

Tesis Doctoral

Participación de los receptores no clásicos de estrógenos y progesterona en la función lactotropa normal y patológica

Camilletti, María Andrea

2018

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Camilletti, María Andrea. (2018). Participación de los receptores no clásicos de estrógenos y progesterona en la función lactotropa normal y patológica. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6541_Camilletti

Cita tipo Chicago:

Camilletti, María Andrea. "Participación de los receptores no clásicos de estrógenos y progesterona en la función lactotropa normal y patológica". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2018.

http://hdl.handle.net/20.500.12110/tesis_n6541_Camilletti

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Química Biológica

Participación de los receptores no clásicos de estrógenos y progesterona en la función lactotropa normal y patológica

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires en el área de Química Biológica

María Andrea Camilletti

Directora de tesis: Dra. Graciela Díaz-Torga

Consejera de estudios: Dra. Edith Kordon

Lugar de trabajo: Instituto de Biología y Medicina Experimental (IBYME-CONICET).

Buenos Aires, Diciembre 2018

Participación de los receptores no clásicos de estrógenos y progesterona en la función lactotropa normal y patológica

El rol mitogénico de los estrógenos, actuando sobre sus receptores clásicos ER α y ER β sobre los lactotropos, se encuentra bien documentado en la bibliografía. Sin embargo, se desconocía hasta el momento el rol del GPER sobre la función lactotropa. Por otro lado, el rol de la progesterona (P4) en la función normal y patológica del lactotrofo es aún controversial. Postulamos que esta controversia puede deberse al uso de distintos modelos animales con diferentes entornos hormonales y a los receptores de P4 involucrados en las acciones de la misma. En los últimos años ha sido descrito un grupo de receptores de progesterona de membrana (mPRs), asociados a efectos rápidos, no genómicos, de la P4. Los mPRs (mPR α , - β , - γ , - δ y - ϵ) pertenecen a la familia de receptores de progestinas y adiponectinas (PAQR) y son receptores de 7 pasos transmembrana acoplados a proteínas G. Hasta el presente se desconoce la participación de los mismos en la regulación ejercida por P4 sobre el lactotrofo. En el presente trabajo, demostramos que los mPRs se encuentran expresados en hipófisis, siendo mPR α y mPR β los de mayor expresión. Llamativamente, un gran porcentaje de células adenohipofisarias mPR α -positivas resultaron ser también prolactina (PRL)-positivas (lactotropos). En búsqueda de la función de los mPRs en lactotropos, demostramos con el uso de un agonista selectivo de mPR α/β : Org OD 02-0 (10-etenil-19-norprogesterona), que la activación de mPR α inhibe la secreción de PRL (*in vitro*, *ex vivo* e *in vivo*). Estudiamos las vías de señalización intracelulares implicadas luego de la activación específica de mPR α describiendo un mecanismo novel mediado por TGF β 1, un potente inhibidor de la función lactotropa. Por otra parte, sabiendo que P4 actúa también a nivel hipotalámico, estudiamos la expresión y funcionalidad de los mPRs en la liberación de dopamina (DA). Nuestros resultados muestran una notable participación de dichos receptores (altamente expresados en hipotálamo) estimulando la secreción de DA, el factor inhibitorio por excelencia de la síntesis y secreción de PRL. Caracterizamos también la participación de los mPRs hipofisarios en condiciones patológicas. Encontramos, en tres modelos de prolactinoma (ratas DES, ratones hCG β + y ratones Drd2KO), que, si bien la expresión de los mPRs se encontraba disminuida

respecto a sus contrapartes WT, la proporción relativa de mPRs respecto al total de receptores de P4 se encontraba significativamente incrementada en los prolactinomas. De hecho, un tratamiento agudo con Org OD 02-0 (*in vivo* y *ex vivo*) en ratones hembra Drd2KO fue capaz de reducir los elevados niveles de PRL en este modelo experimental de prolactinomas resistentes.

Finalmente, observamos en el modelo experimental de prolactinoma generado en ratas tratadas crónicamente con estrógenos (ratas DES), que un tratamiento con P4 (4 semanas) sólo revertía los parámetros tumorales en aquellas hembras previamente ovariectomizadas (OVX). Esto podría deberse: *i-* al aumento significativo en la expresión hipofisaria de mPR α y mPR β frente a una OVX (estudiamos la regulación que ejercen los esteroides ováricos sobre la expresión hipofisaria de los mPRs); *ii-* a que, como ya fuera mencionado, P4 inhibe PRL vía mPRs.

Otro hallazgo interesante de este experimento fue la observación de que hembras que habían sido previamente OVX desarrollaban tumores de mayor tamaño (OVX-DES) respecto a las ratas intactas con tratamiento DES. Estos resultados nos llevaron a evaluar cómo se modificaba la expresión de receptores clásicos y no clásicos de estrógenos luego de una OVX. Describimos por primera vez en la literatura la expresión y función del receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) en lactotropos. Ensayamos su regulación por estrógenos y progesterona, así como la alteración de su proporción frente a una ovariectomía, sugiriendo la implicancia de GPER en efectos proliferativos de los estrógenos en hembras OVX.

Palabras clave: progesterona, receptores, estrógenos, hipófisis, prolactina

Participation of estrogens and progesterone non-classic receptors in normal and pathological function of lactotrophs

The role of estradiol (E2) in the development of prolactinomas has been extensively studied mainly through its classical receptors ER α and ER β . However, the involvement of the G-protein coupled estrogen receptor (GPER) in E2-actions on the lactotroph population remains unknown. On the other hand, the role of progesterone (P4) on the function of normal and pathological lactotrophs remains controversial. This controversy is related to the use of different animal models but most likely, for the P4-receptor type involved in its actions. Besides the classic nuclear receptors (nPRs), a novel group of membrane progesterone receptors (mPRs) involved in rapid non-genomic P4 actions was described in the last years. The mPRs (subtypes α , $-\beta$, $-\gamma$, $-\delta$ γ $-\epsilon$) belong to the progestin and adipoQ receptors family (PAQR) and correspond to 7-transmembrane G-protein coupled receptors. They have been previously described in many cell types (*e.g.* gametes, lymphocytes) but the functions of these receptors in the pituitary gland remains unknown. In the present study, we demonstrated that all mPRs are expressed in the anterior pituitary gland, with *mPR α* being the most abundant. Interestingly, about 60% of the *mPR α* -positive cells were also prolactin (PRL)-positive cells (lactotrophs), suggesting a role for this receptor in this cell-type population. In fact, with the use of Org OD 02-0, an mPR specific agonist with no nPR activity, we demonstrated that the activation of *mPR α* with Org OD 02-0 *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* inhibits PRL secretion. Regarding the intracellular signaling pathways behind this mPR action on lactotrophs, we found a novel mechanism mediated by the activation of Transforming Growth Factor β 1 (TGF β 1), a known inhibitor of lactotroph function. Also, as P4 was described to act on the pituitary indirectly through the hypothalamus, the expression of mPRs in hypothalamic tissue and their role on dopamine (DA) released were examined. Our results showed that mPRs were highly expressed in the hypothalamus where they mediate P4-stimulation of DA, the main inhibitor of PRL synthesis and secretion. In addition, we studied pituitary mPRs under pathological conditions. In three different

models of prolactinoma (DES rats, hCG β + mice and Drd2KO mice) we found reduced mPRs expression in the tumoral pituitaries compared to normal ones. However, the relative of proportion of mPRs (respect to total P4 receptors) was found significantly increased in tumoral pituitaries. In fact, an *in vivo* treatment with Org OD 02-0 (*in vivo* and *ex vivo*) reduced PRL levels in female Drd2 KO mice demonstrating a rapid effect mediated by mPRs.

Finally, in the DES-rats model (chronically treated with estrogens) we found that a treatment with P4 (4 weeks) prevented the tumor formation only in rats previously ovariectomized (OVX). This may be explained due to: *i*- the increased expression of mPR α y mPR β in OVX rats compared to control rats and *ii*- the P4 inhibitory effect on PRL mediated by mPRs in the rat pituitary.

Another interesting finding from this experiment was the observation that OVX rats displayed larger prolactinomas with higher hiperprolactinemia than intact control rats (OVX DES vs. DES). With these results we next explored if the expression of classical and/or non-classical estrogen receptors after an OVX. In the last chapter of the thesis, we described for the first time the expression and function of GPER in lactotrophs, its regulation by estrogens and progesterone and after an OVX, suggesting a role for GPER in estrogen proliferative effects in OVX rats.

Key words: progesterone, pituitary, prolactin, estrogens, receptors

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a quienes compartieron bien de cerca todos estos años de laburo. **A mis amigas-colegas del laboratorio de Fisiopatología Hormonal, Eri, Ale y Gra.** ¡Todo es más fácil y divertido con ustedes al lado! Gracias por estar siempre dispuestas a aconsejar, escuchar y compartir cosas ricas. Las quiero muchísimo!

Eri: Como aprendimos la una de la otra... Moldeamos nuestros caminos doctorales bien a la par, con algunas dificultades que transformamos en aprendizaje y crecimiento personal. Gracias por enseñarme a pelear por lo que uno quiere, a ser decidida. Te quiero mucho!

Ale: Gracias por estar SIEMPRE, escucharme contar las mil y una veces mis historias de fin de semana, ser incondicional y bien dispuesta para todo. Fuiste mi mano derecha desde mi tesina y hasta terminar el doctorado. Te adoro más de lo que imaginas!

Gra: Mi mentora, mamá científica, jefa y mucho más. Me abriste las puertas de tu laboratorio hace ya casi 7 años. Increíble lo rápido que pasó todo este tiempo y a la vez siento que fue un montón. Igualito que una mamá, me enseñaste y me viste crecer en el mundo de la ciencia. Me acompañaste de modo incondicional, a todo nivel. Los frutos de estos años compartidos de trabajo se reflejan y seguirán apareciendo en los años venideros. TE quiero muchísimo!!

A las DIVAS del IBYME!! Grandes amigas que me regaló esta experiencia. Qué lindo grupo formamos! Nuestra Amistad va más allá de lo científico, ya que disfrutamos de compartir momentos de festejo y alegría; aunque también nos acompañamos en las frustraciones y tristezas. Stefita: mi compinche y amiga, estar con ella es diversión asegurada. Nadie entiende como pero ella puede estar largando 3 ensayos a la vez, escucharte y todo con una sonrisa. Feli: Desde la facu al IBYME sin escalas, nos hicimos grandes amigas y sé que cuento con vos siempre, para escucharme y reírnos juntas. Wee, la más dulce (aunque intente esconderlo) y cariñosa, estos últimos años te sentí como una más del labo, compañera infaltable de los almuerzos y meriendas. Guille: mi modelo a seguir, laboradora, responsable, buena amiga y siempre dispuesta (cuando no está trabajando hasta largas horas) de juntarse a compartir. Nanu: Nunca faltan los encuentros en Maru Botana para ponernos al día y reírnos con alguna torta de por medio. Mi compañera de RIAs, siempre tan buena y dispuesta a escuchar. Noe: Siempre sonriente y con buena onda, aunque esté estresada y a mil, un mate y charlas entre amigas y todo solucionado. Cata: Hace poquito nos conocemos pero te sumaste rápido a las DIVAS y a nuestros encuentros y salidas con la mejor onda. Belu: La persona con más suerte del universo que conozco, siempre alegre, de buen humor. La chef #1 de tortas de las DIVAS.

A toda la gente del IBYME y en especial al laboratorio Libertun-Lux y al laboratorio Becú quienes me dieron una mano cuando necesité reactivos, consejos o protocolos. Muchísimas gracias! El instituto es un gran lugar para trabajar, con gente solidaria y dispuesta a dar una mano cuando se los necesita!

Al grupo de Neuroendocrinología de la Facultad de Medicina: a Dani, Santi y Jime. Dani: Gracias por abrirme las puertas de tu laboratorio tan generosamente y por interesarte en nuestro Proyecto! Santi: Gracias por darnos una mano cada vez que necesitamos largar un ensayo y soportar nuestras charlas de chicas! Jime: Tu motivación por la ciencia y en este proyecto me dio un empujón para seguir adelante con más pilas y entusiasmo. Sos un gran investigadora, y tuve la suerte de aprender al lado tuyo. Sé que aun estando lejos, cuento con vos siempre. Te extraño! Y te quiero un montón!!!

Al grupo de Córdoba! Silvina, Pablo y Joni. Su aporte en las técnicas histológicas fue fundamental y gracias a ustedes pudimos publicar y recolectar los frutos del trabajo realizado. Muchas gracias a los tres!!!

Gracias **a mis amigos de la vida**, personitas únicas que hacen mis días más divertidos y alegres. A las chengues, incondicionales, mis amigas desde hace ya 26 años. A Eli, mi gran amiguita que me dio la vida, compañera de viajes y aventuras. A Agos, mi amiguita cordobesa única y graciosa, compinche y la más fiel! Como nos divertimos en los primeros años del doctorado! A Celi, mamá del pimpollo de Valu mi ahijadita, mi amiga desde hace ya casi 12 años, seguimos compartiendo el crecimiento y las etapas de la vida de cada una. A las Wandas: Majo, Agos y Cande! Las quieroo! A mis amiguitos de la facu, Nico (pelu) y Lu, las bellas y la bestia jaja los adoro!! A la gente de la facu que hace tiempo que no veo pero que llevo en mis más lindos recuerdos de la etapa facultativa: a Dani, Osval, Puche, Pablito, Maxi, Sil, Guille, Pucho, Marian, Pao.

Gracias **a mi familia** paterna y materna. A mi tía Susana, tengo el más lindo de los recuerdos de mi infancia, jugando a las barbies, siempre teniéndome una paciencia increíble. Siempre estás tía!, A mi tío Javi: que me banca en todas, me escucha y es de fierro. Compartimos el amor por la naturaleza, la música, y las buenas historias con mate de por medio. Te quiero mucho tío!, A mi tía Betina: Dulce y cariñosa, una mamaza, siempre presente demostrándome su amor. Los adoro a vos y a Javi y a la hermosa familia que formaron. Gracias por dejarme ser madrina de su pimpollito menor 😊 mi linda Maite. Gracias a mi tío y padrino Emi, siempre pendiente de mis logros, acompañándome en cada etapa, te quiero mucho! A Cari, que un solito y es prácticamente de la familia. Qué lindo es tenerte cerquita de vuelta! A mis tías abuelas: Juana, Elvira y Stella: divertidas y locas, gracias por el amor a su hermana Betty (mi abuela) y por estar siempre! A mis primas y primos, hace que las reuniones familiares sean más divertidas y llenas de juegos! Flor y Stelly mis sagitarianas preferidas. Las quiero tantísimo!

A mis abuelas, Betty y Olga, a quienes les dedico esta tesis. Gracias por criarme y enseñarme que la vida es una sola, y hay que disfrutar cada momento, cada minuto. Me demostraron con el ejemplo que podemos lograr lo que queramos, si ponemos el corazón en ello. Fueron grandes mujeres; y sé que están orgullosas de la mujer que hoy soy. Se que son mis guías y seguirán acompañándome desde el cielo a cada paso que dé. Las amo y prometo honrarlas en cada uno de mis momentos.

Finalmente quiero agradecer en esta tesis **a mi hermosa familia y a Luquitas**. Son mi sostén, mi cable a tierra, mi casa y mi lugar seguro. Papá, mamá, Rochi, Lucas: Gracias por su AMOR que me ayuda y sostiene a cada paso que doy.

