

## ARTÍCULO ORIGINAL

# Sitios de acción inhibitoria de la prolactina sobre la síntesis de estradiol inducida por la hormona folículo estimulante en las células de la granulosa\*\*

Fernando Larrea,<sup>a</sup> Sergio Sánchez-González,<sup>a</sup> Rocío García-Becerra,<sup>a</sup> Isabel Méndez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Biología de la Reproducción,  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán,  
México, D. F., México

— Recibido en su versión modificada: 17 de noviembre de 2004

— Aceptado: 10 de diciembre de 2004—

## RESUMEN

*En este estudio se investigaron los sitios probables de la acción inhibitoria de prolactina (Prl) sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la hormona folículo estimulante (FSH). Para esta finalidad se estudió la capacidad de cultivos primarios de células de la granulosa de la rata de sintetizar estradiol y AMPc bajo la estimulación con FSH o de activadores de la vía dependiente de AMPc en presencia de Prl humana. La participación de otros sistemas de transducción de señal como los dependientes de PKC y proteínas Gi en los mecanismos de acción inhibitoria de la Prl fue también investigada utilizando inhibidores de estos sistemas como la calfostina C y la toxina pertusis. Los resultados demostraron la habilidad de la Prl de alterar la esteroidogénesis previa y posterior a la generación de AMPc, muy probablemente por mecanismos que involucran la activación de la subunidad catalítica de la adenilato ciclase, así como a través de interactuar con sistemas de transducción de señal dependientes de PKC y proteínas sensibles a la toxina pertusis. Nuestros resultados sugieren un mecanismo de interacción entre receptores acoplados a proteínas G con aquéllos acoplados a cinasas de tirosinas mediado muy probablemente por vías de señalización dependientes de proteínas Gi.*

## Palabras clave:

*Prolactina, FSH, mecanismos de acción, proteínas Gi, células de la granulosa, receptores*

## SUMMARY

*We studied the sites of prolactin inhibition upon FSH-induced ovarian steroidogenesis and the ability of prolactin (Prl) to inhibit the synthesis of estradiol and cAMP accumulation under the stimulation of FSH or cAMP-dependent activators. The participation of other signal pathways such as PKC and Gi proteins on the inhibitory actions of Prl was also investigated using calfostine C and pertussis toxin as inhibitors. Results showed a dose-dependent prolactin decrease in FSH-induced estradiol and cAMP production prior and after the generation of the cyclic nucleotide by a mechanism involving the catalytic subunit of adenyl cyclase and/or through activation of PKC or by the interaction with pertusis toxin-sensitive G proteins. Our results suggest a mechanism by which G protein-coupled receptors are linked with those coupled with tyrosine kinase through the involvement of a Gi protein mediated mechanism.*

## Key words:

*Prolactin, FSH, mechanisms of action, G proteins, granulosa cells, receptors*

## Introducción

De las hormonas sintetizadas y secretadas por la porción anterior de la glándula hipofisaria, la prolactina (Prl) representa la hormona con mayor versatilidad funcional. A través de su interacción con receptores de membrana, la Prl

ejerce efectos biológicos sobre diferentes procesos relacionados con la reproducción, el crecimiento y desarrollo, incluyendo el sistema inmunológico, y el balance de líquidos y electrolitos.<sup>1</sup> La clonación de los receptores para esta hormona<sup>2</sup> ha sido fundamental para el conocimiento de sus mecanismos de acción involucrados en la regulación de la

\*Correspondencia y solicitud de sobretiros: Dr. Fernando Larrea. Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga 15, Col. Sección XVI, Tlalpan CP14000, México D.F., México, 5573 1160. Email: larrea@innsz.mx

\*\*Este trabajo recibió apoyo a través de subsidios para la investigación del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) de México y del Programa Especial de Investigación, Desarrollo y Capacitación en Reproducción Humana de la Organización Mundial de la Salud (Ginebra, Suiza).

transcripción de genes específicos. Los receptores de la Prl se encuentran ampliamente distribuidos en diferentes órganos representando el ovario uno de los tejidos con mayor expresión génica y contenido de estos receptores.<sup>3</sup> A este nivel, la Prl ejerce un efecto dual dependiendo del estadio de desarrollo del folículo ovárico y de la dosis o concentraciones circulantes de la hormona.<sup>4</sup> El principal efecto de la Prl sobre el ovario se realiza a nivel de la actividad esteroidogénica del folículo alterando la activación dependiente de AMP cíclico de la expresión del citocromo P450 aromatasa.<sup>5</sup> Estudios previos por nuestro grupo<sup>6</sup> han demostrado la habilidad de la Prl de inhibir de manera dosis dependiente la actividad de la P450 aromatasa en cultivos primarios de células de la granulosa inducida tanto por la hormona folículo estimulante (FSH) como por la de un análogo no hidrolizable del AMP cíclico (8-bromo AMPc). Estos efectos sobre la esteroidogénesis ovárica son probablemente mediados a través de la activación de cinasas de tirosinas asociadas al receptor de la Prl. Por otra parte, la activación de cinasas C de proteínas (PKC) por ésteres del forbol, de manera similar a la Prl, inhibe la esteroidogénesis mediada por la FSH,<sup>6</sup> lo que sugiere la convergencia de segundos mensajeros con funciones regulatorias parecidas. En este estudio se investigaron los sitios probables de inhibición de la Prl sobre la esteroidogénesis inducida por la FSH en cultivos primarios de células inmaduras de la granulosa de la rata.

