain. *Nature* 393: 272-6, 1998.
35. Zhang X, Danila DC, Katai M, Swearingen B, Klibanski A Expression of prolactin-releasing peptide and its receptor messenger ribonucleic acid in normal human pituitary and pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 84: 4652-5, 1999.
36. Nieminen ML, Brandt A, Pietila P, Panula P Expression of mammalian RF-amide peptides neuropeptide FF (NPFF), prolactin-releasing peptide (PrRP) and the PrRP receptor in the peripheral tissues of the rat. *Peptides* 21: 1695-701, 2000.
37. Yasui Y, Yamaguchi M, Jikihara H, Yamamoto T, Kanzaki T, Murata Y Expression of prolactin-releasing peptide in human placenta and decidua. *Endocr J* 48: 397-401, 2001.
38. Suarez C, Tornadu IG, Cristina C, Vela J, Iglesias AG, Libertun C, Diaz-Torga G, Becu-Villalobos D Angiotensin and calcium signaling in the pituitary and hypothalamus. *Cell Mol Neurobiol* 22: 315-33, 2002.
39. Becu-Villalobos D, Lacau-Mengido IM, Thyssen SM, Diaz-Torga GS, Libertun C Effects of LHRH and ANG II on prolactin stimulation are mediated by hypophysial AT1 receptor subtype. *Am J Physiol* 266: E274-8, 1994.
40. Suarez C, Diaz-Torga G, Gonzalez-Iglesias A, Cristina C, Becu-Villalobos D Upregulation of angiotensin II type 2 receptor expression in estrogen-induced pituitary hyperplasia. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 286: E786-94, 2004.
41. Mcchesney R, Sealfon SC, Tsutsumi M, Dong KW, Roberts JL, Bancroft C Either isoform of the dopamine D2 receptor can mediate dopaminergic repression of the rat prolactin promoter. *Mol Cell Endocrinol* 79: R1-7, 1991.
42. Kelly MA, Rubinstein M, Asa SL, Zhang G, Saez C, Bunzow JR, Allen RG, Hnasko R, Ben-Jonathan N, Grandy DK, Low MJ Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron* 19: 103-13, 1997.
43. Asa SL, Kelly MA, Grandy DK, Low MJ Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology* 140: 5348-55, 1999.
44. Hanew K, Rennels EG Effects of culture age on PRL and GH responses to bromocriptine and somatostatin from primary cultures of rat anterior pituitary cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 171: 12-8, 1982.
45. Kimura N, Hayafuji C, Konagaya H, Takahashi K 17 beta-estradiol induces somatostatin (SRIF) inhibition of prolactin release and regulates SRIF receptors in rat anterior pituitary cells. *Endocrinology* 119: 1028-36, 1986.
46. Ezzat S, Melmed S The role of growth factors in the pituitary. *J Endocrinol Invest* 13: 691-8, 1990.

47. Abraham EJ, Faught WJ, Frawley LS Transforming growth factor beta1 is a paracrine inhibitor of prolactin gene expression. *Endocrinology* 139: 5174-81, 1998.
48. Sarkar DK, Kim KH, Minami S Transforming growth factor-beta 1 messenger RNA and protein expression in the pituitary gland: its action on prolactin secretion and lactotropic growth. *Mol Endocrinol* 6: 1825-33, 1992.
49. Qian X, Jin L, Grande JP, Lloyd RV Transforming growth factor-beta and p27 expression in pituitary cells. *Endocrinology* 137: 3051-60, 1996.
50. Inoue K, Mogi C, Ogawa S, Tomida M, Miyai S Are folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland supportive cells or organ-specific stem cells? *Arch Physiol Biochem* 110: 50-3, 2002.
51. Kakeya T, Takeuchi S, Takahashi S Epidermal growth factor, insulin, and estrogen stimulate development of prolactin-secreting cells in cultures of GH3 cells. *Cell Tissue Res* 299: 237-43, 2000.
52. Honda J, Oomizu S, Kiuchi Y, Komatsu N, Takeuchi S, Takahashi S Identification of epidermal growth factor mRNA-expressing cells in the mouse anterior pituitary. *Neuroendocrinology* 71: 155-62, 2000.
53. Chen S, Bangaru ML, Sneade L, Dunckley JA, Ben-Jonathan N, Kansra S Epidermal growth factor receptor cross-talks with ligand-occupied estrogen receptor-alpha to modulate both lactotroph proliferation and prolactin gene expression. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 297: E331-9, 2009.
54. Wu X, Zhang R, Di A, Shan H, Xu R [Effects of growth factors and estrogen on the proliferation and prolactin gene expression in anterior pituitary cells of rats]. *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 21: 331-7, 1999.
55. Bukowska D, Kempisty B, Jackowska M, Wozna M, Antosik P, Piotrowska H, Jaskowski JM Differential expression of epidermal growth factor and transforming growth factor beta isoforms in dog endometrium during different periods of the estrus cycle. *Pol J Vet Sci* 14: 259-64, 2011.
56. Mcandrew J, Paterson AJ, Asa SL, Mccarthy KJ, Kudlow JE Targeting of transforming growth factor-alpha expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology* 136: 4479-88, 1995.
57. Borgundvaag B, Kudlow JE, Mueller SG, George SR Dopamine receptor activation inhibits estrogen-stimulated transforming growth factor-alpha gene expression and growth in anterior pituitary, but not in uterus. *Endocrinology* 130: 3453-8, 1992.
58. Leroith D, Werner H, Beitner-Johnson D, Roberts CT, Jr. Molecular and cellular aspects of the insulin-like growth factor I receptor. *Endocr Rev* 16: 143-63, 1995.
59. Bach MA, Bondy CA Anatomy of the pituitary insulin-like growth factor system. *Endocrinology* 131: 2588-94, 1992.
60. Fernandez M, Sanchez-Franco F, Palacios N, Sanchez I, Villuendas G, Cacicedo L Involvement of vasoactive intestinal peptide on insulin-like growth factor I-induced proliferation of rat pituitary lactotropes in primary culture: evidence for an autocrine and/or paracrine regulatory system. *Neuroendocrinology* 77: 341-52, 2003.