Papuchi: Me enseñaste a disfrutar de la buena vida, a no quejarme, a ver lo lindo de las cosas. Estás atento a cada necesidad y a cada momento, acompañando con amor, como cuando cambiaste el pasaje para venir a verme a la Endo, y hasta te viniste hasta Texas para que hagamos un viajecito juntos durante mi estadía de Beca! Gracias por darme tanto sin pedir nunca nada a cambio. Tengo tanta suerte de tener un papá como vos!

Mamita: Me transmitiste tu amor por la docencia y las ciencias de la vida. Me enseñaste que no hay edad para crecer y superarse. Gracias por iniciarme en este camino de la ciencia, por tu mirada crítica de esta tesis, por escuchar con atención cada una de las prácticas de presentaciones orales, por demostrarme tu amor a través de charlas, mimos de madre, un plato de algo rico o palabras de aliento. Qué lindo es tenerte en mi vida!

Rochita, mi chiki hermosa, mi hermana, mi mitad y mi todo. La persona que más me conoce en el mundo. Tenerte de hermana es lo más lindo que hay, sos graciosa, divertida, pata, cariñosa, artista, sincera. Nunca dudes de vos misma, sos tan valiosa! Gracias por acompañarme en este camino, escuchar mis historias de laboratorio, hacerme de psicóloga más de una vez! Te quiero tanto ñery!

A Mi lindo Luquitas, el mejor vecino que me pudo tocar! Je. Desde que llegaste a mi vida, los momentos tristes son más llevaderos, las frustraciones me cuestan menos y todos mis días son más felices!! Mudarnos juntos fue un desafío para mí, y sin embargo, hoy no me imagino viviendo sin vos al lado, sin los gatis o sin Jaz, la peque más dulce y buena que existe. Me hacés muy feliz!!! Gracias por el aguante de todos los días, por darme el espacio cuando necesité enfrascarme con la tesis, o corregir exámenes a altas horas de la noche, por tu apoyo incondicional...Gracias por cuidarme y mimarme tanto.

Te quiero hasta el infinito y más allá!

*“Felicidad no es hacer lo que uno quiere,
sino querer lo que uno hace”*

Jean-Paul Sartre

A mis abuelas, con amor

Los resultados presentados en esta tesis forman parte de las siguientes publicaciones:

- 1- **“Participation of the mPR α in the inhibitory effect of progesterone on prolactin secretion”**. *María Andrea Camilletti*, Jimena Ferraris, Alejandra Abeledo-Machado, Aubrey Converse, Erika Faraoni, Daniel Pisera, Silvina Gutierrez; Peter Thomas y Graciela Díaz-Torga. **J Neuroendocrinol. 2018 Jun 5:e12614. doi: 10.1111/jne.12614. PMID: 29869822**

- 2- **“Role of GPER in the anterior pituitary gland, focusing on lactotroph function”**. *María Andrea Camilletti*, Alejandra Abeledo-Machado, Jimena Ferraris, Erika Y. Faraoni, Pablo Pérez, Daniel Pisera, Silvina Gutiérrez, y Graciela Díaz-Torga. **Journal of Endocrinology, 2018, <http://dx.doi.org/10.1530/JOE-18-0402>**

- 3- **“mPRs represent a novel target for PRL inhibition in experimental prolactinomas”**. *María Andrea Camilletti*, Alejandra Abeledo-Machada, Erika Y. Faraoni, Fernanda De Fino, Susana B. Rulli, Jimena Ferraris, Daniel Pisera, Peter Thomas y Graciela Díaz-Torga. **Endocrine Related Cancer, 2018, ERC-18-0409.R1**

ABREVIATURAS UTILIZADAS:

AC	Adenilato ciclase
ADNc	ADN copia
AMPC	Adenosín Monofosfato cíclico
ANOVA	Análisis de la varianza
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
BSA	Seroalbúmina bovina
c.p.m.	Cuentas por millón
Ct	ciclo umbral
DA	Dopamina
DES	Dietilestilbestrol
DTT	Ditiotreitol
E2	Estradiol
EA	Albúmina de huevo
EDTA	Ácido etilendiaminotetra-acético
ELISA	Ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas
ER	Receptor de estrógenos
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
ES	Error estándar
g	Gramos
Gper	Receptor de estrógenos acoplado a proteína G
HRP	Peroxidasa de rabanito
hs	Horas
i.p.	Intraperitoneal
IgG	Inmunoglobulina gamma
kDa	Kilo Dalton
kg	Kilogramo
KO	Knockout
mA	Mili Ampere
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramo
µg	Microgramo
min	Minutos
µL	Microlitro
µM	Micromolar
ml	Mililitro
mM	Milimolar
mPRα	Receptor de progesterona de membrana alfa
ng	Nanogramo
NIH	Instituto nacional de la salud de los Estados Unidos
nPR	Receptor nuclear de progesterona
NRS	Suero normal de conejo
ns	No significativo

OVX	Ovariectomía
P4	Progesterona
pb	Pares de bases
PBS	<i>Buffer</i> fosfato salino
PBS-T	PBS con <i>Tween</i> 0.05%
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pg	Picogramo
PHDA	Neuronas peri ventricular hipofisarias dopaminérgicas
PM	Peso molecular
PR	Receptores de progesterona
PRL	Prolactina
RD2	Receptor de dopamina D2
RIA	Radioinmunoensayo
RPM	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	Real Time PCR
s.c.	Subcutáneo
SD	Sprague Dawley
SDS	Dodecil sulfato de sodio
T.amb.	Temperatura ambiente
TGF-β1	Factor de crecimiento transformante β 1
TH	Tirosina Hidroxilasa
THDA	Neuronas tuberohipofisarias dopaminérgicas
TIDA	Neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas
TMB	3, 3',5 ,5'-Tetrametilbencidina
u.a.	Unidades arbitrarias
VIP	Péptido intestinal vasoactivo
Vs.	Versus
WB	<i>Western Blot</i>
WT	<i>Wild-type</i> (salvaje)

INDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	16
Sistema neuroendocrino.....	16
Eje hipotálamo-hipófisis	17
Hormona prolactina (PRL).....	18
Regulación de PRL.....	19
Tumores hipofisarios	23
Prolactinomas	24
Participación de esteroides sexuales en el desarrollo de prolactinomas.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Modelos animales.....	36
Tratamientos <i>in vivo</i>	36
Ensayos <i>ex vivo</i>	37
TECNICAS UTILIZADAS.....	44
INTRODUCCION CAPITULO 1	59
RESULTADOS CAPITULO 1.....	62
Expresión de los mPRs en hipófisis.....	62
mPRs en células GH3.....	67
Estudios de mecanismos de señalización celular	70
Mecanismo novel de señalización de los mPRs implicado en la inhibición de PRL.....	72
Efecto de P4, O2 y R5020 en la activación de TGFβ1 en células GH3	74
Vías de señalización involucradas en la activación de TGFβ1.....	76
Acción de progesterona en el hipotálamo mediada por mPRs	78
CONCLUSIONES CAPITULO 1.....	81
DISCUSION DEL CAPITULO 1	81
INTRODUCCION CAPITULO 2	87
RESULTADOS CAPÍTULO 2.....	94
Impacto de la OVX en la expresión de los mPRs en hipófisis.....	94
CONCLUSIONES CAPITULO 2.....	101
DISCUSIÓN CAPITULO 2	101
INTRODUCCION CAPITULO 3	105
RESULTADOS CAPITULO 3:.....	109
Expresión de mPRs en tres modelos de prolactinoma	109
Diferencias sexuales en la expresión de mPRs en hipófisis	113
Expresión de mPRs en hipotálamo de ratón.....	116

Efecto de un tratamiento <i>in vivo</i> con Org OD 02-0, sobre los niveles de PRL sérica en ratones Drd2KO.....	117
CONCLUSIONES CAPÍTULO 3.....	119
DISCUSION DEL CAPITULO 3	120
INTRODUCCION CAPITULO 4	125
RESULTADOS CAPITULO 4.....	128
La ovariectomía facilita el desarrollo de un prolactinoma experimental inducido por estrógenos.....	128
GPER en hipófisis: expresión y localización en las células lactotropas	130
Regulación de <i>Gper</i> por estradiol y progesterona	134
La OVX incrementa el porcentaje de células GPER-positivas en la población lactotropa	136
Localización subcelular de GPER en diferentes subtipos morfológicos de lactotropos	137
La activación de <i>Gper</i> <i>in vitro</i> y <i>ex vivo</i> induce liberación de PRL	140
CONCLUSIONES CAPITULO 4.....	141
DISCUSION DEL CAPITULO 4	142
DISCUSION GENERAL	148
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	153

INTRODUCCION GENERAL

INTRODUCCIÓN GENERAL

Sistema neuroendocrino

El sistema neuroendocrino está formado fundamentalmente por dos estructuras principales: el hipotálamo y la hipófisis. Ambas forman una unidad funcional capaz de regular la producción hormonal para adaptarse a las necesidades del organismo (Kapprara & Huhtaniemi, 2018).

El hipotálamo es una estructura encefálica que forma parte del centro neuroendocrino primario de regulación hormonal y que se relaciona mediante numerosas vías nerviosas a otros centros encefálicos tales como el tálamo, el hipocampo, la amígdala, el septum, la formación reticular, el quiasma óptico, el bulbo olfatorio e incluso zonas de la corteza cerebral como la corteza prefrontal y la olfatoria. Sin embargo, es a través de su íntima relación con la hipófisis como regula la homeostasis interna, el crecimiento y la reproducción, y permite por lo tanto la supervivencia de la especie.

La hipófisis o glándula pituitaria es una estructura pequeña (de aproximadamente 0,5 g en el hombre) que se encuentra en una posición protegida entre el paladar y la base del encéfalo en un espacio óseo llamado silla turca del hueso esfenoides. Está conformada por dos lóbulos, el lóbulo anterior y el lóbulo posterior. En el lóbulo anterior o adenohipófisis, a nivel histológico encontramos tres zonas características: la *pars distalis* que constituye el 80% de la glándula, la *pars intermedia* la cual está formada principalmente por los melanotropos los cuales secretan la hormona melanocito-estimulante (MSH), y la *pars tuberalis*, presente únicamente en vertebrados tetrápodos.

La *pars distalis* está compuesta por células secretoras que pueden clasificarse según la hormona que secretan en:

- Somatotropas: secretoras de GH;

- Lactotropas: secretoras de prolactina (PRL);
- Corticotropas secretoras de adenocorticotrofina (ACTH);
- Tirotropas: secretoras de tirotrófina (TSH); y
- Gonadotropas: secretoras de hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH).

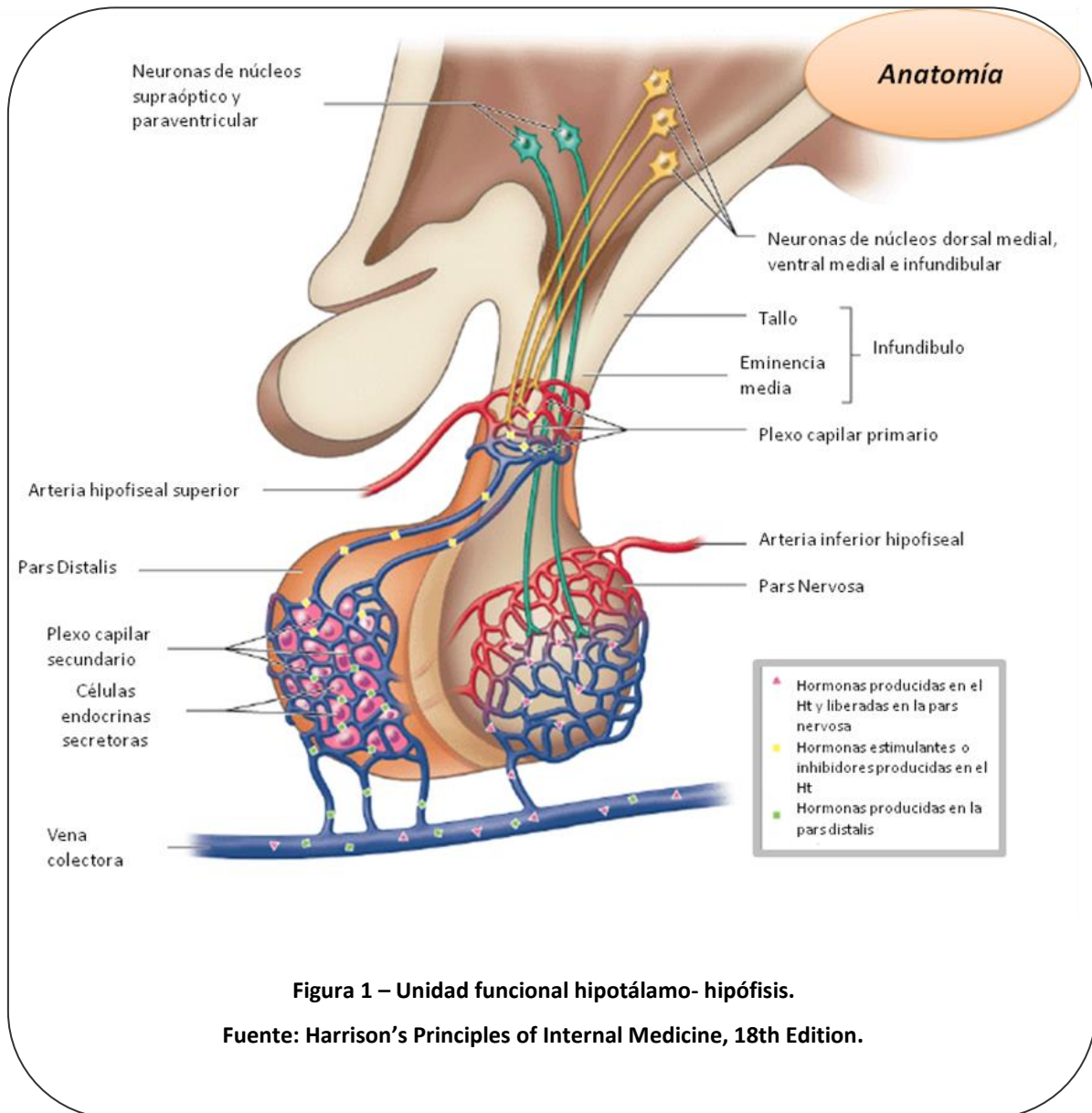
Otro tipo celular presente en la *pars distalis* son las células folículo estrelladas, no secretoras de hormonas, pero que sintetizan numerosos factores con funciones autocrinas y paracrinas (Horvath & Kovacs, 2002; Inoue, Couch, Takano, & Ogawa, 1999).

A diferencia de los anteriores, el lóbulo posterior o neurohipófisis presenta características bastantes disímiles. Se origina en el piso del diencefalo y constituye un órgano neurohemal. Se puede subdividir anatómicamente en: la eminencia media, conectada directamente con el hipotálamo; el tallo infundibular, que junto con la *pars tuberalis* forman el tallo hipofisario; y la *pars nervosa*, formada por las terminales axónicas de neuronas cuyos cuerpos neuronales se encuentran en los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico. Estas neuronas sintetizan las neurohormonas oxitocina y vasopresina, las cuales son almacenadas en la *pars nervosa* y finalmente secretadas frente a estímulos específicos.