## Material y métodos

### Reactivos

Las preparaciones hormonales (NIDDK-hFSH-1-SIAFP-I y NIDDK-hPRL-RP-2), estándares hipofisarios incluyendo los anticuerpos específicos para FSH, Prl y AMPc fueron generosamente donados por *The National Hormone and Pituitary Program* (Rockville, MD, USA). La preparación purificada de FSH humana fue libre de la actividad inmunológica de la Prl, hormona luteinizante (LH), hormona estimulante de tiroides (TSH) y de la hormona de crecimiento. La preparación de Prl humana fue 98% monomérica a juzgar por su movilidad de geles desnaturizantes de poliacrilamida (SDS-PAGE) y la presencia de un solo residuo terminal de leucina. El estradiol marcado radiactivamente con tritio ( $[^3\text{H}]$  17 $\beta$ -estradiol) con actividad específica de 89 Ci/mmol fue obtenido de Du Pont NEN Research Products (Boston, MA, USA), y purificado antes de su uso en placas de silice gel (Silica gel 60F-254, E. Merck Dramstadt, Alemania). El dietilestilbestrol (DES), androstenediona, I-metil-3-isobutil xantina (MIX), 8 bromo monofosfato cíclico de adenosina (8 bromo AMPc) y la forskolina se obtuvieron de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). El activador de la cinasa C de proteínas (PKC): acetato de tetradecanoilforbol (PTA), la calostatina C y la toxina pertusina se compraron de Calbiochem (La Jolla, CA, USA). La toxina del cólera se obtuvo de List Biological Laboratories Inc. (Campbell, CA, USA). El medio de Fisher conteniendo suero fetal de bovino (10%), el suero de caballo, L-glutamina y las soluciones de penicilina/estreptomicina se obtuvieron de GIBCO BRL (Grand Island, NY, USA). Todos los demás reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

### Animales y cultivos de células de la granulosa

En este estudio se utilizaron ratas Wistar hembras de 21 días de edad las que recibieron por vía subcutánea implantes de Silastic conteniendo DES con la finalidad de estimular la proliferación de las células de la granulosa del ovario. Cuatro días después del implante, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical obteniéndose las células de la granulosa por punción folicular y cultivadas de acuerdo a la metodología descrita por Jia y Hsueh.<sup>7</sup> Las células fueron cultivadas en pozos de 16 mm de diámetro conteniendo en promedio 1.5 x 105 células viables por pozo en medio Mc Coy 5a suplementado con L-glutamina (4mM), androstenediona (1.25  $\mu\text{M}$ ), DES (0.125  $\mu\text{M}$ ), MIX (0.15  $\mu\text{M}$ ), penicilina (100 UI/ml) y estreptomicina (0.1 mg/ml). Las incubaciones se llevaron a cabo durante 72 horas a 37°C en una atmósfera húmeda de 95% aire y 5% CO<sub>2</sub> y en presencia o ausencia de FSH, Prl y/o estimuladores o inhibidores de la actividad de proteínas G, adenilato ciclasa o PKC. El efecto de la adición de hormonas y otros factores sobre la actividad esteroidogénica de las células de la granulosa se evaluó, al finalizar el periodo de incubación, por la cuantificación del contenido de estradiol y AMPc en los medios de cultivo. Todas las incubaciones correspondientes a un experimento se realizaron por triplicado y los resultados fueron expresados en ng o pmol/pozo de estradiol y AMPc, respectivamente. En todos los casos, cada experimento fue repetido por lo menos en tres ocasiones.

### Cuantificación de estradiol y AMP cíclico

El contenido de estradiol en los medios de cultivo se determinó en duplicado por radioinmunoanálisis específico (RIA) utilizando los reactivos y protocolos del Matched Reagent Programme of the Special Programme of Research, Development and Research Training in Human Reproduction of the World Health Organization (Ginebra, Suiza).<sup>8</sup> La sensibilidad del análisis fue de 6.4 pg/tubo y los coeficientes de variación intra e inter análisis fueron < 11 % y <6%, respectivamente. El AMPc se cuantificó por RIA utilizando como estándar al tirosil metil ester del monofosfato cíclico de adenosina (Sigma Chemical Co.), marcado radiactivamente con  $[^{125}\text{I}]$  utilizando el método de la cloramina T, y anticuerpo policlonal (NIDDK, CV-27 Pool) a una dilución final de 1:70,000.<sup>9</sup> Las muestras analizadas se hirvieron a 95°C durante 5-10 minutos con la finalidad de inactivar la actividad de la fosfodiesterasa endógena. Para su análisis, las muestras fueron acetiladas en una solución de trietilamina y anhídrido acético (2:1). El RIA se llevó a cabo durante 18-24 horas a 4°C. La reacción se detuvo por la adición de 3 ml de etanol y el contenido de radioactividad se determinó en los precipitados. La sensibilidad de análisis fue de 4 fm/tubo y los coeficientes de variación inter e intra análisis fueron de < 1 2% y <6%, respectivamente.

### Estudios de unión y afinidad del receptor de la FSH

El número de sitios de unión y las constantes de afinidad de los receptores de membrana para la FSH en las células de la granulosa en cultivo se determinaron por análisis de saturación de acuerdo a la metodología descrita por Guevara-Aguirre y colaboradores.<sup>10</sup> Brevemente: se incubaron 400 x 10<sup>3</sup> células viables en 0.1 ml de 0.025 M Tris-sacarosa, pH 7.5, en presencia

de FSH (NIDDK-hFSH-1-SIAFP-2) marcada con  $^{125}\text{I}$  (35,000 cpm) en 0.1 ml de Tris-sacarosa y concentraciones crecientes de FSH humana no radiactiva (50-3500 ng/O.1 ml) en un volumen final de incubación de 0.4 ml. Las incubaciones se llevaron a cabo en tubos de análisis pretratados con albúmina en suero de bovino 1% durante 4 horas a 37°C. La separación de la fracción libre de la unida se llevó a cabo, después de la adición de 2 ml de solución de Tris-sacarosa, por centrifugación a 3000 rpm durante 30 minutos. La unión no específica se estimó en incubaciones similares conteniendo un exceso de hormona no radiactiva. La unión específica resultó de sustraer a la unión total la unión no específica. Para la estimación de las constantes fisicoquímicas del receptor, los resultados fueron graficados de acuerdo al método de Scatchard.<sup>11</sup>