61. Gutierrez S, Petiti JP, De Paul AL, Mukdsi JH, Aoki A, Torres AI, Orgnero EM Antagonistic effects of oestradiol in interaction with IGF-1 on proliferation of lactotroph cells in vitro. *Histochem Cell Biol* 124: 291-301, 2005.
62. Kawashima K, Yamakawa K, Takahashi W, Takizawa S, Yin P, Sugiyama N, Kanba S, Arita J The estrogen-occupied estrogen receptor functions as a negative regulator to inhibit cell proliferation induced by insulin/IGF-1: a cell context-specific antimitogenic action of estradiol on rat lactotrophs in culture. *Endocrinology* 143: 2750-8, 2002.
63. Saitoh Y, Hikake T, Hayashi S, Iguchi T, Sato T Involvement of insulin-like growth factor-I for the regulation of prolactin synthesis by estrogen and postnatal proliferation of lactotrophs in the mouse anterior pituitary. *Cell Tissue Res* 340: 147-58, 2010.
64. Bohlen P, Baird A, Esch F, Ling N, Gospodarowicz D Isolation and partial molecular characterization of pituitary fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 81: 5364-8, 1984.
65. Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G, Mitchell R, Gospodarowicz D Pituitary follicular cells produce basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 5773-7, 1987.
66. Gospodarowicz D, Neufeld G, Schweigerer L Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ* 19: 1-17, 1986.
67. Atkin SL, Landolt AM, Jeffreys RV, Diver M, Radcliffe J, White MC Basic fibroblastic growth factor stimulates prolactin secretion from human anterior pituitary adenomas without affecting adenoma cell proliferation. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 831-7, 1993.
68. Mallo F, Wilson E, Whorwood CB, Singh S, Sheppard MC Basic and acidic fibroblast growth factor increase prolactin mRNA in a dose-dependent and specific manner in GH3 cells. *Mol Cell Endocrinol* 114: 117-25, 1995.
69. Romano D, Pertuit M, Rasolonjanahary R, Barnier JV, Magalon K, Enjalbert A, Gerard C Regulation of the RAP1/RAF-1/extracellularly regulated kinase-1/2 cascade and prolactin release by the phosphoinositide 3-kinase/AKT pathway in pituitary cells. *Endocrinology* 147: 6036-45, 2006.
70. Ben-Jonathan N, Chen S, Dunckley JA, Lapensee C, Kansra S Estrogen receptor-alpha mediates the epidermal growth factor-stimulated prolactin expression and release in lactotrophs. *Endocrinology* 150: 795-802, 2009.
71. Spuch C, Diz-Chaves Y, Perez-Tilve D, Mallo F Fibroblast growth factor-2 and epidermal growth factor modulate prolactin responses to TRH and dopamine in primary cultures. *Endocrine* 29: 317-24, 2006.
72. Yamanaka D, Akama T, Fukushima T, Nedachi T, Kawasaki C, Chida K, Minami S, Suzuki K, Hakuno F, Takahashi S Phosphatidylinositol 3-kinase-binding protein, PI3KAP/XB130, is required for cAMP-induced amplification of IGF mitogenic activity in FRTL-5 thyroid cells. *Mol Endocrinol* 26: 1043-55, 2012.
73. Lin J, Jia Y, Zeng W, Mi Y, Zhang C Basic FGF promotes proliferation of ovarian granulosa cells in the laying chickens via FGFR1 and PKC pathway. *Reprod Domest Anim* 47: 135-42, 2012.

74. Muller KM, Tveteraas IH, Aasrum M, Odegard J, Dawood M, Dajani O, Christoffersen T, Sandnes DL Role of protein kinase C and epidermal growth factor receptor signalling in growth stimulation by neurotensin in colon carcinoma cells. *BMC Cancer* 11: 421, 2011.
75. Zhang Q, Yu C, Peng S, Xu H, Wright E, Zhang X, Huo X, Cheng E, Pham TH, Asanuma K, Hatanpaa KJ, Rezai D, Wang DH, Sarode V, Melton S, Genta RM, Spechler SJ, Souza RF Autocrine VEGF Signaling Promotes Proliferation of Neoplastic Barrett's Epithelial Cells Through a PLC-Dependent Pathway. *Gastroenterology*, 2013.
76. Jackson TA, Koterwas DM, Morgan MA, Bradford AP Fibroblast growth factors regulate prolactin transcription via an atypical Rac-dependent signaling pathway. *Mol Endocrinol* 17: 1921-30, 2003.
77. Dayyani F, Parikh NU, Varkaris AS, Song JH, Moorthy S, Chatterji T, Maity SN, Wolfe AR, Carboni JM, Gottardis MM, Logothetis CJ, Gallick GE Combined Inhibition of IGF-1R/IR and Src family kinases enhances antitumor effects in prostate cancer by decreasing activated survival pathways. *PLoS One* 7: e51189, 2012.
78. Wynick D, Hammond PJ, Akinsanya KO, Bloom SR Galanin regulates basal and oestrogen-stimulated lactotroph function. *Nature* 364: 529-32, 1993.
79. Wynick D, Small CJ, Bacon A, Holmes FE, Norman M, Ormandy CJ, Kilic E, Kerr NC, Ghatel M, Talamantes F, Bloom SR, Pachnis V Galanin regulates prolactin release and lactotroph proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 12671-6, 1998.
80. Ren J, Koenig JJ, Hooi SC Stimulation of anterior pituitary galanin and prolactin gene expression in suckling rats. *Endocrine* 11: 251-6, 1999.
81. Chew LJ, Seah V, Murphy D, Carter D Anterior pituitary vasoactive intestinal peptide mRNA is colocalised with prolactin mRNA in hyperoestrogenised rats. *J Mol Endocrinol* 16: 211-20, 1996.
82. Wanke IE, Rorstad OP Receptors for vasoactive intestinal peptide in rat anterior pituitary glands: localization of binding to lactotropes. *Endocrinology* 126: 1981-8, 1990.
83. Carrillo AJ, Phelps CJ Quantification of vasoactive intestinal peptide immunoreactivity in the anterior pituitary glands of intact male and female, ovariectomized, and estradiol benzoate-treated rats. *Endocrinology* 131: 964-9, 1992.
84. Escalada J, Cacicedo L, Ortego J, Melian E, Sanchez-Franco F Prolactin gene expression and secretion during pregnancy and lactation in the rat: role of dopamine and vasoactive intestinal peptide. *Endocrinology* 137: 631-7, 1996.
85. Gomez O, Balsa JA Autocrine/paracrine action of pituitary vasoactive intestinal peptide on lactotroph hyperplasia induced by estrogen. *Endocrinology* 144: 4403-9, 2003.
86. Gomez O, Balsa JA Implication of pituitary vasoactive intestinal peptide in dopaminergic inhibition of estrogen-induced pituitary hyperplasia and vascular endothelial growth factor expression. *Neuroendocrinology* 80: 324-31, 2004.