Eje hipotálamo-hipófisis

El hipotálamo sintetiza y secreta numerosos factores que controlan la función hipofisaria, alcanzando la glándula mediante los sistemas porta de la eminencia media y del lóbulo posterior. Fibras hipotalámicas provenientes de neuronas cuyos cuerpos se encuentran en el núcleo arcuato, el área preóptica, supraóptica y paraventricular llegan a la eminencia media estableciendo estrecho contacto con el plexo capilar de la arteria hipofisaria superior dando origen al sistema porta primario de vasos largos. En este contacto, las neuronas liberan sus neurohormonas a la sangre portal. Los vasos largos conducen estas neurosecreciones a través del tallo hipofisario hasta los capilares fenestrados del lóbulo anterior de la adenohipófisis, los que establecen contacto íntimo con las células endocrinas (Ver esquema en la Figura 1). Este sistema portal permite una

comunicación fluida y directa entre el hipotálamo y la hipófisis. (Akmayev & Popov, 1977; Takeuchi et al., 2013). Estos vasos, conteniendo la secreción final adenohipofisaria, posteriormente abandonarán la hipófisis por la vena hipofisaria anterior.



Hormona prolactina (PRL)

Al igual que la hormona del crecimiento (GH) y el lactógeno placentario (PL), la PRL forma parte de una familia de hormonas que comparten características relacionadas con su estructura, propiedades funcionales y origen genético. De naturaleza peptídica, la PRL

es sintetizada y secretada principalmente en la adenohipófisis por los lactotrofos, y en menor proporción en los somatolactotrofos. Sin embargo, se ha observado síntesis extrahipofisaria de esta hormona en otros tejidos u órganos tales como la glándula mamaria, el útero, la placenta y, en forma ocasional, en ciertos tejidos malignos.

Si bien su nombre indicaría que la principal función de la hormona es la de PROMOVER la LACTANCIA; dadas sus múltiples acciones se la considera una hormona pleiotrópica. La prolactina participa en la regulación de numerosos procesos metabólicos como ser el crecimiento y el desarrollo, la reproducción, la osmorregulación, la inmunomodulación y el comportamiento (Bole-Feysot, Goffin, Edery, Binart, & Kelly, 1998; Freeman, Kanyicska, Lerant, & Nagy, 2000; Goffin et al., 1999; Grattan, 2015).

La secreción de prolactina está afectada por numerosos estímulos, tanto externos como internos. La succión es el estímulo externo de mayor importancia. Muchos estímulos son traducidos por el hipotálamo, el cual elabora y secreta hacia la hipófisis una serie de factores liberadores o inhibidores de la secreción de PRL.

Regulación de PRL

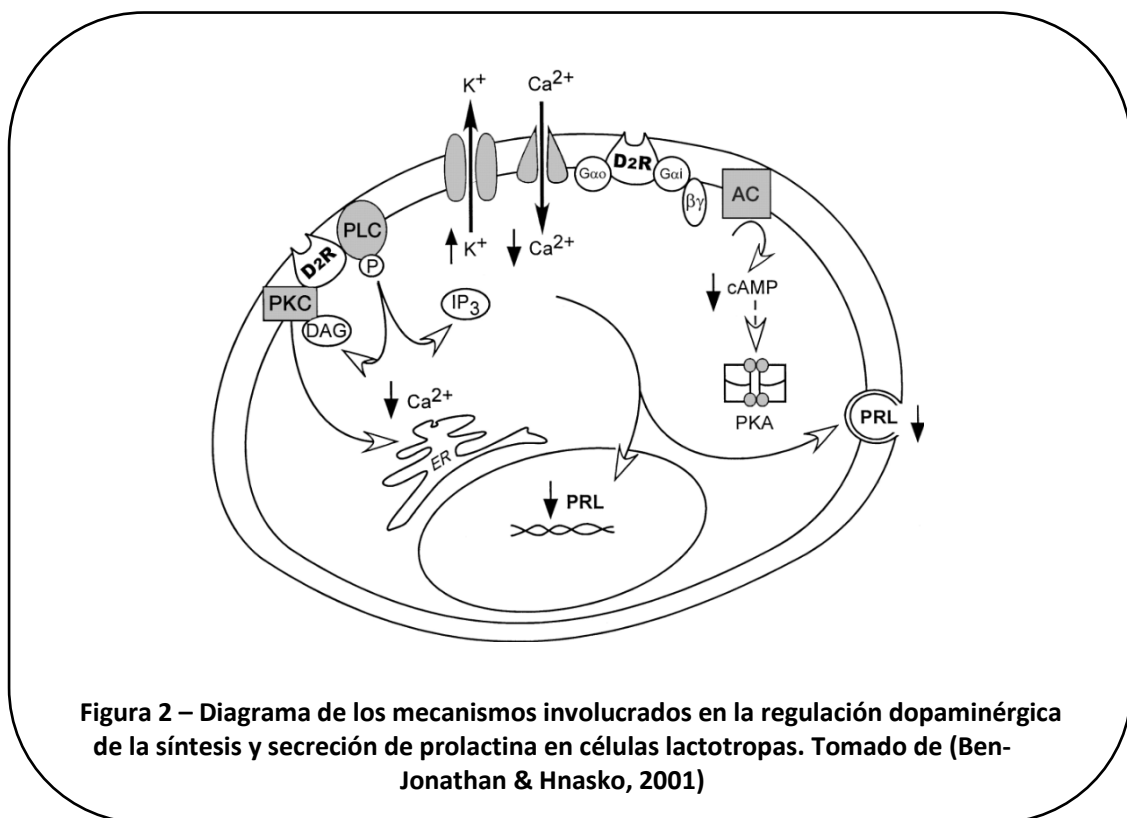
☞ DOPAMINA

La Dopamina¹ (DA) es el principal factor inhibitorio de la secreción de PRL. La secreción adenohipofisaria de esta hormona está tónicamente inhibida por los sistemas dopaminérgicos tuberoinfundibular (TIDA), tuberohipofisario (THDA) y periventricular-hipofisario (PHDA), cuyos cuerpos neuronales se encuentran en el hipotálamo medio basal y sus terminales nerviosas en la eminencia media (sistema TIDA) y en la pituitaria posterior (sistemas THDA/PHDA) (DeMaria, Lerant, & Freeman, 1999). La DA liberada por estas neuronas accede a la adenohipófisis a través de los vasos portales largos y

¹ La Dopamina (DA) es la catecolamina más abundante en el cerebro. Actúa como neurotransmisor y neuromodulador en la regulación de diferentes funciones en el sistema nervioso central y ejerce su acción por unión a receptores específicos de membrana

cortos, inhibiendo la secreción de prolactina mediante su interacción en los lactotrofos, con receptores dopaminérgicos de tipo D2. Existen múltiples mecanismos por los cuales la DA inhibe la secreción de PRL.

Como se ilustra en la Figura 2, luego de su interacción con los receptores D2, en la membrana de los lactotrofos, a los pocos segundos DA es capaz de aumentar la conductancia de potasio e inactivar los canales de calcio sensibles al voltaje, lo que resulta en una hiperpolarización de la membrana plasmática e inhibición de la liberación de PRL. Dentro de un lapso de minutos a horas, DA suprime la actividad de la enzima adenilato ciclasa, disminuye los niveles de AMPc y afecta la activación de PKA, inhibiendo la expresión del gen de PRL (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).



Luego de varios días la DA reduce el tamaño y la tasa de proliferación de los lactotrofos.

A su vez, la PRL es capaz de regular su propia liberación al actuar sobre el sistema dopaminérgico del hipotálamo. El aumento de PRL produce un aumento en la actividad

de las neuronas del sistema TIDA, mayor liberación de DA y por lo tanto, disminución en la liberación por parte de los lactotrofos (DeMaria et al., 1999). Según estudios electrofisiológicos, la prolactina es capaz de inducir un aumento de hasta cuatro veces mayor en la tasa de disparo de las neuronas TIDA en tan sólo segundos (Brown, Piet, Herbison, & Grattan, 2012; Lyons, Hellysaz, & Broberger, 2012; Romano et al., 2013).

Si bien el principal control de la secreción de PRL es inhibitorio, éste se encuentra balanceado por diversos factores estimuladores, algunos liberados por el hipotálamo, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP), la hormona liberadora de tirotrópina (TRH) y la oxitocina; otros extra-hipotalámicos como serotonina y noradrenalina, y otros provenientes de órganos periféricos, como los estrógenos ováricos (Freeman et al., 2000).

ESTRÓGENOS

Los estrógenos ováricos son indudablemente uno de los más importantes reguladores de la secreción de prolactina durante los diferentes estadios fisiológicos. Actúan como potentes estimuladores de todas las funciones del lactotrofo a diferentes niveles: (i) **a nivel hipofisario**, aumentan la síntesis de prolactina por activación génica (Lieberman et al., 1981), inducen una marcada proliferación de los lactotrofos (Kansra, Yamagata, Sneade, Foster, & Ben-Jonathan, 2005; Nolan & Levy, 2009b) y modifican la sensibilidad a diferentes activadores e inhibidores fisiológicos de la secreción de PRL (De Lean & Labrie, 1977; Raymond, Beaulieu, Labrie, & Boissier, 1978; West & Dannies, 1980); (ii) **a nivel hipotalámico**, los estrógenos regulan indirectamente la secreción de prolactina inhibiendo la actividad de las neuronas TIDA (DeMaria, Livingstone, & Freeman, 2000). Estas acciones son particularmente importantes durante el ciclo reproductivo y la preñez. Un tratamiento *in vivo* con estradiol suprime la expresión de tirosina hidroxilasa² (TH) (Blum, McEwen, & Roberts, 1987) y su actividad (Pasqualini, Guibert, & Leviel, 1993), y reduce la secreción de DA al sistema portal-hipofisario (Cramer, Parker, & Porter, 1979a) facilitando la secreción de PRL. Sumado a la regulación

² Enzima responsable de catalizar la conversión del aminoácido L-tirosina a dihidroxifenilalanina (DOPA); precursor de la dopamina

de la secreción de PRL, el estradiol también regula las respuestas celulares a prolactina. En cerebro, en general se corrobora que las neuronas que expresan el receptor de PRL también expresan el receptor clásico de estrógenos α (ER α) (Furigo et al., 2014); y el estradiol es capaz de regular la expresión del receptor de PRL en estas neuronas (Lerant & Freeman, 1998).

Las acciones estrogénicas son claramente contrarias a las de la dopamina, y del balance entre ambos factores depende en gran parte la regulación de los lactotrofos.

OTROS FACTORES

A su vez, también existe una regulación paracrina y autocrina de la función de los lactotrofos mediada por una gran variedad de factores intrahipofisarios. Alguno de los mecanismos autocrinos reportados corresponde a la PRL misma, VIP, galanina, endotelina y diversos factores de crecimiento tales como: TGF- α , TGF- β 1, TGF- β 3 y FGF-2. Específicamente en el caso de VIP y galanina, estos mecanismos contribuyen a una fuerte auto-estimulación que se evidencia en la alta síntesis constitutiva de PRL por los lactotrofos en cultivo, donde los mismos están libres de regulación exógena (Denef, 2008). TGF β 1, en cambio, es un factor autocrino inhibitorio de la síntesis y secreción de prolactina y de la proliferación celular.

Todos estos mecanismos de regulación mencionados convergen simultáneamente sobre los lactotrofos, y a su vez sensibilizan la regulación por otros factores. El balance entre todos ellos determinará la actividad secretora y proliferativa final de estas células en una condición y momento determinados. Esta regulación fina y la participación de tantos factores no resultan llamativas si se tiene en cuenta que los lactotrofos, a diferencia de la mayoría de las células adenohipofisarias que son generalmente quiescentes, mantienen en la adultez una alta tasa de proliferación. Ejemplo de ello son el incremento en el número de lactotrofos durante el estro, la preñez y la lactancia. El correcto funcionamiento de estos mecanismos resulta de suma importancia para mantener la homeostasis de la glándula, dado que la proliferación descontrolada de los lactotrofos resulta en la formación de prolactinomas, los adenomas hipofisarios más frecuentes.

Tumores hipofisarios

Los tumores hipofisarios son las lesiones intracraneales más frecuentes. En nuestro país representan actualmente el 10-15% de todas las neoplasias intracraneales primarias (Albiero et al., 2010), presentando un pico de incidencia más temprano en mujeres (20-45 años) respecto de hombres (35-60 años) (Kontogeorgos, 2005; Kovacs, Horvath, & Vidal, 2001).

La mayoría de los tumores hipofisarios crece lentamente a lo largo de los años. Se los considera benignos porque muy raramente desarrollan metástasis. En general permanecen dentro de la silla turca aunque también pueden crecer en forma expansiva hacia los tejidos vecinos, y estos tumores, aunque invasivos, no se consideran malignos, incluso cuando hay invasión de duramadre. Se definen como verdaderos carcinomas sólo en presencia de metástasis cráneo-espinal y/o sistémica, y éstas son raras, con una incidencia de menos del 0,5% de los tumores hipofisarios (Adriana Seilicovich et al., 2005).

La clasificación de los tumores hipofisarios distingue aquellos tumores hiperfuncionantes que producen un aumento en la secreción de alguna hormona pituitaria. Dentro de esta clasificación se encuentran los prolactinomas (adenomas secretores de prolactina), (Kontogeorgos, 2005), los corticotropinomas, somatotropinomas, gonadotropinomas y los tirotropinomas.

Los tumores hipofisarios no funcionantes se caracterizan por la ausencia de clínica derivada de la hipersecreción hormonal y su sintomatología es debida principalmente al efecto de masa.

A su vez, existen otras clasificaciones de acuerdo con el tamaño y extensión del adenoma: tumores de 10 mm o menores en diámetro son considerados microadenomas, mientras que macroadenomas son aquellos de más de 10 mm (Arafah & Nasrallah, 2001).

Prolactinomas

Los prolactinomas son los tumores hipofisarios más frecuentes en la clínica (alrededor de un 40%), y se caracterizan por presentar hiperplasia e hipertrofia de lactotopos y una secreción excesiva de PRL. Las concentraciones de prolactina en sangre tienden a correlacionar con el tamaño del adenoma, y aún microadenomas secretan suficiente prolactina como para generar una hiperprolactinemia.

La incidencia de los prolactinomas varía con la edad y entre los sexos, siendo más frecuentes en mujeres que en hombres en la segunda y tercera década de vida (período fértil), mientras que, luego de los 50 años no hay diferencias entre los sexos (Colao et al., 2003).

En general las mujeres presentan microprolactinomas al momento del diagnóstico, mientras que en los hombres es más frecuente la presentación de macroprolactinomas que tienden a ser más agresivos. Estas diferencias están relacionadas con la detección precoz en las mujeres, debido a que las manifestaciones clínicas de la hiperprolactinemia (amenorrea, galactorrea, infertilidad) son más evidentes y llevan a una consulta médica temprana. En los hombres en cambio, la galactorrea es rara y los síntomas de hipogonadismo como consecuencia de la secreción excesiva de PRL, tales como impotencia y disminución de libido, suelen ser ignorados o de consulta médica más tardía.

Terapias actuales

Debido a que la DA es el principal factor hipotalámico inhibitorio de la proliferación y función del lactotrofo, las terapias actuales para los prolactinomas involucran un tratamiento farmacológico con agonistas dopaminérgicos (Ej: Bromocriptina, Cabergolina). A pesar de que en general existe una buena respuesta a estos agonistas dopaminérgicos, aproximadamente un 20% de los tumores no responden al tratamiento, y se consideran prolactinomas resistentes. Para estos casos no existen terapias médicas alternativas al día de la fecha, siendo la única alternativa de

tratamiento la extirpación del tumor mediante una compleja cirugía transeptoefenoidal o transcraneal con los riesgos para el paciente y los altos costos para los sistemas de salud que eso implica. En el caso de tumores con elevado índice de crecimiento, en los cuales falla la cirugía o presentan recidivas post quirúrgicas, se lleva a cabo un tratamiento con radioterapia.