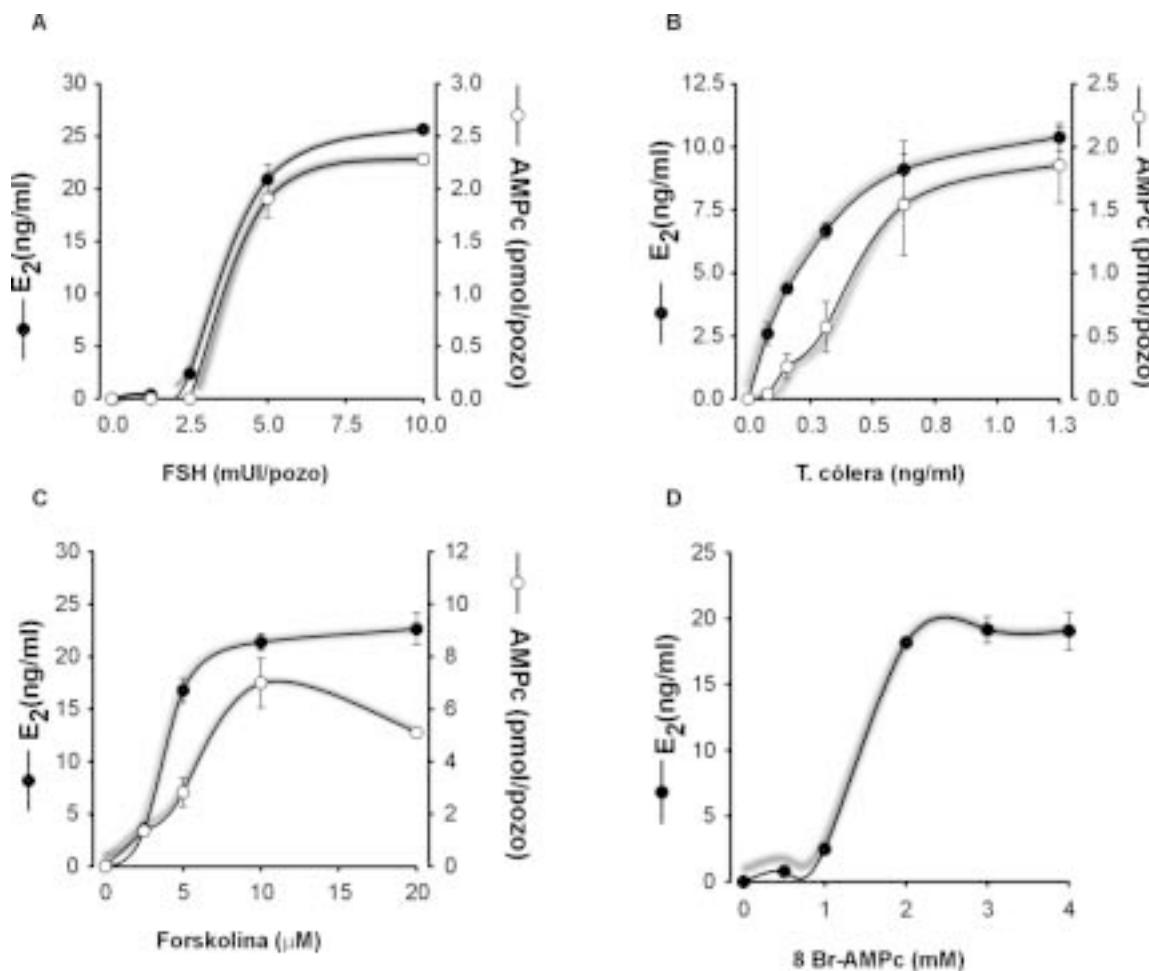
#### Análisis estadístico

Las diferencias entre grupos fueron analizadas por análisis de varianza (ANOVA), un valor de  $P \leq 0.5$  fue considerado como estadísticamente significativo.

## Resultados

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

Con la finalidad de evaluar los efectos de la Prl sobre la actividad esteroidogénica de células de la granulosa en cultivo fue necesario establecer y caracterizar, en este sistema, los diferentes mecanismos hormonales y de señalización intracelular responsables de la síntesis de estradiol. Como puede observarse en la figura 1, la incubación de las células de la granulosa en presencia de diferentes concentraciones de la FSH (Panel A) ocasionó de manera dosis dependiente el aumento significativo en el contenido de estradiol y de AMPc en el medio de cultivo. La dosis media estimuladora de la FSH ( $ED_{50}$ ) sobre ambos marcadores de respuesta hormonal fue de 3.07 mUI por lo que en experimentos posteriores se utilizó una dosis de la FSH de 5.0 mUI. De manera similar, la incubación de estas células en presencia de concentraciones



**Figura 1.** Efecto de la estimulación de diferentes componentes de la vía dependiente de cinasas A de proteína sobre la síntesis de estradiol y acumulación de AMPc en células de la granulosa en cultivo. Las células de la granulosa fueron incubadas durante 72 horas en presencia de concentraciones crecientes de los agentes estimuladores. Los resultados están expresados como la media  $\pm$  DE.

crecientes de un estimulador de proteínas Gs y de la adenilato ciclase como la toxina del cólera (Panel B) y la forskolina (Panel C), respectivamente indujo de manera dosis dependiente el aumento significativo en los medios de cultivo del contenido de estradiol y de AMPc. Por otra parte, incubaciones en presencia del análogo no hidrolizable del AMPc (Panel D) resultó también en el aumento significativo dosis dependiente del contenido de AMPc en los medios de cultivo. Estos resultados nos permitieron validar al cultivo de células de la granulosa como un modelo adecuado para evaluar los efectos biológicos in vitro de la FSH, así como de los mecanismos de señalización intracelular involucrados en la acción de esta gonadotropina sobre la esteroidogénesis ovárica.