87. Shah GV, Pedchenko V, Stanley S, Li Z, Samson WK Calcitonin is a physiological inhibitor of prolactin secretion in ovariectomized female rats. *Endocrinology* 137: 1814-22, 1996.
88. Wang YQ, Yuan R, Sun YP, Lee TJ, Shah GV Antiproliferative action of calcitonin on lactotrophs of the rat anterior pituitary gland: evidence for the involvement of transforming growth factor beta 1 in calcitonin action. *Endocrinology* 144: 2164-71, 2003.
89. Sun YP, Lee TJ, Shah GV Calcitonin expression in rat anterior pituitary gland is regulated by ovarian steroid hormones. *Endocrinology* 143: 4056-64, 2002.
90. Morani A, Warner M, Gustafsson JA Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. *J Intern Med* 264: 128-42, 2008.
91. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138: 863-70, 1997.
92. Matthews J, Gustafsson JA Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3: 281-92, 2003.
93. Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139: 3976-83, 1998.
94. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson JA Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* 87: 905-31, 2007.
95. Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* 66: 2405-26, 2009.
96. Weng C, Cai J, Wen J, Yuan H, Yang K, Imperato-Mcginley J, Zhu YS Differential effects of estrogen receptor ligands on regulation of dihydrotestosterone-induced cell proliferation in endothelial and prostate cancer cells. *Int J Oncol* 42: 327-37, 2013.
97. Shupnik MA Oestrogen receptors, receptor variants and oestrogen actions in the hypothalamic-pituitary axis. *J Neuroendocrinol* 14: 85-94, 2002.
98. Trivedi S, Piccart M, Muquardt C, Gilot N, Hadiy S, Patel D, Leclercq G Tamoxifen aziridine labeling of the estrogen receptor-potential utility in detecting biologically aggressive breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 40: 231-41, 1996.
99. Denger S, Reid G, Kos M, Flouriot G, Parsch D, Brand H, Korach KS, Sonntag-Buck V, Gannon F ERalpha gene expression in human primary osteoblasts: evidence for the expression of two receptor proteins. *Mol Endocrinol* 15: 2064-77, 2001.
100. Murphy AJ, Guyre PM, Wira CR, Pioli PA Estradiol regulates expression of estrogen receptor ERalpha46 in human macrophages. *PLoS One* 4: e5539, 2009.
101. Li L, Haynes MP, Bender JR Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 4807-12, 2003.

102. Wang Z, Zhang X, Shen P, Loggie BW, Chang Y, Deuel TF Identification, cloning, and expression of human estrogen receptor-alpha36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha66. *Biochem Biophys Res Commun* 336: 1023-7, 2005.
103. Zarate S, Jaita G, Ferraris J, Eijo G, Magri ML, Pisera D, Seilicovich A Estrogens induce expression of membrane-associated estrogen receptor alpha isoforms in lactotropes. *PLoS One* 7: e41299, 2012.
104. Zhang XT, Kang LG, Ding L, Vranic S, Gatalica Z, Wang ZY A positive feedback loop of ER-alpha36/EGFR promotes malignant growth of ER-negative breast cancer cells. *Oncogene* 30: 770-80, 2011.
105. Geffroy-Roisne S, Duval J, Thieulant ML Multiple forms of affinity-labeled estrogen receptors in rat distinct pituitary cells. *Endocrinology* 131: 1503-10, 1992.
106. Gutierrez S, Sosa L, Petiti JP, Mukdsi JH, Mascanfroni ID, Pellizas CG, De Paul AL, Cambiasso MJ, Torres AI 17beta-Estradiol stimulates the translocation of endogenous estrogen receptor alpha at the plasma membrane of normal anterior pituitary cells. *Mol Cell Endocrinol* 355: 169-79, 2012.
107. Pasqualini C, Guivarc'h D, Barnier JV, Guibert B, Vincent JD, Vernier P Differential subcellular distribution and transcriptional activity of sigmaE3, sigmaE4, and sigmaE3-4 isoforms of the rat estrogen receptor-alpha. *Mol Endocrinol* 15: 894-908, 2001.
108. Resnick EM, Schreihof DA, Periasamy A, Shupnik MA Truncated estrogen receptor product-1 suppresses estrogen receptor transactivation by dimerization with estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 275: 7158-66, 2000.
109. Imamov O, Lopatkin NA, Gustafsson JA Estrogen receptor beta in prostate cancer. *N Engl J Med* 351: 2773-4, 2004.
110. Cheng G, Li Y, Omoto Y, Wang Y, Berg T, Nord M, Vihko P, Warner M, Piao YS, Gustafsson JA Differential regulation of estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta in primate mammary gland. *J Clin Endocrinol Metab* 90: 435-44, 2005.
111. Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 2959-64, 2006.
112. Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC Estrogen receptor beta inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 64: 423-8, 2004.
113. Paruthiyil S, Cvoro A, Tagliaferri M, Cohen I, Shtivelman E, Leitman DC Estrogen receptor beta causes a G2 cell cycle arrest by inhibiting CDK1 activity through the regulation of cyclin B1, GADD45A, and BTG2. *Breast Cancer Res Treat* 129: 777-84, 2011.
114. Mitchner NA, Garlick C, Steinmetz RW, Ben-Jonathan N Differential regulation and action of estrogen receptors alpha and beta in GH3 cells. *Endocrinology* 140: 2651-8, 1999.
115. Sanchez-Criado JE, Martin De Las Mulas J, Bellido C, Tena-Sempere M, Aguilar R, Blanco A Biological role of pituitary estrogen receptors ERalpha and ERbeta on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 79: 247-58, 2004.