Participación de esteroides sexuales en el desarrollo de prolactinomas

∞ Estrógenos

Está bien documentado en la literatura el rol mitogénico de los estrógenos sobre los lactotrofos. En ratas de ambos sexos, un tratamiento crónico con estrógenos genera una hiperplasia hipofisaria y un aumento de la secreción de prolactina en las primeras dos semanas de tratamiento, que luego deriva en un prolactinoma. Los estrógenos actúan en el hipotálamo disminuyendo la actividad de neuronas dopaminérgicas (L A Arbogast & Hyde, 2000), y en los lactotrofos, inhibiendo la actividad de los receptores D2 (Ferland, Labrie, Euvrard, & Raynaud, 1979; Raymond et al., 1978) y estimulando directamente la proliferación celular, la expresión génica de PRL y su secreción (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001; Freeman et al., 2000); entre otras acciones reportadas.

Paradójicamente, acciones anti-mitogénicas de los estrógenos han sido también reportadas en lactotrofos (S Gutierrez et al., 2010; Silvina Gutierrez et al., 2008, 2012; Kawashima et al., 2002).

Es probable que dicha controversia en la literatura dependa de varios factores como ser: (i) la duración del estímulo, (ii) el subtipo e isoforma del receptor involucrado y (iii) la localización subcelular del mismo.

RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los estrógenos son capaces de estimular la secreción de prolactina y la proliferación de células lactotropas a través de ER α . Sin embargo, claros efectos pro-apoptóticos (S Zarate et al., 2009) y anti-mitogénicos (S Gutierrez et al., 2010; Silvina Gutierrez et al., 2008, 2012) de los estrógenos en hipófisis han sido comprobados recientemente mediados por ER α localizado en la membrana celular (mER α). Además, la mayoría de las células adenohipofisarias que expresan ER α co-expresan el receptor clásico de estrógenos beta (ER β), complejizando aún más el estudio de los efectos de estradiol mediados por los ERs en la glándula hipofisaria. Se ha reportado que ER β inhibe la proliferación celular adenohipofisaria (Perez et al., 2015) mediante un mecanismo dado principalmente por el aumento del supresor tumoral PTEN y la disminución de la ciclina D1 (Perez et al., 2018).

Por otra parte, estudios en los últimos años han logrado identificar a un nuevo receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER) involucrado en efectos rápidos, no genómicos, de los estrógenos (Barton et al., 2018; De Francesco et al., 2017; Fredette, Meyer, & Prossnitz, 2018; Maggiolini & Picard, 2010; Zimmerman, Budish, Kashyap, & Lindsey, 2016)

Inicialmente, se propuso que GPER colaboraba con la señalización de mER α . Sin embargo, la especificidad de función del GPER fue comprobada en células de cáncer de mama que no expresaban ERs (E J Filardo, Quinn, Bland, & Frackelton, 2000; Edward J Filardo, 2002; P Thomas, Pang, Filardo, & Dong, 2005) y estudios en el ratón transgénico knock-out (KO) para GPER sugirieron un rol clave de este receptor en la regulación del metabolismo, la tolerancia a la glucosa y el crecimiento óseo (Sharma & Prossnitz, 2016).

Respecto a su distribución en los tejidos, GPER se expresa de forma ubicua, incluidos cerebro e hipófisis en rata y ratón (Brailoiu et al., 2007; Hazell et al., 2009; Rudolf & Kadokawa, 2013) pero se desconoce su distribución en los tipos celulares de la adenohipofisis y su función biológica en la fisiología (y patología) de los lactotropos.

∞ Progesterona (P4)

La progesterona (P4) es una hormona esteroidea de 21 carbonos perteneciente a la familia de los progestágenos. Entre sus múltiples acciones, resulta de particular importancia durante la preñez siendo requerida para el desarrollo de un ambiente uterino que resulte de soporte para la implantación y formación de la placenta, y en la mamogénesis y posterior lactogénesis de la hembra durante los períodos neo y perinatal de sus crías (Byrns, 2014; Wu & DeMayo, 2017). La principal fuente de producción de progesterona es el cuerpo lúteo ovárico formado luego de la ovulación. Las acciones de la progesterona afectan a distintos órganos y tejidos incluidos el cerebro, mama, útero, ovario y cérvix (Graham & Clarke, 1997); y son pleiotrópicas dependiendo del tejido y el tipo celular involucrado.

En general, P4 actúa como un factor proliferativo o de supervivencia en diversos tejidos como ser ovario (Goyeneche, Deis, Gibori, & Telleria, 2003), glándula mamaria (Berg, Dharmarajan, & Waddell, 2002) y endometrio (Bedaiwy et al., 2015). Sin embargo, la bibliografía acerca del rol de la progesterona en hipófisis es contradictoria. Algunos trabajos realizados en tumores hipofisarios experimentales han asignado un rol protector de la progesterona sobre la proliferación en hipófisis. Es así como en ratas con prolactinomas generados por tratamiento crónico con estrógenos, un co-tratamiento con P4 antagoniza los efectos proliferativos de los estrógenos sobre el lactotrofo y la secreción de PRL, disminuyendo el tamaño del tumor y la PRL sérica (Brann, Rao, & Mahesh, 1988; Heinzlmann & Koves, 2008; G G Piroli et al., 2001). También en este modelo de prolactinoma, se observó que P4 reduce los niveles de factores proliferativos como VIP y galanina, ambos estimulados por E2 (Heinzlmann, Koves, & Nagy, 2010; G G Piroli et al., 2001).

Otros trabajos, por el contrario, implican a la P4 en roles proliferativos a nivel hipofisario:

1. En estudios *in vitro* se ha descrito que P4 antagoniza el efecto permisivo de los estrógenos sobre la apoptosis de lactotrofos y somatotrofos inducida por TNF- α durante el ciclo estral (Candolfi et al., 2005).

2. Ratones transgénicos que sobre expresan hCG β y tienen elevados niveles circulatorios de P4, generan una marcada hiperplasia de lactotopos con altos niveles de PRL sérica (Ahtiainen et al., 2010).
3. En el modelo de ratones deficientes en receptor dopaminérgico tipo 2 (Drd2 KO), las hembras generan prolactinomas a lo largo de su vida por ausencia de inhibición sobre el lactotrofo. La ovariectomía en las hembras Drd2 KO impide el desarrollo de la hiperplasia hipofisaria. Sin embargo un reemplazo con estradiol únicamente resulta insuficiente para restaurar la formación de prolactinomas que se observa en los ratones con ovarios intactos (Hentges & Low, 2002), por lo que se deduce que otros factores ováricos son también indispensables para la formación del tumor, y el candidato más directo sería la progesterona.

Aparentemente, el efecto proliferativo de la progesterona podría observarse sólo en presencia de valores fisiológicos (y no farmacológicos) de estradiol (Ahtiainen et al., 2010).

Además de los efectos directos sobre la hipófisis, P4 también actúa a nivel hipotalámico, sobre las neuronas tuberoinfundibulares dopaminérgicas antagonizando el efecto de los estrógenos. Se observó que la síntesis de TH, la enzima principal y limitante en la biosíntesis de dopamina, disminuye significativamente en hipotálamos de ratas estrogenizadas. Sin embargo, un co-tratamiento con P4 restaura los valores hipotalámicos de esta enzima, y, en consecuencia, la síntesis de dopamina (L A Arbogast & Ben-Jonathan, 1990; L A Arbogast & Voogt, 1993; Gerardo G. Piroli, Grillo, Ferrini, Lux-Lantos, & De Nicola, 1996).

Por otra parte, no había sido estudiado (ni había sido considerado hasta el presente) la participación de diferentes tipos de receptores de progesterona en la regulación ejercida sobre el lactotrofo en hipófisis y el hipotálamo.

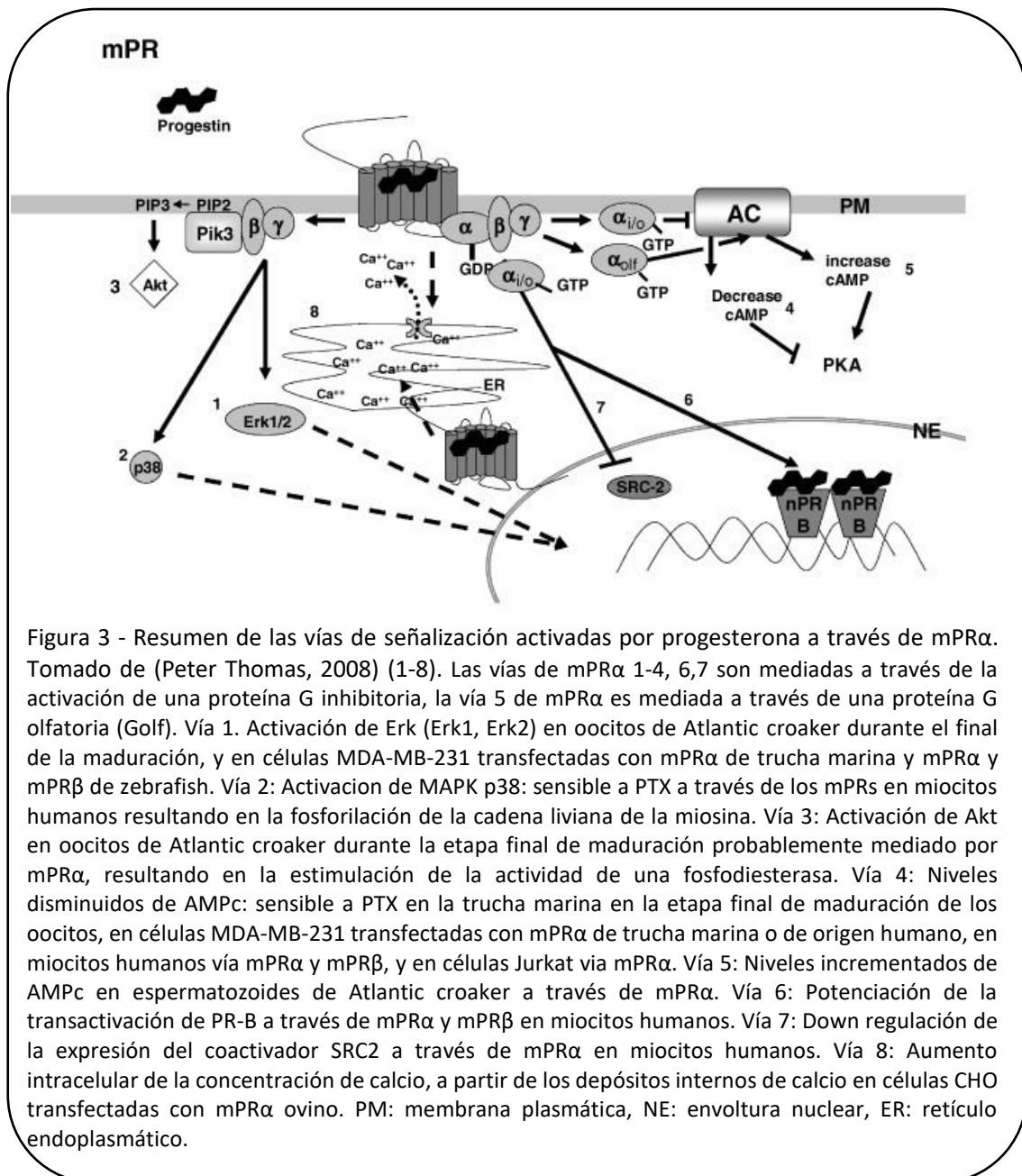
RECEPTORES CLÁSICOS Y NO CLÁSICOS DE PROGESTERONA

Los efectos fisiológicos más estudiados de P4 están mediados por proteínas intracelulares con actividad de factores de transcripción, conocidas como receptores clásicos o nucleares de progesterona (nPRs). Existen dos isoformas de nPRs: PR-A y PR-B, que derivan de un único gen con promotores alternativos (Sahlin, Masironi, Akerberg, & Eriksson, 2006). Estas isoformas pueden ejercer diferentes funciones sobre el mismo tipo celular. Además, la relación PR-A/PR-B varía en diferentes tejidos, determinando la especificidad de respuesta de P4 (Mulac-Jericevic & Conneely, 2004) sugiriendo que la expresión diferencial de ambas isoformas es crítica para una respuesta celular adecuada.

Además de los efectos clásicos genómicos de los receptores nucleares, en los últimos años se ha obtenido evidencia de que la progesterona es capaz de iniciar acciones rápidas a nivel de la membrana celular (por lo general no-genómicas) en una gran variedad de tejidos reproductivos. Los candidatos propuestos a mediar dichas acciones son los receptores de membrana de progesterona (mPRs) y los componentes de membrana del receptor de progesterona (Pgrmc3).

Los mPRs fueron inicialmente descritos en ovarios de peces por el Dr. Thomas y su grupo, quienes demostraron la participación de los mismos en la maduración meiótica de ovocitos de trucha marina inducida por progesterona. Subsecuentemente, los mPRs se encontraron en otros animales, incluyendo a humanos, conformando una nueva familia de receptores esteroideos.

Estos receptores incluyen al menos 5 subtipos (mPR α , - β , - γ , - δ y - ϵ) y pertenecen a la familia de receptores de 7 pasos transmembrana de progestinas clase II (PAQR). Presentan una afinidad elevada ($K_d \sim 5$ nM) y específica, una tasa de asociación rápida y una limitada capacidad de unión a progesterona. mPR α (PAQR7) es el subtipo más representado y mejor caracterizado en mamíferos. Un resumen de las vías de activación de señales mediadas por mPR α se encuentra esquematizado en la Figura 3.



Los Pgrmcs (de: “Progesterone receptor membrane component”), incluyen dos isoformas estructuralmente muy similares: Pgrmc1 y Pgrmc2. Pertenecen a la familia de receptores de membrana asociados a progesterona (MAPR) y presentan diferencias en cuanto a su expresión y función en mamíferos. Por ejemplo, Pgrmc1 ha sido descrito como el más abundante en la fase proliferativa del ciclo menstrual en mamíferos, mientras que Pgrmc2 ha estado asociado principalmente a la fase secretoria del ciclo (Intlekofer & Petersen, 2011; Ryu, Klein, & Zanger, 2017).

La proteína simple transmembrana Pgrmc1 (PM 26 ~28 kDa) fue purificada por primera vez del hígado porcino y luego su ADNc fue subsecuentemente clonado de fibras musculares lisas de cerdo y de una gran variedad de tejidos por diferentes investigadores. Presenta una afinidad moderadamente alta a progesterona (2 a 10 veces mayor que a testosterona o glucocorticoides) y puede unir otras moléculas tales como el grupo hemo, metabolitos del colesterol y proteínas. Al igual que Pgrmc1, Pgrmc2 posee un dominio transmembrana con homología a Src que puede activar segundos mensajeros (Ryu et al., 2017).

A pesar de que en un principio se postularon a los Pgrmcs como un tipo de receptor de progesterona, actualmente se propone que no actúan de forma independiente, sino que requieren de la formación de complejos multiproteicos con mPR α para su correcta localización y funcionalidad dentro de la célula (Aizen et al., 2018; Peter Thomas, 2008; Peter Thomas, Pang, & Dong, 2014).