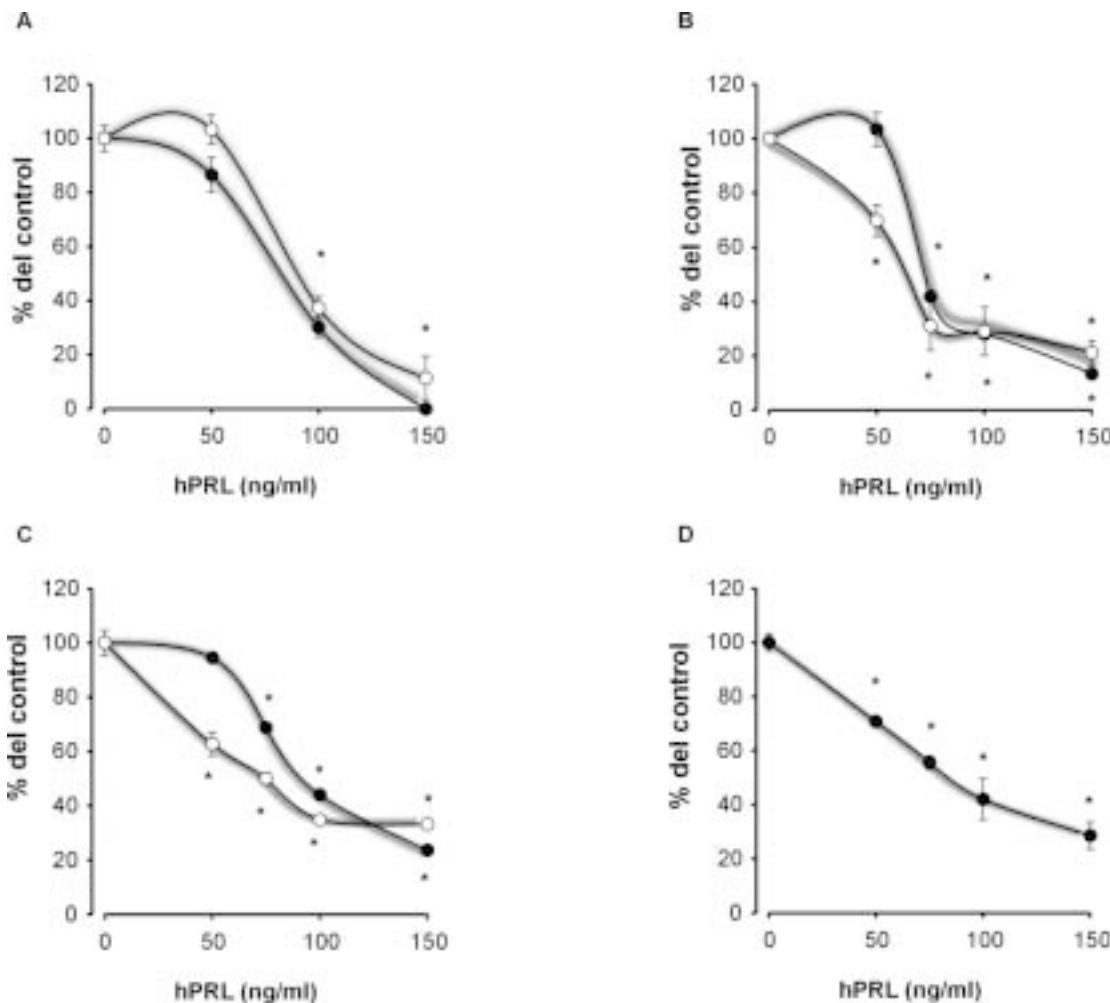
#### Efectos de la Prl sobre la síntesis de estradiol mediada por la FSH

Existen informes en la literatura describiendo el efecto inhibidor de la Prl sobre la actividad de P450 aromatasa en células de la granulosa mantenidas en cultivo;<sup>12-14</sup> sin embargo, los mecanismos y sitios de acción de este efecto no se conocen de manera

adecuada. En la figura 2 se muestran los efectos de la Prl sobre la síntesis de estradiol y de AMPc en las células de la granulosa. Como puede observarse la presencia de Prl humana (0-150 ng/ml) inhibió de manera significativa y dependiente de la dosis la síntesis de estradiol inducida por la FSH (Panel A). Por otra parte, y como se muestra en la figura 2, la estimulación de la síntesis de estradiol y AMPc por la toxina del cólera (Panel B) y la forskolina (Panel C), así como del estradiol por el 8 bromo AMPc (Panel D) fue inhibida en presencia de dosis crecientes de la Prl humana. Las dosis inhibitorias de la Prl al 50% ( $ID_{50}$ ) sobre la estimulación de la esteroidogénesis inducida por la FSH, toxina del cólera, forskolina y del 8 bromo AMPc fueron similares, con pequeñas variaciones dependiendo del factor estimulador: 57.7  $\pm$  2.1, 63.9  $\pm$  3.3, 82.2  $\pm$  3.7 y 57.3  $\pm$  6.17 ng/ml, respectivamente.

#### Efectos de la activación de PKC sobre la síntesis de estradiol

La activación de PKC en las células de la granulosa se acompaña de la inhibición de los mecanismos responsables de la estimulación de la síntesis de estradiol inducida por la FSH.<sup>6,15</sup>



**Gráfica 2.** Efecto de concentraciones crecientes de Prl sobre la síntesis de estradiol en células de la granulosa incubadas en presencia de FSH (A), toxina del cólera (B), forskolina (C) y 8 bromo AMPc (D). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  DE. \* p < 0.05 vs. en ausencia de Prl.

Por otra parte, la activación tanto de cinasas de serinas/treoninas como de tirosinas representa uno de los eventos tempranos de señalización intracelular que ocurren siguiendo la interacción de la Prl con sus receptores en el órgano blanco.<sup>16-18</sup> Con la finalidad de estudiar la asociación que existe entre la Prl con los mecanismos de activación de PKC en relación a la interferencia de esta hormona con la acción de la FSH sobre la síntesis de estradiol, se investigaron los efectos de agonistas y antagonistas de PKC en células de la granulosa estimuladas con FSH en la presencia o ausencia de la Prl. Como puede observarse en la figura 3, la estimulación de la síntesis de estradiol por FSH (Panel A), toxina del cólera (Panel B), forskolina (Panel C) y 8 bromo AMPc (Panel D) fue inhibida a través de la activación de PKC por TPA, y con excepción de los cultivos estimulados con la forskolina, la presencia de TPA inhibió de manera significativa la acumulación de AMPc. Con la finalidad de estudiar si estos efectos de PKC se encuentran asociados con la actividad inhibitoria de la Prl, se llevaron a cabo incubaciones en presencia de un inhibidor específico de la actividad de PKC. La figura 4 muestra los resultados obtenidos con calfostina C en cultivos de células de la granulosa estimuladas con FSH en presencia de la Prl (Panel A) o TPA (Panel B). Como puede observarse, la presencia de un inhibidor específico de la actividad de PKC, restauró en ambos casos los efectos de la FSH sobre la síntesis de estradiol y