116. Saunders PT, Millar MR, Macpherson S, Irvine DS, Groome NP, Evans LR, Sharpe RM, Scobie GA ERbeta1 and the ERbeta2 splice variant (ERbetacx/beta2) are expressed in distinct cell populations in the adult human testis. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2706-15, 2002.
117. Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA Estrogen receptor beta: an overview and update. *Nucl Recept Signal* 6: e003, 2008.
118. Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer* 95: 616-26, 2006.
119. Gougelet A, Bouclier C, Marsaud V, Maillard S, Mueller SO, Korach KS, Renoir JM Estrogen receptor alpha and beta subtype expression and transactivation capacity are differentially affected by receptor-, hsp90- and immunophilin-ligands in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 94: 71-81, 2005.
120. Sabbah M, Redeuilh G, Secco C, Baulieu EE The binding activity of estrogen receptor to DNA and heat shock protein (Mr 90,000) is dependent on receptor-bound metal. *J Biol Chem* 262: 8631-5, 1987.
121. Lonard DM, O'malley BW The expanding cosmos of nuclear receptor coactivators. *Cell* 125: 411-4, 2006.
122. Robyr D, Wolffe AP, Wahli W Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 14: 329-47, 2000.
123. O'lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 18: 1859-75, 2004.
124. Bjornstrom L, Sjoberg M Estrogen receptor-dependent activation of AP-1 via non-genomic signalling. *Nucl Recept* 2: 3, 2004.
125. Saville B, Wormke M, Wang F, Nguyen T, Enmark E, Kuiper G, Gustafsson JA, Safe S Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (Sp1) promoter elements. *J Biol Chem* 275: 5379-87, 2000.
126. Quaedackers ME, Van Den Brink CE, Van Der Saag PT, Tertoolen LG Direct interaction between estrogen receptor alpha and NF-kappaB in the nucleus of living cells. *Mol Cell Endocrinol* 273: 42-50, 2007.
127. Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 3: 513-9, 1999.
128. Szego CM, Davis JS Adenosine 3',5'-monophosphate in rat uterus: acute elevation by estrogen. *Proc Natl Acad Sci U S A* 58: 1711-8, 1967.
129. Levin ER Plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 20: 477-82, 2009.
130. Filardo EJ, Thomas P GPR30: a seven-transmembrane-spanning estrogen receptor that triggers EGF release. *Trends Endocrinol Metab* 16: 362-7, 2005.
131. Levin ER Elusive extranuclear estrogen receptors in breast cancer. *Clin Cancer Res* 18: 6-8, 2012.
132. Heberden C, Reine F, Grosse B, Henry C, Zagar Y, Chaumaz G, Lieberherr M Detection of a raft-located estrogen receptor-like protein distinct from ER alpha. *Int J Biochem Cell Biol* 38: 376-91, 2006.

133. Acconcia F, Ascenzi P, Bocedi A, Spisni E, Tomasi V, Trentalance A, Visca P, Marino M Palmitoylation-dependent estrogen receptor alpha membrane localization: regulation by 17beta-estradiol. *Mol Biol Cell* 16: 231-7, 2005.
134. Swenson KL, Sladek CD Gonadal steroid modulation of vasopressin secretion in response to osmotic stimulation. *Endocrinology* 138: 2089-97, 1997.
135. Nadal A, Rovira JM, Laribi O, Leon-Quinto T, Andreu E, Ripoll C, Soria B Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor. *FASEB J* 12: 1341-8, 1998.
136. Harrington WR, Kim SH, Funk CC, Madak-Erdogan Z, Schiff R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS Estrogen dendrimer conjugates that preferentially activate extranuclear, nongenomic versus genomic pathways of estrogen action. *Mol Endocrinol* 20: 491-502, 2006.
137. Acconcia F, Manavathi B, Mascarenhas J, Talukder AH, Mills G, Kumar R An inherent role of integrin-linked kinase-estrogen receptor alpha interaction in cell migration. *Cancer Res* 66: 11030-8, 2006.
138. Song RX, Zhang Z, Santen RJ Estrogen rapid action via protein complex formation involving ERalpha and Src. *Trends Endocrinol Metab* 16: 347-53, 2005.
139. Bjornstrom L, Sjoberg M Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19: 833-42, 2005.
140. Lu Q, Pallas DC, Surks HK, Baur WE, Mendelsohn ME, Karas RH Striatin assembles a membrane signaling complex necessary for rapid, nongenomic activation of endothelial NO synthase by estrogen receptor alpha. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 17126-31, 2004.
141. Stefano GB, Prevot V, Beauvillain JC, Fimiani C, Welters I, Cadet P, Breton C, Pestel J, Salzet M, Bilfinger TV Estradiol coupling to human monocyte nitric oxide release is dependent on intracellular calcium transients: evidence for an estrogen surface receptor. *J Immunol* 163: 3758-63, 1999.
142. Moriarty K, Kim KH, Bender JR Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling. *Endocrinology* 147: 5557-63, 2006.
143. Simoncini T, Rabkin E, Liao JK Molecular basis of cell membrane estrogen receptor interaction with phosphatidylinositol 3-kinase in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23: 198-203, 2003.
144. Ordonez-Moran P, Munoz A Nuclear receptors: genomic and non-genomic effects converge. *Cell Cycle* 8: 1675-80, 2009.
145. De Paul AL, Gutierrez S, Sabatino ME, Mukdsi JH, Palmeri CM, Soaje M, Petiti JP, Torres AI Epidermal growth factor induces a sexually dimorphic proliferative response of lactotroph cells through PKC/ERK1/2/Pit-1 in vitro. *Exp Physiol*, 2010.
146. Gutierrez S, De Paul AL, Petiti JP, Del Valle Sosa L, Palmeri CM, Soaje M, Orgnero EM, Torres AI Estradiol interacts with insulin through membrane receptors to induce an antimitogenic effect on lactotroph cells. *Steroids* 73: 515-27, 2008.
147. Mukdsi JH, De Paul AL, Munoz S, Aoki A, Torres AI Immunolocalization of Pit-1 in gonadotroph nuclei is indicative of the transdifferentiation of gonadotroph