Si bien existe vasta evidencia de que la progesterona es capaz de iniciar acciones rápidas no genómicas a través de los receptores no clásicos en diferentes tejidos, no existen al momento estudios concretos que demuestren el rol de estos receptores en la glándula hipofisaria.

HIPÓTESIS & OBJETIVOS

∞ HIPOTESIS

Basados en estos antecedentes, nuestra hipótesis de trabajo es que la respuesta final a los esteroides sexuales en la función de lactotrofo dependerá en gran medida de la expresión y proporción de receptores en la glándula hipofisaria donde no sólo participan los receptores clásicos sino también los no clásicos, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas.

∞ OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente trabajo, por lo tanto, es dilucidar la participación de los receptores no clásicos de estrógenos y progesterona en el control de la función lactotropa tanto a nivel hipofisario, como a nivel hipotalámico, evaluando situaciones fisiológicas y patológicas.

MATERIALES & MÉTODOS

MATERIALES Y MÉTODOS

Drogas

Los compuestos químicos utilizados en esta tesis fueron comprados en su mayoría a Sigma-Aldrich, excepto el dietilestilbrestol (DES) adquirido en Pharma S.A (Argentina) y el agonista del receptor de membrana de progesterona, el 10-etenil-19-norprogesterona comercializado por la empresa Axon Medchem (Holanda) bajo el nombre de Org OD 02-0 (Kelder et al., 2010). El agonista (G1)³ y el antagonista de GPER (G36)⁴ (Bologa et al., 2006; Dennis et al., 2011) fueron donados generosamente por el Dr. Aiello de la Universidad Nacional de La Plata.

Células GH3

El clon de células GH3, establecido en Julio de 1965 por A.H. Tashjian y colaboradores (Bancroft & Tashjian, 1970; Tashjian, Bancroft, & Levine, 1970) es una línea celular somatolactotropa derivada de un tumor hipofisario desarrollado en ratas de la cepa Wistar Furth por tratamiento crónico estrogénico.

Animales

Los animales utilizados en esta tesis fueron criados en el bioterio del Instituto de Biología y Medicina Experimental (IByME) de acuerdo con las normas dictadas por la Guía para el Cuidado y Empleo de Animales de Laboratorio del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos de América (NIH 8th ED. 2010, NRC, USA) y con las normas establecidas por el Consejo Directivo de la Comunidad Europea en noviembre, 2010 (2010/63/UE). Los animales se mantuvieron a 22°C con un fotoperíodo de 12 horas de luz (7:00 – 19:00 hs) y 12 horas de oscuridad, y ventilación permanente. Se les suministró alimento balanceado (Gepsa Feeds, Grupo Pilar) y agua *ad libitum*.

³ G1 es una dihidroquinolina substituida, con gran afinidad y selectividad para GPER.

⁴ G36 es un antagonista de segunda generación con mejorada selectividad y menor margen de efectos off-target en ER α y ER β respecto al primer antagonista descrito para GPER, G15.

Modelos animales

1. RATAS HEMBRA ESTROGENIZADAS (RATAS DES)

Ver descripción del modelo en: Capítulo 2 páginas 89 y 90.

2. RATONES TRANSGÉNICOS KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 (DRD2 KO)

Ver descripción del modelo en: Capítulo 3 página 106.

3. RATONES HCGB+

Ver descripción del modelo en: Capítulo 3 páginas 106 y 107.

4. RATAS OVX

Ver descripción del modelo en: Capítulo 2 página 89.

Tratamientos *in vivo*

Tratamiento agudo con progesterona

Ver metodología descrita en: Capítulo 1 página 80, Capítulo 2 páginas 95-97 y Capítulo 3 páginas 128, 133 y 134.

Tratamiento agudo con estradiol

Ver metodología descrita en: Capítulo 2 páginas 95-97 y Capítulo 3 páginas 128, 133 y 134.

Tratamiento crónico con DES y P4

Ver metodología descrita en: Capítulo 2 páginas 89-91.

Grupos OVX, OVX DES, OVX DES P4, OVX P4

Ver metodología descrita en: Capítulo 2 páginas 89-91.

Tratamiento *in vivo* con Org OD 02-0

Para evaluar la potencialidad de Org OD 02-0 como un posible fármaco terapéutico para el tratamiento de la hiperprolactinemia, se llevó a cabo un ensayo *in vivo* con el agonista de mPRs en ratones hembra Drd2KO. Se utilizaron hembras Drd2KO de 8 meses de edad, las cuales fueron anestesiadas de forma tal de evitar el incremento en los niveles de PRL debido al estrés del animal durante el tratamiento. Al cabo de 15 minutos de anestesia se tomó una muestra de sangre (niveles basales) de la vena de la cola considerada tiempo 0. Se inyectaron los animales con Org OD 02-0 (15 mg/kg, sc) o aceite de ricino (vehículo) y a los 15 minutos más tarde se tomaron nuevamente muestras de sangre de la vena de la cola (aún bajo anestesia). A los 30 minutos los animales fueron sacrificados colectándose sangre troncal.

Ensayos *ex vivo*

Dada la complejidad del sistema hipotálamo-hipofisario; algunos experimentos fueron realizados en hipófisis incubadas *ex vivo* con diferentes estímulos con el fin de evitar efectos indirectos vía hipotálamo. El uso de explantes mantiene la estructura de la matriz extracelular del tejido, la comunicación paracrina y las uniones intercelulares intactas, todos procesos involucrados en la comunicación célula-célula.

Para llevar a cabo estos ensayos *ex vivo*, las adenohipófisis extraídas fueron recolectadas en 500 µl de Dulbecco Eagle's Modified Medium (DMEM) suplementado

con 15 % v/v de suero de caballo, 2.5 % v/v de suero fetal bovino y gentamicina (20 µg/ml) estéril y luego llevadas al incubador a 37° con flujo de CO₂ al 5% para mantener al tejido en condiciones símil-fisiológicas. Luego de “lavar” las adenohipófisis con DMEM suplementado fresco, seccionamos con bisturí los explantes en pedazos más pequeños, e incubamos con diferentes estímulos.

Ensayos *ex vivo* con P4 y el agonista específico de mPRs Org OD 02-0

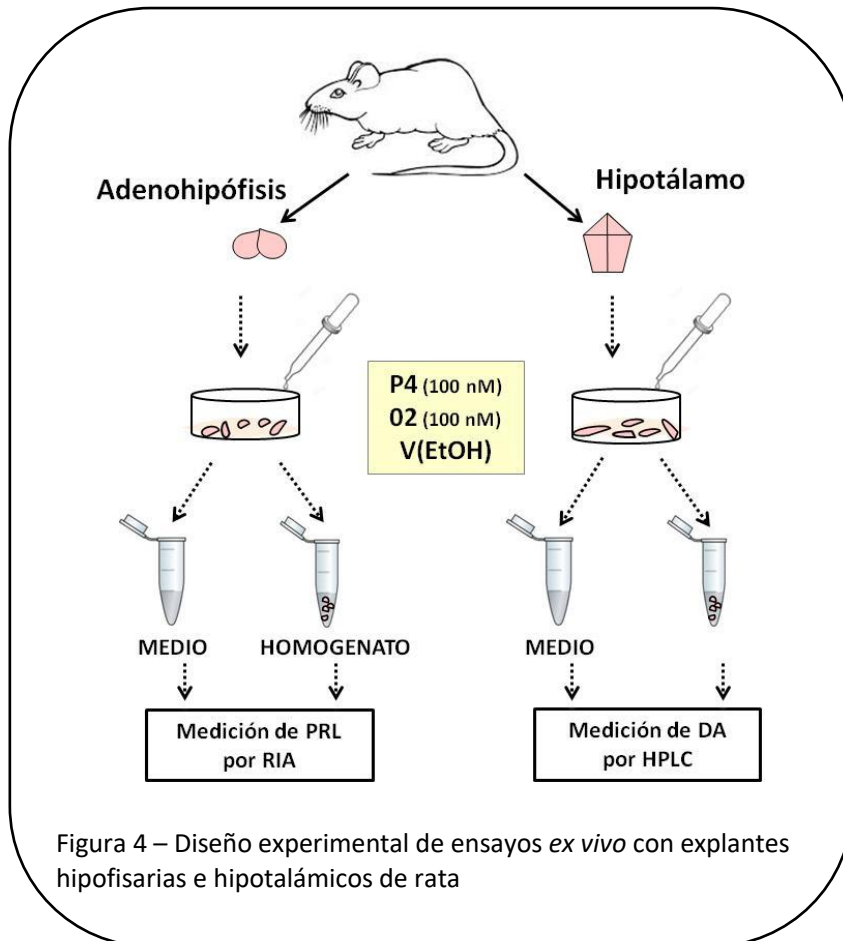
- RATA

Explantes hipofisarios fueron incubados con progesterona (P4) 100nM, o con el agonista específico de mPR α , 10-etenil-19-norprogesterona Org OD 02-0 en DMEM sin suero (vehículo) durante 1 hora a 37°C en incubador con flujo constante de CO₂. Finalizado el tiempo de tratamiento, los medios secretados y los fragmentos de tejido fueron colectados hasta las posteriores determinaciones de PRL sérica por Radioinmunoanálisis (RIA) (Figura 4).

Explantes hipotalámicos de ratas hembras SD en diestro al momento del sacrificio, fueron recolectados e incubados *ex vivo* con Org OD 0-02 y P4 (100 nM) con las mismas condiciones descritas anteriormente. Luego del periodo ensayado de incubación, se guardaron tanto los medios como los hipotálamos a -70°C hasta las posteriores determinaciones de dopamina por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC).

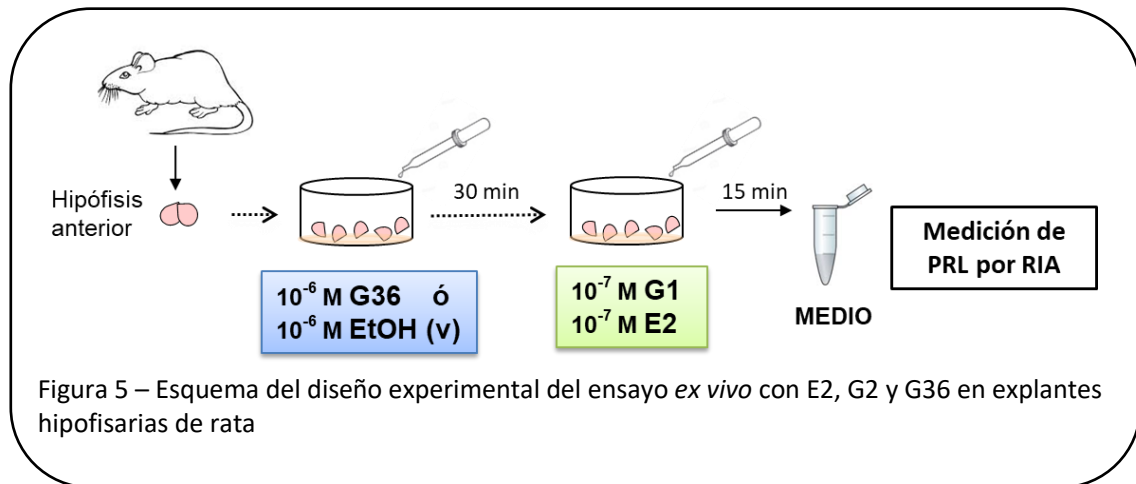
- RATÓN

Mediante un abordaje similar, hipófisis de ratones hembra Drd2KO y controles salvajes (wild type, WT) de 8 meses de edad fueron incubadas con Org OD 02-0 (100 nM) en DMEM sin suero (vehículo) durante 30 min a 37°C. Luego, los medios secretados y los fragmentos de tejido fueron colectados hasta las posteriores determinaciones de TGF β 1 por ELISA (DY1679-05, R&D Systems), y prolactina por RIA.



Ensayos *ex vivo* con E2 y el agonista y antagonista de GPER

Explantes hipofisarios fueron pre-incubados con el antagonista de GPER (G36, 10^{-6} M) o con Etanol (vehículo, 10^{-6} M) durante 30 min a 37°C , y luego con vehículo, estradiol (E2, 100 nM) o el agonista de GPER (G1, 100nM) durante 15 minutos a 37°C (Figura 5). Luego de finalizado el ensayo, los fragmentos adenohipofisarios y el medio secretado de cada pocillo fueron recolectados para las posteriores determinaciones de PRL por RIA en los medios colectados



ENSAYOS *IN VITRO*

Cultivo de células GH3

Para el cultivo de las células GH3 (ATCC® CCL-82.1™) en el laboratorio, se utilizó medio Dulbecco modificado (DMEM) suplementado con 10 % v/v de suero fetal bovino (Natocor, Córdoba), 10 % v/v suero de caballo (Internegocios, Buenos Aires), 1 % v/v glutamina, 1 % v/v aminoácidos esenciales (MEM), 1 % v/v Penicilina/Estroptomicina y 1 % v/v Anfotericina B, en solución y ajustado a un pH=7.4.

Fraccionamiento subcelular

Para obtener fracciones de membrana plasmática y citoplasmáticas seguimos el protocolo descrito en (Pang, Dong, & Thomas, 2015). Células GH3 fueron cultivadas en placas de Petri de 15 cm hasta obtener un 90% de confluencia y luego colectadas en buffer HAED frío (HEPES, 25 mM, NaCl 10 mM, ácido etilenediaminotetraacético 1 mM y ditroeritritol 1 mM ajustado a pH 7.6) e inhibidores de proteasas (Thermo Fisher Scientific). Se lavaron y centrifugaron las células 5 minutos a 1000 x g durante 5 minutos a 4°C y se resuspendieron los precipitados celulares en HAED en hielo. Una vez obtenidos los lisados celulares por sonicación (10 segundos) se centrifugaron los lisados nuevamente a 1000 x g a 4°C por 7 minutos para remover restos del material nuclear o mitocondrial (fracción nuclear). Finalmente se obtuvieron las fracciones de membrana

plasmática luego de centrifugar el sobrenadante a 20000 g por 20 minutos a 4°C y resuspender en *buffer* HAED.

Ensayo de competición simple

Para demostrar la presencia de receptores funcionales con capacidad de unión específica a los progestágenos en células GH3, se realizó un ensayo simple de competencia siguiendo el protocolo descrito en (Dressing, Alyea, Pang, & Thomas, 2012; Pang et al., 2015). Luego de obtenidas las membranas plasmáticas de células GH3 por fraccionamiento celular y se incubaron con 2,4,6,7-³H-Progesterona (4 nM) en ausencia (binding total) o en presencia de P4, Org OD 02-0 (1 μM) o el agonista de los nPRs, R5020 (1 μM) durante 30 minutos a 4°C. La ³H-Progesterona unida fue separada de la ³H-Progesterona libre en solución por filtración rápida en filtros Whatman GF/B (GE Healthcare, Little Chalfont, UK) en un cosechador de células de 36 wells (Brandel, Gaithersburg, MD, USA) y se midieron los niveles de radioactividad en los filtros mediante un contador de centelleo (modelo LS6000; Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). El desplazamiento de la ³H-Progesterona por los competidores (P4, Org OD 02-0 y R5020) se expresó como un porcentaje del máximo de binding específico de la progesterona radioactiva.

Experimento *in vitro* con P4, Org OD 02-0 y R5020 en células GH3

Células GH3, cultivadas en placas de 12 wells (~1.10⁶ céls/well) fueron incubadas con P4, Org OD 02-0, R5020 (20 nM) o Etanol (vehículo) en DMEM sin suero durante 15 min a 37°C. Al finalizar el tratamiento, los medios secretados y las células fueron colectados hasta las posteriores determinaciones.