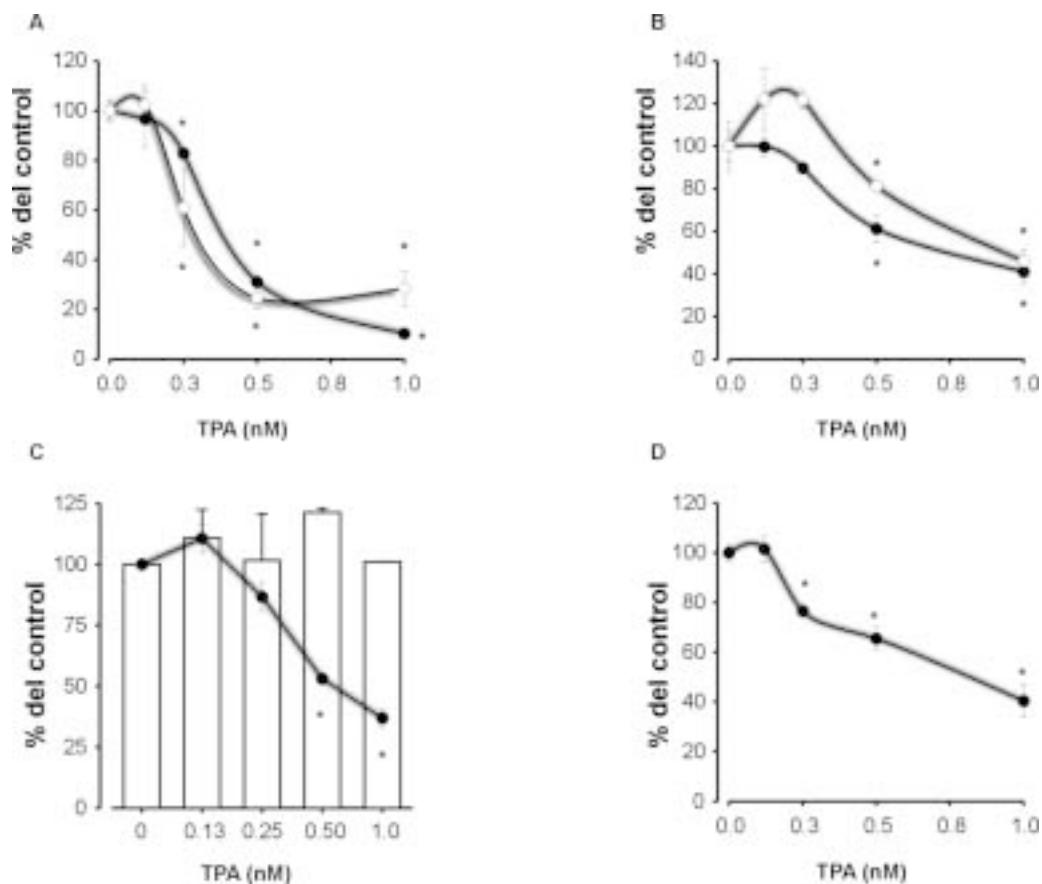
generación de AMPc en las células de la granulosa.

#### Efectos de la Prl sobre el receptor membranal de la FSH

Las propiedades de unión del receptor membranal de la FSH en las células de la granulosa incubadas en presencia de Prl o TPA se obtuvieron a partir de los análisis de saturación entre el ligando y su receptor. Como puede observarse en la figura 5, la presencia de la Prl o TPA en el cultivo no modificó de manera significativa las curvas de desplazamiento con FSH (Panel A) ni las propiedades de unión del receptor, incluyendo sus constantes de disociación (Kd) y el número de sitios de unión (NSU) (Panel B, Cuadro I).

#### Papel de las proteínas Gi sobre los efectos inhibitorios de la Prl en la esteroidogénesis

El efecto de la toxina pertusis sobre la activación de AMPc a través de promover la ADP ribosilación de la subunidad G $\alpha$ i se estudió en cultivos de células de la granulosa estimuladas con la FSH humana en presencia de Prl o TPA. Como puede observarse en la figura 6, la adición de diferentes concentraciones de la toxina pertusis ocasionó la elevación, depen-



**Figuras 3.** Efecto de concentraciones crecientes de TPA sobre la síntesis de estradiol en células de la granulosa incubadas en presencia de FSH (A), toxina del cólera (B), forskolina (C) y 8 bromo AMPc (D). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  DE. \* P < 0.05 vs. en ausencia de TPA

**Cuadro I. Constantes de disociación (Kd) y número de sitios de unión (NSU) de FSH en las células de la granulosa en presencia o ausencia de Prl o TPA**

Condición	Kd ( $10^{-11}$ M)	NSU (nM)
Control	1.144	7.995
Prl	1.105	7.031
TPA	1.029	7.357

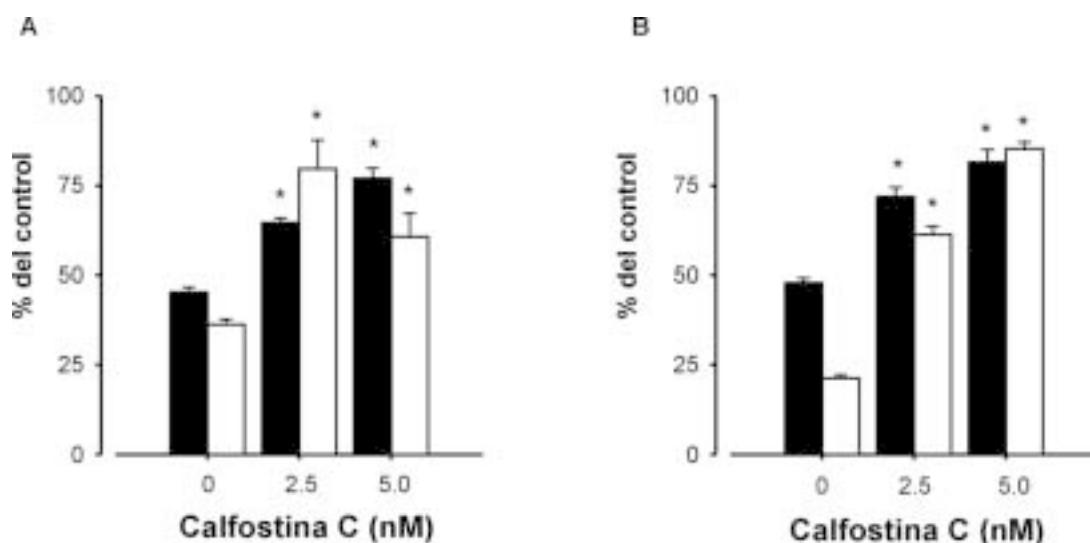
diente de la dosis, del contenido de estradiol y de AMPc en medios de cultivos estimulados con FSH en presencia de Prl (Panel A). Estos efectos no se observaron cuando la toxina pertusis fue adicionada a cultivos de células de la granulosa estimulados con FSH en presencia de TPA (Panel B). En este caso, el contenido de estradiol y de AMPc en los medios de cultivo no mostró diferencias significativas en presencia o ausencia de la toxina pertusis.