- to lactotroph cells in prolactinomas induced by estrogen. *Histochem Cell Biol* 121: 453-62, 2004.
148. Pasolli HA, Torres AI, Aoki A Influence of lactotroph cell density on prolactin secretion in rats. *J Endocrinol* 134: 241-6, 1992.
149. Riddle O Prolactin in Vertebrate Function and Organization. *J Natl Cancer Inst* 31: 1039-110, 1963.
150. Bentley AM, Wallis M In-vitro evidence for the autoregulation of prolactin secretion at the level of the pituitary gland in the rat. *J Endocrinol* 115: 13-8, 1987.
151. Kadowaki J, Ku N, Oetting WS, Walker AM Mammoth autoregulation: uptake of secreted prolactin and inhibition of secretion. *Endocrinology* 114: 2060-7, 1984.
152. Hosojima H, Wyche JH Prolactin control of growth and prolactin autoregulation in cultured human pituitary cells. *Horm Res* 21: 240-5, 1985.
153. Arbogast LA, Voogt JL Hyperprolactinemia increases and hypoprolactinemia decreases tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nuclei, but not the substantia nigra or zona incerta. *Endocrinology* 128: 997-1005, 1991.
154. Smith MS, Freeman ME, Neill JD The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* 96: 219-26, 1975.
155. Bast JD, Melampy RM Luteinizing hormone, prolactin and ovarian 20 - hydroxysteroid dehydrogenase levels during pregnancy and pseudopregnancy in the rat. *Endocrinology* 91: 1499-505, 1972.
156. Terkel J, Blake CA, Sawyer CH Serum prolactin levels in lactating rats after suckling or exposure to ether. *Endocrinology* 91: 49-53, 1972.
157. Gonzalez M, Reyes R, Damas C, Alonso R, Bello AR Oestrogen receptor alpha and beta in female rat pituitary cells: an immunochemical study. *Gen Comp Endocrinol* 155: 857-68, 2008.
158. Fink G, Koch Y, Ben Aroya N Release of thyrotropin releasing hormone into hypophysial portal blood is high relative to other neuropeptides and may be related to prolactin secretion. *Brain Res* 243: 186-9, 1982.
159. Franks S, Mason HD, Shennan KI, Sheppard MC Stimulation of prolactin secretion by oestradiol in the rat is associated with increased hypothalamic release of thyrotrophin-releasing hormone. *J Endocrinol* 103: 257-61, 1984.
160. Horn AM, Fraser HM, Fink G Effects of antiserum to thyrotrophin-releasing hormone on the concentrations of plasma prolactin, thyrotrophin and LH in the pro-oestrous rat. *J Endocrinol* 104: 205-9, 1985.
161. Matsushita N, Kato Y, Shimatsu A, Katakami H, Yanaihara N, Imura H Effects of VIP, TRH, GABA and dopamine on prolactin release from superfused rat anterior pituitary cells. *Life Sci* 32: 1263-9, 1983.
162. Kimura N, Arai K, Sahara Y, Suzuki H Estradiol transcriptionally and posttranscriptionally up-regulates thyrotropin-releasing hormone receptor messenger ribonucleic acid in rat pituitary cells. *Endocrinology* 134: 432-40, 1994.

163. Straub RE, Frech GC, Joho RH, Gershengorn MC Expression cloning of a cDNA encoding the mouse pituitary thyrotropin-releasing hormone receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87: 9514-8, 1990.
164. Gershengorn MC, Osman R Molecular and cellular biology of thyrotropin-releasing hormone receptors. *Physiol Rev* 76: 175-91, 1996.
165. Aragay AM, Katz A, Simon MI The G alpha q and G alpha 11 proteins couple the thyrotropin-releasing hormone receptor to phospholipase C in GH3 rat pituitary cells. *J Biol Chem* 267: 24983-8, 1992.
166. Gershengorn MC Thyrotropin-releasing hormone action: mechanism of calcium-mediated stimulation of prolactin secretion. *Recent Prog Horm Res* 41: 607-53, 1985.
167. Akita Y, Ohno S, Yajima Y, Konno Y, Saido TC, Mizuno K, Chida K, Osada S, Kuroki T, Kawashima S, Et Al. Overproduction of a Ca(2+)-independent protein kinase C isozyme, nPKC epsilon, increases the secretion of prolactin from thyrotropin-releasing hormone-stimulated rat pituitary GH4C1 cells. *J Biol Chem* 269: 4653-60, 1994.
168. Kiley SC, Parker PJ, Fabbro D, Jaken S Differential regulation of protein kinase C isozymes by thyrotropin-releasing hormone in GH4C1 cells. *J Biol Chem* 266: 23761-8, 1991.
169. Gershengorn MC, Thaw C Thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulates biphasic elevation of cytoplasmic free calcium in GH3 cells. Further evidence that TRH mobilizes cellular and extracellular Ca²⁺. *Endocrinology* 116: 591-6, 1985.
170. Gershengorn MC, Heinfliink M, Nussenzveig DR, Hinkle PM, Falck-Pedersen E Thyrotropin-releasing hormone (TRH) receptor number determines the size of the TRH-responsive phosphoinositide pool. Demonstration using controlled expression of TRH receptors by adenovirus mediated gene transfer. *J Biol Chem* 269: 6779-83, 1994.
171. Gutierrez S, Petiti JP, Sosa LV, Fozzatti L, De Paul AL, Masini-Repiso AM, Torres AI 17beta-oestradiol acts as a negative modulator of insulin-induced lactotroph cell proliferation through oestrogen receptor alpha, via nitric oxide/guanylyl cyclase/cGMP. *Cell Prolif* 43: 505-14, 2010.
172. Christian HC, Morris JF Rapid actions of 17beta-oestradiol on a subset of lactotrophs in the rat pituitary. *J Physiol* 539: 557-66, 2002.
173. Bulayeva NN, Wozniak AL, Lash LL, Watson CS Mechanisms of membrane estrogen receptor-alpha-mediated rapid stimulation of Ca²⁺ levels and prolactin release in a pituitary cell line. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288: E388-97, 2005.
174. Rogers RC, Mcdougal DH, Hermann GE Leptin amplifies the action of thyrotropin-releasing hormone in the solitary nucleus: an in vitro calcium imaging study. *Brain Res* 1385: 47-55, 2011.
175. Nolan LA, Kavanagh E, Lightman SL, Levy A Anterior pituitary cell population control: basal cell turnover and the effects of adrenalectomy and dexamethasone treatment. *J Neuroendocrinol* 10: 207-15, 1998.
176. Denef C Paracrine control of lactotrope proliferation and differentiation. *Trends Endocrinol Metab* 14: 188-95, 2003.