Tratamiento con inhibidores

☞ PRETRATAMIENTO CON TOXINA DE PERTUSSIS

La toxina de *Bordetella pertussis* (PTX) representa una buena herramienta para el estudio de las vías de señalización asociadas a proteína G inhibitorias (G_i) debido a que actúa como agente desacoplante de receptores unidos a proteínas G_i sensibles a PTX. En el laboratorio, se estudió la implicancia de la proteína G_i en los efectos de Org OD 02-0 en células GH3. Para ello, células GH3 fueron pretratadas con PTX (List Biological Laboratories Inc., Campbell, CA, USA, activada por incubación previa con DTT 250 mM durante 15 minutos a 35°C, (2.5 µg/mL, PTXa) durante 30 minutos previo al tratamiento con Org OD 02-0 (20 nM). Para los grupos control, una alícuota de PTX fue inactivada por calor, por incubación a 99°C durante 10 minutos (PTXhi), previo a la adición a las células.

☞ TRATAMIENTO CON DDADO (INHIBIDOR DE LA ENZIMA ADENILATO CICLASA)

Para corroborar que los efectos observados por Org OD 02-0 efectivamente implicaban la activación de una proteína G_i y la consecuente inhibición de la enzima adenilato ciclasa, las células GH3 fueron incubadas con un inhibidor específico de esta enzima; el 2',5'-dideoxyadenosina (ddAdo, Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY) a una concentración de 50 µM durante 15 minutos. En paralelo, se incubaron las células GH3 con Org OD 02-0 (20 mM, 15 minutos). Recolectamos los medios para futuras mediciones.

☞ TRATAMIENTO CON 8-BR-AMPC (ANÁLOGO DE AMPC)

En orden de testear si los efectos observados se debían a una disminución de los niveles de AMPc y por consiguiente la inactivación de PKA, se utilizó un análogo permeable de AMPc, el 8-Br-AMPC (Sigma- Aldrich). Para ello se realizó un co-tratamiento incubando células GH3 con Org OD 02-0 (20 nM) y 8-Br-AMPC (10 µM), a la vez, durante 15 minutos y se colectaron los medios determinaciones posteriores.

☞ TRATAMIENTO CON PD98059 (INHIBIDOR DE MEK 1 Y MEK 2)

Para estudiar la participación de la vía de MAPK, se realizó un ensayo preincubando a las células GH3 con un inhibidor de MEK 1 y 2 (PD98059, Biomol

International, Plymouth Meeting, PA, USA) que evita la fosforilación (activación) de ERK por dichas quinasas. Durante una 1 h se pretrataron las células con PD98059 (10 μ M) y luego se agregó Org OD 02-0 (20 nM) por 15 minutos. Al finalizar el tratamiento, se colectaron los medios para futuras mediciones.

Ensayo de silenciamiento génico de mPR α con ARN pequeño de interferencia

Para silenciar mPR α en células GH3, se transfectaron las células con oligos siRNA para mPR α (ON-TARGET plus Rat Paqr7, siRNA; Dharmacon, Lafayette, CO, USA) u oligos control (CTL) (100 nM) a las 0 y 16 horas usando lipofectamina 2000 (Invitrogen) como reactivo de transfección. Luego de 48 hs de incubación, la mezcla de siRNA fue reemplazada con medio normal y se incubaron las células por 24 hs adicionales con DMEM-BSA 2%, previo al uso de las mismas en los experimentos. Como control del silenciamiento, se procesaron las muestras para Western Blot. Se incubaron las muestras con el anticuerpo específico para mPR α observándose niveles disminuidos de la expresión proteica del receptor en el grupo de células transfectadas con siRNA-mPR α vs. transfectadas control.

Experimento *in vitro* con E2, G1 y G36 en células GH3

Para los estudios con agonistas de GPER *in vitro*, las células GH3 fueron cultivadas en placas de 12 wells ($\sim 1 \cdot 10^6$ céls/well) y luego pre-incubadas con el antagonista de GPER (G36, 10^{-6} M) o con Etanol (vehículo, 10^{-6} M) durante 30 min a 37°C. Posteriormente se las incubó con vehículo, estradiol (E2, 10^{-8} M) o el agonista de GPER (G1, 10^{-7}) durante 15 minutos a 37°C. Luego de finalizado el ensayo, las células y el medio secretado de cada pocillo fueron recolectados para las posteriores determinaciones de PRL por RIA.

TECNICAS UTILIZADAS

PCR cuantitativa en tiempo real

Obtención de ARN total hipofisario: Las hemi-hipófisis y los hipotálamos de rata provenientes de los distintos grupos experimentales fueron recolectadas en 100 μ l de Trizol (Invitrogen) para su conservación hasta el momento de uso.

Para la extracción del ARN total del tejido, siguiendo las recomendaciones del proveedor, se homogeneizaron las muestras en Trizol con homogeneizador manual, bajo campana, en hielo. Posteriormente se agregaron 30 μ l de cloroformo, mezclando por inversión. Se incubaron las muestras durante 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugaron durante 15 min a 12000g a 4°C. De la fase acuosa obtenida se tomaron aproximadamente 40 μ l (el ARN representa el 60%) y se lo traspasó a nuevos tubos. Para precipitar el ARN, se adicionaron 75 μ l de isopropanol y durante 10 min se incubaron a temperatura ambiente. Se centrifugaron las muestras durante 10 min a 12000g y 4°C, y luego se eliminó el sobrenadante. Para lavar el precipitado se agregaron 100 μ l de EtOH 75% y se centrifugaron los tubos durante 5 min a 7500g y 4°C. Luego de descartar el sobrenadante, se dejaron secando los precipitados al aire y posteriormente se los resuspendió en 5 μ l de H₂O estéril libre de ARNasas. Para solubilizar el ARN precipitado (pellets) se dejaron los tubos durante 10 min en placa térmica. La concentración y pureza del ARN total extraído en las muestras se midieron con un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

Obtención de ADN copia (ADNc): Se realizó un ensayo de retrotranscripción para obtener ADNc a partir de 1 μ g de ARN diluido en agua desionizada libre de ARNasas, en 5 μ l de volumen final, incubados con 100ng de *primers* aleatorios (*random primers*) y agua desionizada libre de ARNasas. Esta preparación se colocó en la termocicladora y se calentó a 70°C por 5 minutos. Luego de darles un *spin*, se colocaron los tubos en hielo y se agregó a cada muestra 1 μ l de la enzima MMLV RT (200 unidades/ μ l, 10000u, Promega, REF M1701), 4 μ l del *buffer* 5X de la enzima (*MMLV RT buffer* 5X), una mezcla de dNTPs (20mM cada uno) y H₂O estéril libre de ARNasas. La reacción se llevó a cabo

según el siguiente programa: 37°C por 60 min y 95°C por 5 min. El ADNc obtenido se mantuvo a (-20°C) hasta el momento de la utilización.

Nota: En forma paralela, se realizó la retrotranscripción negativa control de cada tubo, siguiendo el mismo procedimiento con la excepción del agregado de la enzima.

Diseño de los primers: Para el ensayo de PCR en tiempo real se utilizaron *primers* sentido y anti-sentido específicos para la amplificación de los genes de interés, detallados en la Tabla 1. Los mismos fueron diseñados en base a las secuencias nucleotídicas publicadas en GenBank (NIH), utilizando el programa *Primer Blast* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>). Se tuvieron en cuenta las siguientes características para la elección de los *primers*: el producto amplificado debía tener entre 80 y 180 pb; el porcentaje de nucleótidos GC presentes en ellos debía ser del 50% aproximadamente y la temperatura de disociación cercana a 60°C. También se chequeó que los *primers* no formaran homodímeros o heterodímeros mediante el programa *Oligoanalyzer*; y siempre que fue posible se diseñó al menos uno de ellos complementario a una secuencia de unión entre diferentes exones en el gen de interés, para evitar la amplificación de ADN genómico. En todos los casos se constató que los *primers* fueran complementarios específicamente a la secuencia de interés.

Reacción de PCR en tiempo real: El ADNc fue diluido 1/20 en H₂O estéril libre de ARNasas para alcanzar una concentración aproximada de 6 µg/ml, se tomaron 5 µl de cada muestra y se mezclaron con 2µl de Solís SYBR green PCR kit y 0.5µl de primer sentido y 0.5µl de primer anti-sentido (0.5µM cada uno), en placas de 96 pocillos cubiertas por un film óptico adherente. La reacción se llevó a cabo en un termociclador Bio-Rad, utilizando un programa estándar detallado en la Tabla 2.

Elección del gen de referencia: Como control interno para normalizar las diferencias entre las muestras, se analizaron las eficiencias de *β-actina*, *Ciclofilina B (Cyp B)* y *Rpl38*. La eficiencia de qPCR de cada par de *primers* utilizados en esta Tesis fue testeada usando muestras de ADNc control en diluciones seriadas. Se calculó la eficiencia de amplificación analizando la pendiente de la porción lineal (log) correspondiente a la curva de calibración. Específicamente, calculamos la eficiencia como $10^{(-1/pendiente) - 1}$

graficando el log de la concentración del templado inicial en el eje x y los Ct obtenidos en el eje y. Se utilizaron los *primers* cuyas eficiencias de resultaron aproximadamente entre 95-100%.

A partir del análisis del paralelismo de las pendientes de regresión obtenidas de las curvas de eficiencia entre los *primers* del gen de interés y de los *primers* de los posibles controles internos de carga, se seleccionó *Cyp B* como control interno, en la mayoría de las mediciones, para comparar los genes de interés en las muestras, en la misma placa de PCR. *Rpl38*, por otro lado, fue seleccionado como el gen de referencia más apropiado para los ensayos de *Gper* debido al paralelismo entre la pendiente de la línea de regresión de este gen (y consecuentemente en el valor del coeficiente de correlación) respecto de la pendiente de *Gper*.

Análisis de datos: Se analizaron los datos utilizando el programa CFX Manager, mediante el cual se fue monitoreando el incremento en la fluorescencia (proporcional al número de copias de ADN) a lo largo de la reacción de PCR. Se estableció un valor umbral de fluorescencia en el cual el incremento es lineal y se determinó para cada muestra el número de ciclos en el que se alcanza el umbral (denominado Ct). Para determinar la expresión relativa de los genes se utilizó el método de $\Delta\Delta\text{Ct}$, donde se comparó el Ct del gen de interés respecto del Ct del gen endógeno (ΔCt) y este valor a su vez se comparó con un calibrador interno ($\Delta\Delta\text{Ct}$). Todas las muestras fueron ensayadas en duplicado para cada gen y se analizaron las curvas de *melting* asegurando la especificidad de amplificación de cada corrida.

Nota: Para analizar la abundancia relativa de ARNm de cada subtipo de receptor, respecto al total de receptores, se compararon los valores de cada gen calculados como $2^{-\Delta\text{Ct}}$ ($2^{-(\text{Ct}_{PR}-\text{Ct}_{Cyp B})}$) siguiendo la metodología descrita por el Dr. Peter Thomas en (Pang, Dong, & Thomas, 2013; Pang et al., 2015). Ver detalle en capítulo 1, página 62.

Gen	Accession no.	Secuencia <i>primer</i> (Sentido) 5' - 3'	Secuencia <i>primer</i> (Anti-sentido) 5' - 3'
<i>CypB</i> ratón	NM_011149.2	GACCCTCCGTGGCCAACGAT	ACGACTCGTCTACAGATTCATCTC
<i>mPRα</i> ratón	NM_027995.2	TCTGACCACAGTTTTCTGAC	GCTGGACAGAAGGTGGTTGAA
<i>mPRβ</i> ratón	NM_028829.4	TACAAAGGTTGTCTAACTGAGCCC	CCACTCATTGACAGGGTGCT
<i>mPRγ</i> ratón	NM_028748.2	TTGGTTACCACACCCACAG	ACCTCCACACAAAGAACCAGAA
<i>mPRδ</i> ratón	NM_001310597.1	ACGCGGCAACAGGTCA	GCCTTCTCCCAAACACCC
<i>mPRϵ</i> ratón	NM_198414.2	GGAGTGCTTCATCCTGTCCG	TTGAGCGTCTCATTGGTGGG
<i>nPR</i> ratón	NM_008829.2	GGTCTTGGAGGTCGTAAGT	CTGGCTCTCGTTAGGAAGGC
<i>CypB</i> rata	NM_022536	GACCCTCCGTGGCCAACGAT	GCTACTCGTCTACAGGTTCTGCTC
<i>Rpl38</i> rata	NM_001077592.1	GTTCCGGTGCTCGCTCTGT	CAGATTTGGCATCCTTCCGC
<i>mPRα</i> rata	NM_001034081	CCGCATCATAGTGTCTCCCC	TGTCCCTGCCAAAGATGTG
<i>mPRβ</i> rata	NM_001014099	TACAAAGGTTGTCTACTGAACCC	AGAATCTTGGGCAGACGACG
<i>mPRγ</i> rata	NM_001014092	GTGCCACAGGTGTTCCATGA	ATGCGTCCAGATGTTGAGGG
<i>mPRδ</i> rata	NM_001191077	CCACTTGGTACTTCTGTGGC	CGAGGCGACATGGAGCTAAA
<i>mPRϵ</i> rata	NM_001271152	CACTGTAGCCTGCTGCAAGA	AAGTAGCGGCGGTAGAAGTG
<i>nPR</i> rata	NM_022847	GACAACACAAAGCCCGACAC	CGGAAACCTGGCAGAGACTT
<i>PR-B</i>	NM_022847 ⁵	GCATCGTCTGTAGTCTCGCAATAC	GCTCTGGGATTTCTGCTTCTCG
<i>TH</i> rata	NM_012740.3	TCCAGTACAAGCACGGTGAA	GGCATGGGTAGCATAGAGGC
<i>Pgrmc1</i> rata	NM_021766.1	GTTCACTTCAAGTACCATCACG	CTTCCGAGCAGCCTCATCTT
<i>Gper</i> rata	NM_133573.1	ACGCTCAAGGCAGTCATACC	CTCCCCTGTCCGTTTTCTC
<i>ERα</i> rata	NM_012689.1	AGCATTCAAGGACATAATGACTACA	TCGGCGGTCTTTTCGTATCC
<i>ERβ</i> rata	NM_012754.1	CTCATTTTCGCTCCCGACCT	AGGGGTACATACTGGAGTTGAG

Tabla 1: Secuencias de los pares de *primers* de rata y ratón utilizados

Ciclo	Temperatura	Tiempo
Ciclo 1 (1x) <i>Desnaturalización inicial</i>	95°C	10 min
Ciclo 2 (40x) <i>Desnaturalización, apareamiento de primers y extensión</i>	95°C 60°C 72°C	15 seg 20 seg 30 seg
Ciclo 3 (1x) <i>Curva de disociación</i>	60°C – 95°C	10 seg

Tabla 2: Programa de PCR en tiempo real utilizado

⁵ *Primer sentido (F)*: del 133-157 del mensajero NM_022847. *Primer antisentido (R)*: del 286 al 308 del mensajero NM_022847

Inmunocitoquímica

EN CÉLULAS HIPOFISARIAS CULTIVADAS SOBRE CUBREOBJETOS

Para la realización de las ICQ nos pusimos en contacto con la Dra. Silvina Gutiérrez y el Dr. Pablo Pérez del Centro de Microscopía de la Universidad Nacional de Córdoba quienes tienen vasta experiencia en técnicas histológicas. Siguiendo la metodología propuesta por la Dra. Gutiérrez y el Dr. Pérez, descrita en (Perez et al., 2015), células de adenohipófisis de ratas hembra fueron dispersadas e incubadas con las soluciones de bloqueo en cámara húmeda 1 h a temperatura ambiente. Finalizado el bloqueo, se incubaron las células con los anticuerpos específicos detallados en la Tabla 3 y anti-PRL (AF65191), anti- β LH (AFP1132093) y anti-GH (AFP12121390, Dr. A. F. Parlow, NIDDK) en una dilución de 1:1000 durante toda la noche a 4°C en cámara húmeda. Al día siguiente, se realizaron dos lavados en PBS-Tritón 0.2% durante 5 minutos en agitación y se incubaron las células con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a Texas Red (anti-rb-TEXRED) y anti-guinea pig conjugado a fluoresceína (anti-gp-FITC) (Chemicon International, Temecula, CA., USA) durante 1 h en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente. Al cabo del tiempo de incubación, retirando el excedente, se realizaron pasajes sucesivos de 5 minutos con PBS-Tritón 0.2% y se sembraron aproximadamente 20 μ l por corte de una dilución 1:5000 de DAPI (stock: 5mg/mL; molecular probes) en PBS1X y se dejaron incubando durante 5 minutos en cámara húmeda en oscuridad a temperatura ambiente. Luego, se realizaron dos lavados en agitación con PBS1X durante 5 minutos y con agua destilada durante 1-2 minutos. Se utilizó Prolong (molecular probes) para el montaje. Una vez secos los cortes, se visualizó la marca en los mismos con un microscopio de fluorescencia Nikon.