## Discusión

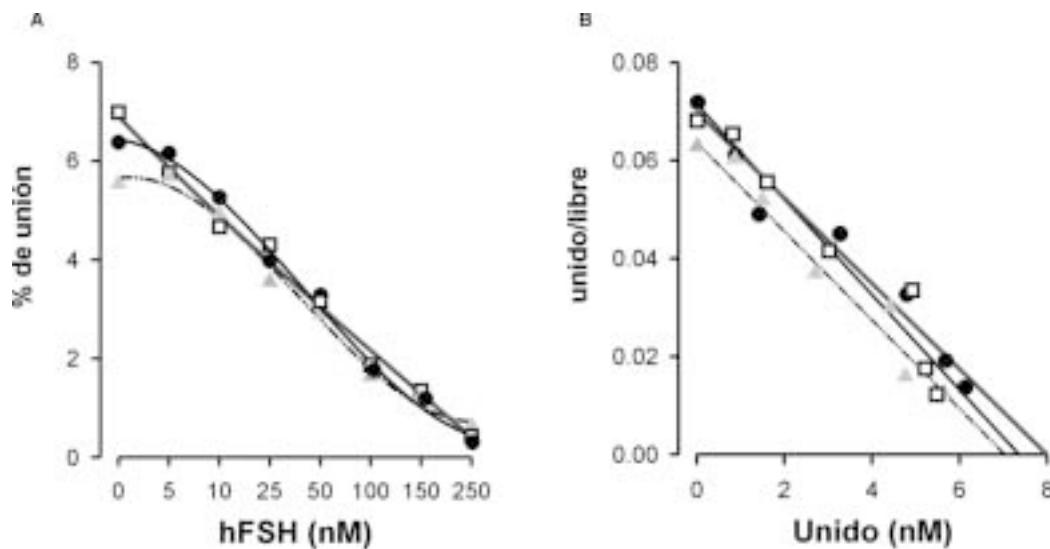
Los resultados de este estudio confirman evidencias previas en relación a los efectos inhibitorios de la Prl y PKC sobre la esteroidogénesis inducida por gonadotropinas en las células de la granulosa.<sup>6,13-15</sup> En este trabajo fue posible validar la utilización de cultivos primarios de células de la granulosa obtenidas de ratas hembras pretratadas con DES como modelo experimental para el estudio del mecanismo de acción de factores hormonales que llevan a cabo sus efectos a través de segundos mensajeros como el AMPc, PKC y las cinasas de tirosinas. A este respecto, la estimulación de proteínas Gs a través del receptor membranal de la FSH, así como por la toxina del cólera y de la adenilato ciclase por forskolina demostró la integridad funcional de esta vía

de transducción de señal responsable de la síntesis de estradiol por las células de la granulosa.

Por otra parte, la utilización de TPA, el cual mimetiza la acción del diacilglicerol como segundo mensajero para estimular PKC, a través de aumentar su afinidad por el calcio, inhibió de manera dosis dependiente la síntesis de estradiol inducida por la FSH. De manera similar, la presencia de la Prl inhibió la estimulación de la esteroidogénesis inducida por la FSH, cuyo mecanismo fue probablemente mediado por la activación de receptores acoplados a cinasas de tirosinas. Estas observaciones en su conjunto nos permiten sugerir la presencia de vías de comunicación entre segundos mensajeros responsables de la transducción de señales inducidas por diferentes ligandos sobre la actividad de receptores membranales acoplados a proteínas G. Un hallazgo interesante en este estudio fue la observación del efecto de la Prl sobre la esteroidogénesis y la acumulación de AMPc inducida por la FSH, toxina del cólera y forskolina. Los resultados obtenidos sugieren cambios a nivel de la subunidad catalítica de la adenilato ciclase o bien secundarios a alteraciones en las proteínas Gs, incluyendo su acoplamiento a receptores de membrana o a modificaciones en sus propiedades de unión al ligando. Por otra parte, la inhibición de PKC sobre la síntesis de estradiol inducida por la forskolina sin cambios significativos en el contenido de AMPc sugiere que los efectos inhibitorios de este sistema de cinasas sobre la esteroidogénesis se lleven a cabo sin afectar la actividad de la subunidad catalítica de la adenilato ciclase. Sin embargo, la propiedad de TPA de inhibir la acumulación de AMPc inducida tanto por la FSH como por la toxina del cólera sugiere que PKC, de manera similar que la Prl, afecte el acoplamiento del receptor de la FSH a la proteína Gs o altere las propiedades de afinidad de estos receptores en la membrana de las células de la granulosa. La observación, en este estudio, de la restauración de la actividad estimuladora de la FSH sobre la síntesis de estradiol y de AMPc en cultivos incubados en la presencia de calostina C, establece la posibilidad de que la Prl interfiera en parte con la esteroidogénesis a través de un mecanismo dependiente de PKC. Sin



**Figura 4.** Efecto de calostina C sobre la respuesta a FSH en presencia de Prl (A) y TPA (B) sobre la síntesis de estradiol (■) y acumulación de AMPc (□). Previa la adición de FSH (5 mUI) y Prl (0.1  $\mu$ g/ml) o TPA (0.5nM) las células de la granulosa fueron preincubadas en presencia de calostina C durante 30 min  $p < 0.05$  vs. control.