177. Ben-Jonathan N, Hnasko R Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev* 22: 724-63, 2001.
178. Christian HC, Chapman LP, Morris JF Thyrotrophin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, prolactin-releasing peptide and dopamine regulation of prolactin secretion by different lactotroph morphological subtypes in the rat. *J Neuroendocrinol* 19: 605-13, 2007.
179. Lamberts SW, Macleod RM Regulation of prolactin secretion at the level of the lactotroph. *Physiol Rev* 70: 279-318, 1990.
180. Yin P, Arita J Differential regulation of prolactin release and lactotrope proliferation during pregnancy, lactation and the estrous cycle. *Neuroendocrinology* 72: 72-9, 2000.
181. Chun TY, Gregg D, Sarkar DK, Gorski J Differential regulation by estrogens of growth and prolactin synthesis in pituitary cells suggests that only a small pool of estrogen receptors is required for growth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95: 2325-30, 1998.
182. Micevych P, Christensen A Membrane-initiated estradiol actions mediate structural plasticity and reproduction. *Front Neuroendocrinol* 33: 331-41, 2012.
183. Vasudevan N, Kow LM, Pfaff D Integration of steroid hormone initiated membrane action to genomic function in the brain. *Steroids* 70: 388-96, 2005.
184. Zarate S, Jaita G, Zaldivar V, Radl DB, Eijo G, Ferraris J, Pisera D, Seilicovich A Estrogens exert a rapid apoptotic action in anterior pituitary cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 296: E664-71, 2009.
185. Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, Diaugustine RP, Korach KS Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem* 277: 8531-7, 2002.
186. Sawai T, Bernier F, Fukushima T, Hashimoto T, Ogura H, Nishizawa Y Estrogen induces a rapid increase of calcium-calmodulin-dependent protein kinase II activity in the hippocampus. *Brain Res* 950: 308-11, 2002.
187. Song RX, Barnes CJ, Zhang Z, Bao Y, Kumar R, Santen RJ The role of Shc and insulin-like growth factor 1 receptor in mediating the translocation of estrogen receptor alpha to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2076-81, 2004.
188. Fox EM, Bernaciak TM, Wen J, Weaver AM, Shupnik MA, Silva CM Signal transducer and activator of transcription 5b, c-Src, and epidermal growth factor receptor signaling play integral roles in estrogen-stimulated proliferation of estrogen receptor-positive breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 22: 1781-96, 2008.
189. Marin F, Boya J Immunocytochemical localization of basic fibroblast growth factor in the human pituitary gland. *Neuroendocrinology* 62: 523-9, 1995.
190. Mukdsi JH, De Paul AL, Petiti JP, Gutierrez S, Aoki A, Torres AI Pattern of FGF-2 isoform expression correlated with its biological action in experimental prolactinomas. *Acta Neuropathol* 112: 491-501, 2006.
191. Moscatelli D High and low affinity binding sites for basic fibroblast growth factor on cultured cells: absence of a role for low affinity binding in the

- stimulation of plasminogen activator production by bovine capillary endothelial cells. *J Cell Physiol* 131: 123-30, 1987.
192. Cross MJ, Claesson-Welsh L FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol Sci* 22: 201-7, 2001.
193. Chaturvedi K, Sarkar DK Role of protein kinase C-Ras-MAPK p44/42 in ethanol and transforming growth factor-beta3-induced basic fibroblast growth factor release from folliculostellate cells. *J Pharmacol Exp Ther* 314: 1346-52, 2005.
194. Takahashi H, Nakagawa S Effects of estrogen on cell growth and fibroblast growth factor receptor induction in MtT/Se cells. *Endocr Res* 23: 95-104, 1997.
195. Abbass SA, Asa SL, Ezzat S Altered expression of fibroblast growth factor receptors in human pituitary adenomas. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 1160-6, 1997.
196. Cristina C, Diaz-Torga G, Gongora A, Guida MC, Perez-Millan MI, Baldi A, Becu-Villalobos D Fibroblast growth factor-2 in hyperplastic pituitaries of D2R knockout female mice. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 293: E1341-51, 2007.
197. Recouvreux MV, Lapyckyj L, Camilletti MA, Guida MC, Ornstein A, Rifkin DB, Becu-Villalobos D, Diaz-Torga G Sex Differences in the Pituitary Transforming Growth Factor-beta1 System: Studies in a Model of Resistant Prolactinomas. *Endocrinology* 154: 4192-205, 2013.
198. Ishida M, Takahashi W, Itoh S, Shimodaira S, Maeda S, Arita J Estrogen actions on lactotroph proliferation are independent of a paracrine interaction with other pituitary cell types: a study using lactotroph-enriched cells. *Endocrinology* 148: 3131-9, 2007.
199. Oomizu S, Takeuchi S, Takahashi S Stimulatory effect of insulin-like growth factor I on proliferation of mouse pituitary cells in serum-free culture. *J Endocrinol* 157: 53-62, 1998.
200. De Paul AL, Mukdsi JH, Pellizas CG, Montesinos M, Gutierrez S, Susperreguy S, Del Rio A, Maldonado CA, Torres AI Thyroid hormone receptor alpha 1-beta 1 expression in epididymal epithelium from euthyroid and hypothyroid rats. *Histochem Cell Biol* 129: 631-42, 2008.
201. Marin R, Diaz M, Alonso R, Sanz A, Arevalo MA, Garcia-Segura LM Role of estrogen receptor alpha in membrane-initiated signaling in neural cells: interaction with IGF-1 receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol* 114: 2-7, 2009.
202. Shupnik MA Crosstalk between steroid receptors and the c-Src-receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. *Oncogene* 23: 7979-89, 2004.
203. Judd AM, Login IS, Kovacs K, Ross PC, Spangelo BL, Jarvis WD, Macleod RM Characterization of the MMQ cell, a prolactin-secreting clonal cell line that is responsive to dopamine. *Endocrinology* 123: 2341-50, 1988.
204. Bulayeva NN, Gametchu B, Watson CS Quantitative measurement of estrogen-induced ERK 1 and 2 activation via multiple membrane-initiated signaling pathways. *Steroids* 69: 181-92, 2004.
205. Wozniak AL, Bulayeva NN, Watson CS Xenoestrogens at picomolar to nanomolar concentrations trigger membrane estrogen receptor-alpha-