EN CÉLULAS GH3

Para la detección de mPRs y GPER en células GH3, se utilizó un protocolo similar al descrito para células adenohipofisarias dispersas. Los anticuerpos y diluciones utilizadas se encuentran detallados en la Tabla 3.

Péptido/proteína blanco	Secuencia antigénica	Nombre del anticuerpo	Proveedor	Especie en la que está hecho; monoclonal o policlonal	Dilución utilizada
Receptor de membrana de progesterona alfa (mPR α)	N-terminal TVDRAEVPLFWKPC	306t	Dr. Peter Thomas (Castelnovo, Magnaghi, & Thomas, 2017)	Conejo, policlonal	1:500 para WB; 1:50 para ICQ y FACS
Receptor de membrana de progesterona beta (mPR β)	N-terminal KILEDGLPKMPCTVC	A9830-4	Dr. Peter Thomas (Zuloaga et al., 2012)	Conejo, policlonal	1:1000 para WB; 1:100 para ICQ
Receptor de membrana de progesterona gamma (mPR γ)	N-terminal TDIKNDSYSWPMLC	H833-4	Dr. Peter Thomas (Nutu et al., 2007)	Conejo, policlonal	1:1000 para WB; 1:100 para ICQ
Receptor de membrana de progesterona delta (mPR δ)	N-terminal CQGGPLEGGTAKQQ	PAQR6	Dr. Thomas (Pang et al., 2013)	Conejo, policlonal	1:1000 para WB; 1:100 para ICQ
Receptor de membrana de progesterona epsilon (mPR ϵ)	N-terminal RNSHSAASRDPPASC	PAQR9	Dr. Thomas (Pang et al., 2013)	Conejo, policlonal	1:1000 para WB; 1:100 para ICQ
Componente 1 de membrana del receptor de progesterona (PGRMC1)	Región interna de PGRMC1 de origen humano	PGRMC1 (D-16) sc-82684	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Cabra, policlonal	1:1000 para WB; 1:100 para ICQ
Receptor de progesterona nuclear	aminoácidos 731-909 de PR de origen humano	PR (2C11F11)	Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Ratón, monoclonal	1:1000 para WB
Receptor de estrógenos acoplado a proteína G (GPER)	350 residuos dentro de la región C-terminal	ab39742	Abcam	Conejo, policlonal	1:100 para ICQ y FACS
GAPDH	Aminoácidos de la región C-terminal de origen humano	GAPDH (14c10)	Cell Signaling Technology	Ratón, monoclonal	1:1000 para WB
ERK	Secuencia C-terminal de p44 MAP kinasa de rata	P44/42 (9102)	Cell Signaling Technology	Conejo, policlonal	1:2000 para WB
pERK	Residuos Thr202/Tyr204 de p44 MAP kinasa de origen humano	Phospho-p44/42 (9106)	Cell Signaling Technology	Ratón, monoclonal	1:2000 para WB

Tabla 3. Listado de anticuerpos primarios utilizados en ICQ, WB y FACS.

Microscopía electrónica

Para determinar la localización subcelular de GPER en las células lactotropas se aplicó un protocolo de inmunomarcación ultraestructural para microscopía electrónica de transmisión utilizando partículas de oro coloidal. Se utilizaron glándulas hipofisarias provenientes de ratas hembra en diestro o ratas OVX fijadas en una mezcla de formaldehído al 4% v/v, glutaraldehído al 1.5% v/v y buffer cacodilato 0.1 M a pH 7.3 a temperatura ambiente. Luego de la deshidratación en soluciones de concentraciones creciente de etanol las muestras fueron incluidas en LR White (London Resin, UK) y finamente seccionadas con un ultramicrotomo JEOL con una cuchilla de diamante montadas sobre grillas de níquel.

Las secciones fueron incubadas con el anticuerpo específico para GPER durante toda la noche a 4°C (anti-rat GPER, ab39742, Abcam, 1:50) y luego lavadas e incubadas con un anticuerpo secundario hecho en conejo conjugado a partículas de oro coloidal de 15 nm (1:18; Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA). Para confirmar que GPER se expresaba en lactotropos, se realizó una inmunocitoquímica ultra-estructural para PRL. Para ello, se incubaron secciones finas durante toda la noche a 4°C con un anticuerpo policlonal contra PRL de rata diluido 1:5000 (NIHDDK, Bethesda, Md., USA), y luego de los lavados se las incubó con un anticuerpo secundario conjugado a partículas de oro coloidal de 5 nm (1:50; Electron Microscopy Sciences; Hatfield, USA). Para validar la especificidad de la inmunomarcación, se realizaron controles incubando las secciones con PBS BSA 1% v/v en lugar del anticuerpo primario. Las secciones fueron contra-teñidas con una solución acuosa de acetato de uranilo saturado y examinamos los cortes en un microscopio electrónico Zeiss LEO 906-E. Las imágenes fueron tomadas con una cámara Megaview III.

Dispersión de células adenohipofisarias de rata

Las adenohipófisis extraídas de ratas hembra se colocaron en cámaras con medio Dulbecco-glut (Dulbecco madre con 1% glutamina). Se realizaron lavados sucesivos de las hipófisis en el mismo medio y se cortaron en fragmentos de

aproximadamente 1mm. Posteriormente, se incubaron por 30 minutos en estufa a 37°C con 95% O₂ y 5% CO₂ en Dulbecco-glut conteniendo 0,5% de tripsina. Luego se trataron con 1 mg/ml de ADNasa I (Invitrogen) por dos minutos más y se detuvo la digestión enzimática con el agregado de suero fetal bovino (SFB) en exceso y posteriores lavados con Dulbecco-glut. Los fragmentos tisulares fueron colocados en el buffer Krebs-Ringer, preparado fresco, sin Ca²⁺ ni Mg²⁺ previamente filtrado y gasificado durante 15 minutos. A continuación, se realizó la dispersión celular en forma mecánica con pipetas Pasteur. La suspensión resultante se filtró con una malla de nylon (160 mm) y se centrifugó 10 minutos a 1000 rpm. Previo a la centrifugación, se tomó una alícuota de la suspensión celular para cuantificar el rendimiento celular del tejido, por conteo en cámara de Neubauer. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de Azul Tripán.

Citometría de flujo

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE CÉLULAS ADENOHIPOFISARIAS DE RATA

Ratas control y OVX fueron sacrificadas por decapitación y las adenohipófisis extraídas en 1000 uL de DMEM suplementado. Siguiendo el protocolo descrito en (Ferraris et al., 2014) se procesaron los tejidos para la obtención de células vivas adenohipofisarias. La viabilidad celular se determinó por el método de exclusión de Azul Tripán. Las células fueron fijadas con PFA al 0.2% v/v durante 15 minutos a temperatura ambiente, lavadas y centrifugadas y luego se las resuspendió en PBS. Mediante una técnica que preserva la integridad celular (descrita en (Sandra Zarate et al., 2012)) se permeabilizaron las células en una solución de PBS/saponina 0.2%, y después de sucesivos lavados y centrifugaciones, se las incubó con anticuerpos específicos acoplados a fluorocromos contra los antígenos de interés (anti-rat mPR α 4 μ g/ml, 306t, Thomas; o anti-rat GPER 1 μ g/ml, ab39742, Abcam y PRL 1:2000, AF65191, Dr. A. F. Parlow, NIDDK) durante 1 h a 37°C. A continuación se lavaron las células con PBS y fueron incubadas con anticuerpo secundario anti-conejo conjugado a ficoeritrina (anti-rb-PE, 1:67) y anti-guinea pig conjugado a fluoresceína (anti-gp-FITC, 1:75) (Chemicon International, Temecula, CA., USA) por 40 minutos a 37°C en agitación suave. Para los controles de isotipo, las células adenohipofisarias se incubaron con suero de guinea pig

reemplazando al anticuerpo anti PRL e IgGs de conejo en lugar de anti-GPER o anti-mPR α . Luego de lavar y resuspender las células en PBS, se cuantificó el número de células con simple o doble marca mediante la técnica de citometría de flujo (S Zarate et al., 2009). Se analizó la intensidad de fluorescencia de ≥ 10000 eventos/tubo usando un FACScalibur (BD). Para el análisis de los datos se utilizaron los softwares de WinMdi y FlowJo.

Western Blot

☞ WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE MPRs Y NPRs EN EXTRACTOS DE MEMBRANA Y CITOPASMÁTICOS DE CÉLULAS GH3

Para la preparación de lisados celulares y la obtención de extractos proteicos de membranas plasmáticas y extractos citoplasmáticos seguimos el protocolo descrito en (Pang et al., 2015). Se determinó la cantidad de proteínas por el método de Bradford. Se tomó de cada muestra el volumen correspondiente a 50 μ g de proteína y se agregó buffer de carga 5X y DTT 50mM (volumen final 30 μ l). Las muestras se calentaron a 95°C durante 5 minutos para desnaturalizar las proteínas.

Las muestras y el marcador de peso molecular se sembraron en geles de poliacrilamida al 15 %. Se realizó la electroforesis en una cuba conteniendo buffer de corrida (Tris-base 25mM, Glicina 192 mM, SDS 0.1% m/v) conectada a una fuente de poder a 130V durante 90-120 minutos. A continuación las muestras fueron transferidas desde los geles a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad) en buffer de transferencia (Tris-base 25mM, Glicina 192mM y Metanol 20% v/v) durante 75 minutos a voltaje constante (100V), en frío.

Incubación de las membranas:

1) Bloqueo de sitios inespecíficos: leche en polvo descremada 5 % m/v preparada en PBS Tween 0.05 % (PBS-T) durante 1h a temperatura ambiente.

2) Anticuerpo primario (Tabla 3), diluido en BSA 5% preparado en PBS-T, toda la noche a 4°C.

3) Anticuerpos secundarios conjugados a fluorocromos diluidos en Odyssey® Blocking Buffer (LI-COR Biotechnology, Lincoln, NE, USA)

Luego de cada incubación se lavó la membrana 3 veces durante 10 min con PBS-T.

Revelado de las membranas: Las bandas inmunorreactivas se revelaron mediante la detección de la fluorescencia acoplada al anticuerpo secundario en un equipo Odyssey CLx near-infrared fluorescence imaging system (LI-COR Biotechnology). La intensidad de las bandas (en píxeles) se cuantificó por medio del programa Image J.

☞ WESTERN BLOT PARA LA DETECCIÓN DE ERK TOTAL Y ERK FOSFORILADO

Para el ensayo de activación de ERK en células GH3, se cultivaron las células en placas de 12-wells a razón de $1 \cdot 10^6$ céls/well, deprivadas de suero durante 48 hs previas al experimento. Al segundo día se incubaron con P4, Org OD 02-0 y R5020 (20 nM) o vehículo durante 15 minutos. Como control positivo se incubaron las células con el factor de crecimiento epidérmico (EGF, 100 nM) siendo éste un conocido activador de la fosforilación de ERK. Luego de los tratamientos se recolectaron las células en Ripa Buffer (EMD Millipore, Billerica, MA, USA) conteniendo inhibidores de fosfatasas y proteasas (Thermo Fisher Scientific). Se lisaron y vortexearon las células durante 30 minutos. Se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 15000 g a 4°C para eliminar restos de *debris* celular. Una alícuota de 5 µl fue tomada del sobrenadante de cada una de las muestras para cuantificar proteínas por el método de Bradford. Las muestras (15 µg de proteína) se prepararon siguiendo el protocolo descrito anteriormente, con las mismas condiciones de corrida, transferencia y detección. Los anticuerpos específicos para ERK42/44 (ERK total) y fosfo p42/44 (ERK fosforilado) utilizados se encuentran detallados en la Tabla 3.

Radioinmunoensayo (RIA) para la detección de PRL de rata y ratón

Tanto para la determinación de los niveles de PRL de rata como de ratón, se utilizó la técnica de RIA, debido a que permite detectar y cuantificar el antígeno de interés (PRL) con un alto grado de sensibilidad y especificidad. La determinación

hormonal en muestras provenientes de animales control (WT, no tratados) con niveles bajos estimados de PRL en suero, se realizó en 10 µl de suero directo sin diluir, mientras que para la medición en muestras séricas provenientes de hembras con prolactinomas o en medios de cultivos de células GH3 se realizaron diluciones 1:100 o 1:150 con *buffer* PBS-EA 1%⁶ debido a la alta concentración de PRL en las mismas. Los reactivos utilizados fueron provistos por el Instituto Nacional de Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales (NIDDK), Instituto Nacional de Salud, Estados Unidos (NIH, USA). Anticuerpos primarios: anti-PRL de rata hecho en conejo (dilución de trabajo 1:250), anti-PRL de ratón hecho en conejo (1:140000). Anticuerpo secundario: suero policlonal de oveja anti-IgG de conejo (dilución de trabajo 1:1000). Los estándares de referencia de mPRL y rPRL respectivamente, fueron utilizados para el armado de una curva de concentraciones. La curva de concentraciones del estándar de referencia y la dilución de las muestras se realizaron por duplicado en un volumen final de 200 µl de *buffer* PBS-EA. A los tubos patrones y de muestra, se agregaron 100 µl del primer anticuerpo preparado en *buffer* PBS, EDTA 50mM, suero normal de conejo (NRS) entre 0.05% y 0.25%, 100µl de la hormona marcada (aproximadamente 18000 cpm/tubo, diluida en *buffer* PBS-EA) y se incubaron a temperatura ambiente durante 24 hs. Al día siguiente, cada tubo recibió 100µl del segundo anticuerpo diluido en PBS y 400µl de PBS con 8% de polietilenglicol y se incubó a temperatura ambiente por 2 hs 30 min y luego a 4°C durante 30 min. La unión no específica se determinó incubando la hormona marcada radiactivamente con [¹²⁵I] en ausencia del primer anticuerpo. La fracción que contiene la hormona libre fue separada de la fracción unida al anticuerpo por centrifugación a 4°C (centrífuga Sorvall ST 16, Thermo Scientific™) a 2500 rpm durante 30 min. Se aspiró el sobrenadante y se midió la radioactividad asociada al precipitado (correspondiente al complejo hormona-anticuerpo) en un contador γ Hewlett Packard (eficiencia: 82%). Los coeficientes de variación intra e inter-ensayo fueron 6.9 y 11.6%, respectivamente.