**Figura 5.** Curvas de desplazamiento (A) y gráficas de Scatchard (B) de la unión de  $[^{125}\text{I}]$  FSH a su receptor de membrana en células de la granulosa en ausencia (●) o presencia de Prl (▲) o TPA (□).

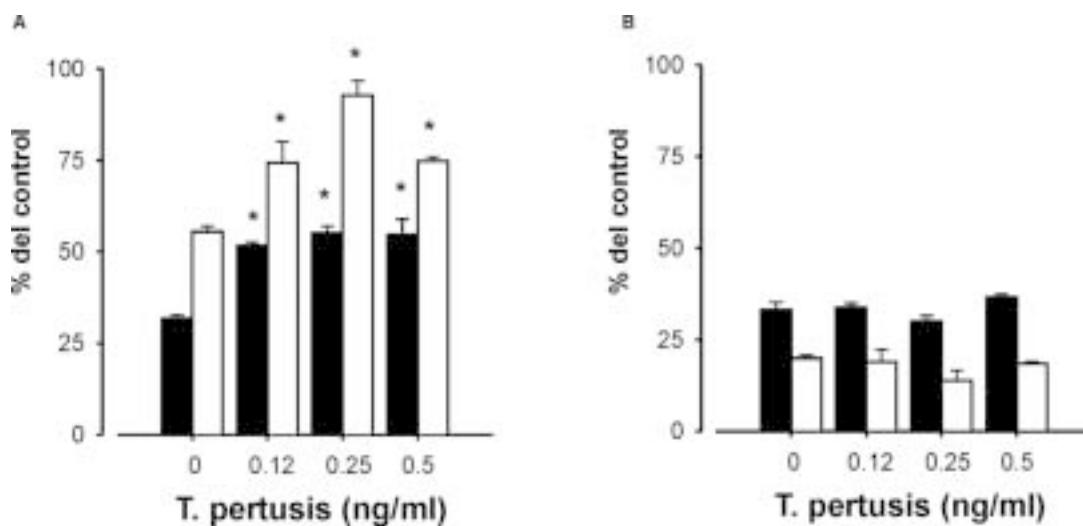
embargo como se mencionó anteriormente, la ausencia de efectos de PKC sobre la generación de AMPc inducida por forskolina sugiere la participación de vías de señalización adicionales e independientes de PKC involucradas en las acciones de la Prl sobre la esteroidogénesis ovárica.

Para el caso del receptor de la FSH, la activación farmacológica de PKC, con ésteres de forbol, aumenta la tasa de fosforilación del receptor<sup>19</sup> a través de la participación de otras cinasas asociadas con la fosforilación de receptores acoplados a proteínas G (GRKS).<sup>20,21</sup> La fosforilación del receptor incrementó su afinidad por proteínas inhibitorias de las señales de transducción mediadas por el ligando (FSH) conocidas como arrestinas,<sup>22</sup> representando un probable mecanismo de acción de la Prl mediado por PKC para explicar sus efectos sobre la síntesis de estradiol en las células de la granulosa. A este respecto, la falta de efectos de la Prl y TPA sobre las propiedades de afinidad y el número de sitios de unión del receptor de la FSH hacen difícil establecer, en este estudio, a la fosforilación del receptor como el mecanismo responsable de sus acciones inhibitorias sobre la esteroidogénesis ovárica. Sin embargo, nuestro estudio no descarta la posibilidad de alteraciones en los mecanismos de acoplamiento del receptor de la FSH a proteínas Gs inducidas por la Prl y PKC, respectivamente.

En este estudio, tanto la Prl como la PKC inhibieron de manera significativa la síntesis de estradiol inducida por el análogo no hidrolizable del AMPc. Esta observación sugiere que los efectos de estos dos compuestos ocurrían también a un nivel posterior a la generación del nucleótido cíclico. A este respecto, se han demostrado en células de la granulosa efectos inhibitorios similares a los de Prl y PKC con el uso de otros ligandos como el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y la neurohormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias (GnRH),<sup>23</sup> sugiriendo la asociación entre receptores acoplados a proteínas G con aquéllos acoplados o con actividad intrínseca de cinasa de tirosinas. El receptor de insulina y el receptor  $\beta$  adrenérgico representan el mejor ejemplo de esta asociación, ya que la

insulina inhibe la acumulación de AMP cíclico inducida por la epinefrina.<sup>24</sup> De manera interesante, el tratamiento con toxina pertusis bloquea algunos de los efectos mediados por la insulina sobre el receptor adrenérgico tales como la inhibición de la adenilato ciclase.<sup>25</sup> Estas observaciones sugieren que el receptor de insulina y los receptores acoplados a proteínas Gi utilizan mecanismos de señalización intracelular similares, incluyendo la fosforilación de tirosinas y la generación de subunidades G $\beta\gamma$  derivadas de proteínas G sensibles a la toxina pertusis. En este estudio, la posibilidad de una asociación entre el receptor de la Prl y el receptor de la FSH a través de interactuar con proteínas Gi se investigó en incubaciones de células de la granulosa en presencia de toxina pertusis. Los resultados fueron consistentes con la participación de proteínas Gi en los mecanismos de acción inhibitoria de la Prl sobre la actividad esteroidogénica de la FSH en las células de la granulosa. Este mecanismo, además de explicar las acciones de la Prl previas a la generación de AMPc, ofrece también la posibilidad de comprender los efectos de esta hormona a través de mecanismos independientes de la generación del nucleótido cíclico. En efecto, la demostración de la participación de las cinasas Src que actuando corriente abajo a la generación de las subunidades G $\beta\gamma$  para la activación de las cinasas de proteínas activadoras de la mitosis (MAPK),<sup>26-28</sup> sugiere a este mecanismo, producto de la activación de Gi, como un sitio de convergencia entre receptores acoplados a cinasas de tirosinas y aquéllos acoplados a proteínas G.