- mediated Ca²⁺ fluxes and prolactin release in GH3/B6 pituitary tumor cells. *Environ Health Perspect* 113: 431-9, 2005.
206. Rogers RC, Barnes MJ, Hermann GE Leptin "gates" thermogenic action of thyrotropin-releasing hormone in the hindbrain. *Brain Res* 1295: 135-41, 2009.
207. Cardona-Gomez GP, Mendez P, Garcia-Segura LM Synergistic interaction of estradiol and insulin-like growth factor-I in the activation of PI3K/Akt signaling in the adult rat hypothalamus. *Brain Res Mol Brain Res* 107: 80-8, 2002.
208. Song RX, Santen RJ Membrane initiated estrogen signaling in breast cancer. *Biol Reprod* 75: 9-16, 2006.
209. Evinger AJ, 3rd, Levin ER Requirements for estrogen receptor alpha membrane localization and function. *Steroids* 70: 361-3, 2005.
210. Smith CL, O'malley BW Coregulator function: a key to understanding tissue specificity of selective receptor modulators. *Endocr Rev* 25: 45-71, 2004.
211. Marino M, Ascenzi P, Acconcia F S-palmitoylation modulates estrogen receptor alpha localization and functions. *Steroids* 71: 298-303, 2006.
212. Lucas TF, Siu ER, Esteves CA, Monteiro HP, Oliveira CA, Porto CS, Lazari MF 17beta-estradiol induces the translocation of the estrogen receptors ESR1 and ESR2 to the cell membrane, MAPK3/1 phosphorylation and proliferation of cultured immature rat Sertoli cells. *Biol Reprod* 78: 101-14, 2008.
213. Dominguez R, Micevych P Estradiol rapidly regulates membrane estrogen receptor alpha levels in hypothalamic neurons. *J Neurosci* 30: 12589-96, 2010.
214. Gorosito SV, Lorenzo AG, Cambiasso MJ Estrogen receptor alpha is expressed on the cell-surface of embryonic hypothalamic neurons. *Neuroscience* 154: 1173-7, 2008.
215. Bondar G, Kuo J, Hamid N, Micevych P Estradiol-induced estrogen receptor-alpha trafficking. *J Neurosci* 29: 15323-30, 2009.
216. Sosa L, Gutierrez S, Petiti JP, Palmeri CM, Mascanfroni ID, Soaje M, De Paul AL, Torres AI 17beta-Estradiol modulates the prolactin secretion induced by TRH through membrane estrogen receptors via PI3K/Akt in female rat anterior pituitary cell culture. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 302: E1189-97, 2012.
217. Moats RK, 2nd, Ramirez VD Electron microscopic visualization of membrane-mediated uptake and translocation of estrogen-BSA:colloidal gold by hep G2 cells. *J Endocrinol* 166: 631-47, 2000.
218. Micevych P, Dominguez R Membrane estradiol signaling in the brain. *Front Neuroendocrinol* 30: 315-27, 2009.
219. Pedram A, Razandi M, Levin ER Nature of functional estrogen receptors at the plasma membrane. *Mol Endocrinol* 20: 1996-2009, 2006.
220. Guo RB, Rigolet P, Zargarian L, Femandjian S, Xi XG Structural and functional characterizations reveal the importance of a zinc binding domain in Bloom's syndrome helicase. *Nucleic Acids Res* 33: 3109-24, 2005.
221. Faivre E, Skildum A, Pierson-Mullany L, Lange CA Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. *Steroids* 70: 418-26, 2005.
222. Gill A, Hammes SR G beta gamma signaling reduces intracellular cAMP to promote meiotic progression in mouse oocytes. *Steroids* 72: 117-23, 2007.

223. Pedram A, Razandi M, Sainson RC, Kim JK, Hughes CC, Levin ER A conserved mechanism for steroid receptor translocation to the plasma membrane. *J Biol Chem* 282: 22278-88, 2007.
224. Acconcia F, Ascenzi P, Fabozzi G, Visca P, Marino M S-palmitoylation modulates human estrogen receptor-alpha functions. *Biochem Biophys Res Commun* 316: 878-83, 2004.
225. Razandi M, Alton G, Pedram A, Ghonshani S, Webb P, Levin ER Identification of a structural determinant necessary for the localization and function of estrogen receptor alpha at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 23: 1633-46, 2003.
226. Schlegel A, Wang C, Katzenellenbogen BS, Pestell RG, Lisanti MP Caveolin-1 potentiates estrogen receptor alpha (ERalpha) signaling. caveolin-1 drives ligand-independent nuclear translocation and activation of ERalpha. *J Biol Chem* 274: 33551-6, 1999.
227. Fukata Y, Fukata M Protein palmitoylation in neuronal development and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 11: 161-75, 2010.
228. Pedram A, Razandi M, Deschenes RJ, Levin ER DHHC-7 and -21 are palmitoylacyltransferases for sex steroid receptors. *Mol Biol Cell* 23: 188-99, 2012.
229. Razandi M, Pedram A, Levin ER Heat shock protein 27 is required for sex steroid receptor trafficking to and functioning at the plasma membrane. *Mol Cell Biol* 30: 3249-61, 2010.
230. Levy A Physiological implications of pituitary trophic activity. *J Endocrinol* 174: 147-55, 2002.
231. Oishi Y, Okuda M, Takahashi H, Fujii T, Morii S Cellular proliferation in the anterior pituitary gland of normal adult rats: influences of sex, estrous cycle, and circadian change. *Anat Rec* 235: 111-20, 1993.
232. Spady TJ, McComb RD, Shull JD Estrogen action in the regulation of cell proliferation, cell survival, and tumorigenesis in the rat anterior pituitary gland. *Endocrine* 11: 217-33, 1999.
233. Nolan LA, Levy A Prolonged oestrogen treatment does not correlate with a sustained increase in anterior pituitary mitotic index in ovariectomized Wistar rats. *J Endocrinol* 200: 301-9, 2009.
234. Gilchrist CA, Park JH, Macdonald RG, Shull JD Estradiol and triiodothyronine increase production of insulin-like growth factor-I (IGF-I) and insulin-like growth factor binding protein-3 (IGFBP-3) by GH4C1 rat pituitary tumor cells. *Mol Cell Endocrinol* 114: 147-56, 1995.
235. Graham ES, Webster CA, Hazlerigg DG, Morgan PJ Evidence for the biosynthesis of a prolactin-releasing factor from the ovine pars tuberalis, which is distinct from thyrotropin-releasing hormone. *J Neuroendocrinol* 14: 945-54, 2002.
236. Hall JM, McDonnell DP The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140: 5566-78, 1999.
237. Scully KM, Gleiberman AS, Lindzey J, Lubahn DB, Korach KS, Rosenfeld MG Role of estrogen receptor-alpha in the anterior pituitary gland. *Mol Endocrinol* 11: 674-81, 1997.

238. Takahashi S, Okazaki K, Kawashima S Mitotic activity of prolactin cells in the pituitary glands of male and female rats of different ages. *Cell Tissue Res* 235: 497-502, 1984.
239. Fox EM, Andrade J, Shupnik MA Novel actions of estrogen to promote proliferation: integration of cytoplasmic and nuclear pathways. *Steroids* 74: 622-7, 2009.
240. Varea O, Arevalo MA, Garrido JJ, Garcia-Segura LM, Wandosell F, Mendez P Interaction of estrogen receptors with insulin-like growth factor-I and Wnt signaling in the nervous system. *Steroids* 75: 565-9, 2010.
241. Mendez P, Wandosell F, Garcia-Segura LM Cross-talk between estrogen receptors and insulin-like growth factor-I receptor in the brain: cellular and molecular mechanisms. *Front Neuroendocrinol* 27: 391-403, 2006.
242. Mendez P, Azcoitia I, Garcia-Segura LM Estrogen receptor alpha forms estrogen-dependent multimolecular complexes with insulin-like growth factor receptor and phosphatidylinositol 3-kinase in the adult rat brain. *Brain Res Mol Brain Res* 112: 170-6, 2003.
243. Wallwiener M, Hartkopf AD, Baccelli I, Riethdorf S, Schott S, Pantel K, Marme F, Sohn C, Trumpp A, Rack B, Aktas B, Solomayer EF, Muller V, Janni W, Schneeweiss A, Fehm TN The prognostic impact of circulating tumor cells in subtypes of metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 137: 503-10, 2013.
244. Lappano R, Maggiolini M G protein-coupled receptors: novel targets for drug discovery in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 10: 47-60, 2011.
245. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR, Jr. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* 14: 1649-60, 2000.
246. Albanito L, Lappano R, Madeo A, Chimento A, Prossnitz ER, Cappello AR, Dolce V, Abonante S, Pezzi V, Maggiolini M G-protein-coupled receptor 30 and estrogen receptor-alpha are involved in the proliferative effects induced by atrazine in ovarian cancer cells. *Environ Health Perspect* 116: 1648-55, 2008.
247. Vivacqua A, Lappano R, De Marco P, Sisci D, Aquila S, De Amicis F, Fuqua SA, Ando S, Maggiolini M G protein-coupled receptor 30 expression is up-regulated by EGF and TGF alpha in estrogen receptor alpha-positive cancer cells. *Mol Endocrinol* 23: 1815-26, 2009.
248. De Marco P, Bartella V, Vivacqua A, Lappano R, Santolla MF, Morcavallo A, Pezzi V, Belfiore A, Maggiolini M Insulin-like growth factor-I regulates GPER expression and function in cancer cells. *Oncogene* 32: 678-88, 2013.
249. Van Der Veeken J, Oliveira S, Schiffelers RM, Storm G, Van Bergen En Henegouwen PM, Roovers RC Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 9: 748-60, 2009.
250. Sosa LD, Gutierrez S, Petiti JP, Vaca AM, De Paul AL, Torres AI Cooperative effect of E2 and FGF2 on lactotroph proliferation triggered by signalling initiated at the plasma membrane. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2013.

251. Raz L, Khan MM, Mahesh VB, Vadlamudi RK, Brann DW Rapid estrogen signaling in the brain. *Neurosignals* 16: 140-53, 2008.
252. Greger JG, Fursov N, Cooch N, Mclarney S, Freedman LP, Edwards DP, Cheskis BJ Phosphorylation of MNAR promotes estrogen activation of phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol* 27: 1904-13, 2007.
253. Silva CM, Shupnik MA Integration of steroid and growth factor pathways in breast cancer: focus on signal transducers and activators of transcription and their potential role in resistance. *Mol Endocrinol* 21: 1499-512, 2007.
254. Bartella V, De Marco P, Malaguarnera R, Belfiore A, Maggiolini M New advances on the functional cross-talk between insulin-like growth factor-I and estrogen signaling in cancer. *Cell Signal* 24: 1515-21, 2012.
255. Panno ML, Salerno M, Pezzi V, Sisci D, Maggiolini M, Mauro L, Morrone EG, Ando S Effect of oestradiol and insulin on the proliferative pattern and on oestrogen and progesterone receptor contents in MCF-7 cells. *J Cancer Res Clin Oncol* 122: 745-9, 1996.
256. Petiti JP, De Paul AL, Gutierrez S, Palmeri CM, Mukdsi JH, Torres AI Activation of PKC epsilon induces lactotroph proliferation through ERK1/2 in response to phorbol ester. *Mol Cell Endocrinol* 289: 77-84, 2008.
257. Petiti JP, Gutierrez S, Mukdsi JH, De Paul AL, Torres AI Specific subcellular targeting of PKCalpha and PKCepsilon in normal and tumoral lactotroph cells by PMA-mitogenic stimulus. *J Mol Histol* 40: 417-25, 2009.

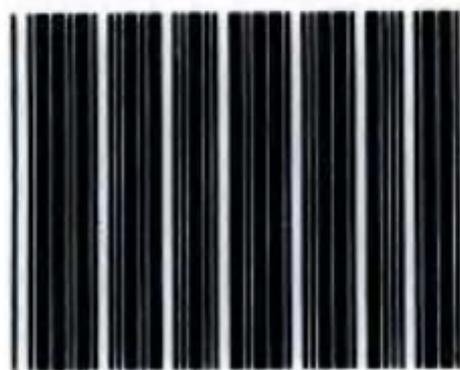
R-^T

574.8734

S

12415

Sosa, Líliliana del Valle
Modulación de la res-
puesta secr4etoria ...



12415