En resumen, este estudio permite establecer los sitios probables de acción de la Prl sobre la esteroidogénesis en las células de la granulosa previos y posteriores a la generación de AMPc. El mecanismo de acción de esta hormona es complejo e involucró procesos relacionados tanto con la activación de receptores acoplados a cinasas de tirosinas, como con aquéllos acoplados a proteínas G y PKC. Entre éstos, alteraciones sobre la subunidad catalítica de la adenilato ciclase, así como los derivados de la interacción con proteínas Gi y activación de las



**Figura 6.** Efecto de la toxina pertusis sobre la respuesta a FSH en presencia de Prl (A) y TPA (B) sobre la síntesis de estradiol (■) y acumulación de AMPC (□). Los resultados están expresados como la media  $\pm$  DE. \*  $p < 0.05$  vs. control.

cinasas de MAP, representan muy probablemente los sitios de la acción inhibitoria de la Prl sobre la esteroidogénesis ovárica.

## Agradecimientos

Los autores desean expresar su agradecimiento al *National Hormone and Pituitary Program, the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, the National Institute of Child Health and Human Development, and the U.S. Department of Agriculture* por la donación de las preparaciones purificadas de FSH y Prl humanas, así como por el anticuerpo específico para AMPc.

## Referencias

- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 2000;80:1523-1631.
- Kelly PA, Djiane J, Postel-Vinay MC, Edery M. The prolactin/growth hormone receptor family. *Endocr Rev* 1991;12:235-251.
- Nagano M, Kelly PA. Tissue distribution and regulation of rat prolactin receptor gene expression. *J Biol Chem* 1994;269:13337-13345.
- Veldhuis JD, Klase P, Hammond JM. Divergent effects of prolactin upon steroidogenesis by porcine granulosa cells in vitro: influence of citodifferentiation. *Endocrinology* 1980;107:42-46.
- Krasnow JS, Hickey GJ, Richards JS. Regulation of aromatase mRNA and estradiol biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Mol Endocrinol* 1990;4:13-22.
- Villanueva LA, Méndez I, Ampuero S, Larrea F. The prolactin inhibition of follicle stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol Hum Reprod* 1996;2:725-731.
- Jia XC, Hsueh JW. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating validation and application of the method. *Endocrinology* 1986;119:1570-1577.
- Larrea F, Sandoval JL, Salinas E, Franco-Rodríguez VA, Méndez I, Ulloa-Aguirre A. Evidence for an altered luteinizing hormone sensitivity to naloxone in pathological hyperprolactinaemia. *Clin Endocrinol* 1995;43:591-600.
- Knecht M, Katz MS, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone inhibits cyclic nucleotide accumulation in cultured granulosa cells. *J Biol Chem* 1981;256:34-36.
- Guevara-Aguirre J, Schoener G, Ulloa-Aguirre A, Pérez-Palacios G, Larrea F. Induced hyperprolactinaemia does not alter FSH binding or ABP secretion in the rat testis. *Int J Androl* 1986;9:381-392.
- Scatchard G. The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci* 1949;51:660-672.
- Wang C, Hsueh AJW, Erickson GF. Prolactin inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 1980;20:135-144.
- Dorrington JH, Gore-Langton RE. Prolactin inhibits oestrogen synthesis in the ovary. *Nature* 1981;290:600-602.
- Dorrington JH, Gore-Langton RE. Antagonadal action of prolactin: further studies on the mechanisms of inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in rat granulosa cells in culture. *Endocrinology* 1982;110:1701-1707.
- He H, Herington AC, Roupas P. Effect of protein kinase C modulation on gonadotrophin-induced granulosa cell differentiation. *Reprod Fertil Dev* 1995;7:83-95.
- Buckley AR, Crowe PO, Russel DH. Rapid activation of a protein kinase in isolated rat liver nuclei by prolactin, a known hepatic mitogen. *Proc Nat Acad Sci USA* 1998;95:8649-8652.
- Fan G, Rillema JA. Prolactin stimulation of prolactin kinase C in isolated mouse mammary gland nuclei. *Horm Metab Res* 1993;25:564-568.
- Rui H, Kirken RA, Farrar WL. Activation of receptor-associated tyrosine kinase JAK2 by prolactin. *J Biol Chem* 1994;269:5364-5368.
- Quintana J, Hipkin RW, Sánchez-Yagüe J, Ascoli M. Folliotropin (FSH) and a phorbol ester stimulate the phosphorylation of the FSH receptor in intact cells. *J Biol Chem* 1994;269:8772-8779.
- Permont RT, Inglese J, Lefkowitz RJ. Protein kinases that phosphorylate activated G protein-coupled receptors. *FASEB J* 1995;9:175-182.
- Lazari MF, Liu X, Nakamura K, Benovic JL, Ascoli M. Role of G protein-coupled receptor kinases on the agonist-induced phosphorylation and internalization of the follitropin receptor. *Mol Endocrinol* 1999;13:866-878.
- Freedman NJ, Lefkowitz RJ. Desensitization of G protein-coupled receptors. *Rec Prog Horm Res* 1996;51:319-353.
- Richards JS, Fitzpatrick SL, Clemens JW, Morris JK, Alliston T, Sirois J. Ovarian cell differentiation: a cascade of multiple hormones, cellular signals, and regulated genes. *Rec Prog Horm Res* 1995;50:223-254.
- Houslay MD. Insulin, glucagon and the receptor-mediated control of cyclic AMP accumulation in liver. *Biochem Soc Trans* 1986;14:183-193.
- Goren HJ, Northrup JK, Hollenberg MD. Action of insulin modulation by pertussis toxin in rat adipocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1985;63:1017-1022.
- Malbon CC, Karoov V. G-protein-linked receptors as tyrosine kinase substrates: new paradigms in signal integration. *Cell Signal* 1998;10:523-527.
- Igishi T, Gutkind JS. Tyrosine kinases of the Src family participate in signaling to XW kinase from both Gq and Gi-coupled receptors. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 244:5-10.
- Larrea F, Sánchez-González S, Méndez I, García-Becerra R, Cabrera V, Ulloa Aguirre A. G protein-coupled receptors as targets for prolactin actions. *Arch Med Res* 1999;30:532-543.