⁶ PBS (*buffer* fosfato 0,01M, NaCl 0,15M y 0.01% ázida sódica, pH 7,4) con 1% de albúmina de huevo (EA: *egg albumin*).

ELISA para la detección de TGF- β 1 activo y total en hipófisis de rata y de ratón

Preparación de las muestras: Tanto las adenohipófisis enteras de ratón como las hemi-hipófisis de rata fueron recolectadas en 80 y 100 μ l respectivamente de *buffer* de extracción con inhibidores de proteasas⁷. Se homogeneizaron las muestras con un homogeneizador manual durante aproximadamente 1 minuto por muestra. El homogenato se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se separó el sobrenadante y se descartó el pellet. En una alícuota del sobrenadante se determinó la cantidad de proteínas siguiendo el método de Bradford.

Detección de TGF- β 1: Todas las determinaciones se realizaron con el ensayo comercial TGF- β 1 Duo Set ELISA Development System (DY1679-05, R&D Systems), siguiendo las instrucciones del proveedor. La mínima dosis detectable con este *kit* es de 7.3 pg/ml y no muestra reactividad cruzada con otros péptidos. El *kit* utiliza el sistema “sándwich” de detección mediante dos anticuerpos anti-TGF- β 1 que reconocen distintos epitopes de la molécula. Con el primer anticuerpo o coating antibody (monoclonal) se recubren los pocillos de la placa y se “capturan” las moléculas de TGF- β 1 presentes en las muestras y en el estándar de referencia. Luego el segundo anticuerpo o “*detection antibody*” (policlonal) reconoce las moléculas de TGF- β 1 que ya estaban unidas al primer anticuerpo. Por último, se utiliza un sistema de detección basado en una reacción colorimétrica catalizada por la enzima HRP (peroxidasa de rabanito), utilizando como sustrato TMB 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (Sigma-Aldrich, T4444). El producto de la reacción, proporcional a la cantidad de TGF- β 1 en la muestra, se detecta por absorbancia a 450nm en un lector de ELISA. Se utilizó una curva estándar de referencia confeccionada a partir de una solución madre de TGF- β 1 provista por el kit, para determinar la concentración de TGF- β 1 presente en las muestras. El contenido de TGF- β 1 fue expresado como pg de TGF- β 1/mg proteína. Debido a los altos niveles de TGF- β 1 reportados en suero bovino y equino, para la medición de los niveles de TGF- β 1 en nuestras muestras de medios celulares, 24hs antes de largar el ensayo se reemplazó el

⁷ Tris-base 100 mM, CaCl₂ 10 mM, MgCl₂ 1 mM, Tritón-X-100 1 % e inhibidores PMSF TPCK TAME ZPCK y TLCK 1 X. pH ajustado a 7.4

medio de las células por uno libre de suero suplementado con BSA 200 µg/ml. Para la detección de TGF-β1 en muestras de homogenato, se sembraron volúmenes de muestra directamente (entre 50 y 80 µl por pocillo) llevados a un volumen final de 100 µl con *buffer* RD⁸.

Medición de AMPc por enzimoimmunoanálisis (EIA)

Para la medición de AMP cíclico intracelular se cultivaron las células GH3 en medio sin suero en placas de 12 wells a razón de 1. 10⁶ céls/well durante 72 hs previas al tratamiento con progestágenos (20 nM) o vehículo. Luego de los tratamientos, se lavaron las células con PBS frío y se les adicionaron 100 µl de HCl 0.2 M a temperatura ambiente. Con ayuda de una varilla se rasparon y homogeneizaron de forma manual las células recolectadas con pipeta para obtener un lisado celular. Luego de centrifugar la suspensión celular durante 10 minutos a 12000 g se diluyó el sobrenadante 3x. Se determinó la concentración de AMPc en las muestras con un Kit de EIA de AMPc específico (Cayman Chemical) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Medición de DA por HPLC

Se determinaron los niveles de DA, en fragmentos hipotalámicos incubados *ex vivo* (pmol/mg tejido) y en los medios colectados, por HPLC utilizando un equipo de cromatografía líquida (Varian 5000) acoplado a un detector electroquímico (BAS LC-4C). Los hipotálamos fueron pesados y homogeneizados previo a la de-proteinización con ácido perclórico 0.2N (1/20). Los homogenatos obtenidos fueron centrifugados y 50 µl de cada sobrenadante fueron inyectados en una columna de fase reversa 12.5 cm x 4 mm Nova-Pak C18 (Waters). La fase móvil incluyó los siguientes componentes: NaH₂PO₄.H₂O 0.076M, EDTA 0.99 mM, PICB8 5.24 ml/l, y metanol al 6 % v/v. El potencial del electrodo se fijó a 0.7 V. Se utilizó el Sistema de Datos de Cromatografía de Pico Simple (Modelo 302 Seis Canales USB) para medir la altura de los picos, usando curva estándar del mismo software. Los niveles de DA se relativizaron al peso del tejido húmedo o a los µl de medio.

⁸ Buffer RD (Suero bovino delipidizado 1.4% en PBS 1X ELISA con 0.05% de Tween 20)

Estadística

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar (SEM). Las pruebas estadísticas utilizadas en cada caso se describen en la leyenda de la figura correspondiente. Se consideraron diferencias significativas cuando el $P < 0.05$. En todos los casos se verificó que se cumplieran los supuestos de los modelos estadísticos utilizados: normalidad mediante los tests de Shapiro-Wilk y de D'agostino y Pearson ($P > 0.05$) y homocedacia (homogeneidad de varianzas) mediante el test de Bartlett ($P > 0.05$). El programa estadístico utilizado fue el Graph Pad Prism 6.0.

Se realizó la Prueba T de Student para muestras independientes cuando se compararon las medias entre dos grupos experimentales. Las comparaciones entre los diferentes tratamientos (V, 02, P4, R5020) se analizaron por ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey para comparaciones múltiples entre los diferentes tratamientos. Para el análisis de dos factores (*e.g.* sexo y genotipo ó genotipo y tratamiento) el set de datos fue analizado mediante ANOVA de dos factores; seguido del Test de comparaciones múltiples entre grupos de Bonferroni.

CAPÍTULO 1

Expresión de mPRs en hipófisis

INTRODUCCION CAPITULO 1

Quince años atrás, el Dr. Thomas y su grupo descubrieron un gen con un rol clave en la maduración de gametas en la corvina pinta (*Cynoscion nebulosus*). Dicho gen codificaba para un receptor de membrana con elevada y específica afinidad por P4 (Y. Zhu, Bond, & Thomas, 2003). Subsecuentemente, se encontraron alrededor de trece genes estrechamente relacionados a este gen en otros animales, incluyendo humanos, conformando una nueva familia de receptores esteroideos. Estos resultados atraieron el interés de la comunidad científica ya que proporcionaron una posible explicación para muchos temas aún no resueltos de la endocrinología y la biología del cáncer.

A partir de su descubrimiento en peces, la existencia de 5 diferentes subtipos (mPR α , - β , - γ , - δ y - ϵ) se ha demostrado también en diversos tejidos de mamíferos incluidos los humanos (Peter Thomas et al., 2007; Yong Zhu, Hanna, Schaaf, Spaink, & Thomas, 2008). Con respecto a su estructura química, los mPRs (PM= 40 kDa) son receptores de siete dominios transmembrana, presentan una afinidad elevada y específica para P4 y median sus efectos a través de proteínas G acopladas a vías de señalización. En general, se ha descrito que la activación de mPR α , mPR β , y mPR γ induce la señalización a través de una proteína G inhibitoria (G_i), provocando una disminución en la actividad de la enzima adenilato ciclasa (AC) y en los niveles de AMP cíclico (AMPC) en el interior celular. Por otra parte, mPR δ y mPR ϵ , han sido descritos asociados a proteínas G estimuladoras (G_s) lo cual conduce a un incremento en la actividad de AC y a un aumento en los niveles intracelulares de AMPC (Pang et al., 2013; Peter Thomas, 2008).

En mamíferos, mPR α y mPR β han sido identificados como los más abundantes en cerebro (rata, ratón) y tejidos reproductivos (Dressing et al., 2012; Dressing, Goldberg, Charles, Schwertfeger, & Lange, 2011; Pang et al., 2015; Zuloaga et al., 2012). El subtipo γ (mPR γ) se encontró principalmente expresado en pulmón, hígado, riñón, endometrio y trompas uterinas en ratón y humano (Nutu et al., 2007; Sinreih, Knific, Thomas, Frkovic Grazio, & Rizner, 2018), mientras que mPR δ y mPR ϵ se han descrito fundamentalmente en hipófisis y cerebro humano (Pang et al., 2013). Dentro de los 5

subtipos, mPR α (también denominado PAQR7) es el que, en la actualidad, se encuentra mejor caracterizado en animales vertebrados. Diversos estudios muestran que mPR α participa de numerosas funciones que incluyen la regulación de la fisiología uterina en humanos, la inhibición de la liberación de GnRH en roedores, la participación en la función del sistema inmune y la regulación de la síntesis de óxido nítrico en células endoteliales vasculares de humano, entre otros efectos reportados (Areia et al., 2016; Ashley, Arreguin-Arevalo, & Nett, 2009; Karteris et al., 2006; Lu, Reese, Zhou, & Hirsch, 2015; Meffre et al., 2013; Pang et al., 2015).

Por todo lo expuesto, se deduce que la P4 es capaz de iniciar acciones rápidas no genómicas a través de los mPRs en diferentes tejidos. Sin embargo, al momento no existen estudios concretos que demuestren el rol de estos receptores en la glándula hipofisaria.

☞ HIPÓTESIS

“Los mPRs se encuentran expresados en la glándula hipofisaria donde participan en los efectos rápidos de la progesterona en la población lactotropa, tanto en condiciones fisiológicas como patológicas”

☞ OBJETIVO GENERAL

Dilucidar la participación de los mPRs en el control de la función lactotropa ejercido por progesterona tanto a nivel hipofisario, como a nivel hipotalámico, evaluando situaciones fisiológicas y patológicas.

Objetivos específicos:

- ☞ Estudiar la expresión de los mPRs en adenohipófisis determinando los subtipos más abundantes.
- ☞ Analizar la co-localización con diferentes hormonas hipofisarias de los mPRs mayormente expresados en adenohipófisis.
- ☞ Estudiar el efecto de la activación de mPRs en hipófisis sobre la secreción de PRL.
- ☞ Investigar las vías de señalización involucradas mediante el uso de la línea celular somatolactotropa GH3.
- ☞ Estudiar la acción de progesterona mediada por mPRs en el hipotálamo sobre la liberación de dopamina.

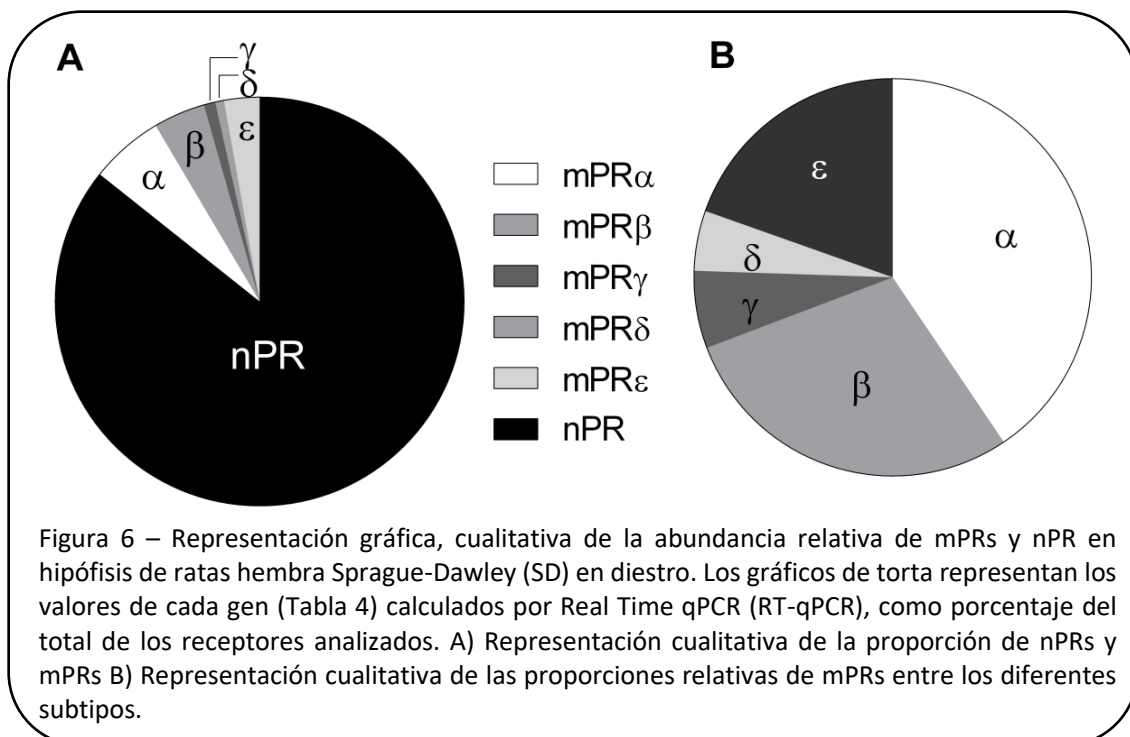
RESULTADOS CAPITULO 1

Expresión de los mPRs en hipófisis

En una primera instancia estudiamos la expresión génica de las distintas isoformas de mPRs en hipófisis y evaluamos la proporción relativa de cada uno de ellos y de los receptores clásicos (nPRs) sobre el total de PRs. Esto fue realizado por RT-qPCR en hipófisis normales de ratas hembra adultas Sprague Dawley sacrificadas en diestro. Todas las isoformas evaluadas: *mPRα*, *mPRβ*, *mPRγ*, *mPRδ* y *mPRε* se encontraron expresadas en hipófisis. Utilizando los datos de la Tabla 4 (valores de $2^{-\Delta Ct}$ obtenidos en RT-qPCR), se realizó un análisis cualitativo de la abundancia putativa de cada ARNm, el cual se representa como gráfico de torta en la Figura 6. De dicho análisis se desprende que los mPRs representarían aproximadamente el 15% del total de los receptores de progesterona en hipófisis, siendo *mPRα* y *mPRβ* los más abundantes.

Gen	$2^{-\Delta Ct} \pm SEM$
<i>mPRα</i>	0.155 ± 0.011
<i>mPRβ</i>	0.113 ± 0.008
<i>mPRγ</i>	0.025 ± 0.003
<i>mPRδ</i>	0.020 ± 0.001
<i>mPRε</i>	0.0725 ± 0.010
<i>nPR</i>	2.602 ± 0.379

Tabla 4 - Valores de cada gen calculados como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(Ct \text{ gen}-Ct \text{ Ciclofilina B})}$)



Una vez corroborada la expresión génica de los mPRs en adenohipófisis, y conociendo la abundancia preponderante del mPR α , a continuación analizamos la expresión proteica y la co-localización de este receptor con diferentes hormonas hipofisarias (PRL, LH y GH) por medio de la técnica de doble inmunocitoquímica (ICQ) en células dispersas de adenohipófisis de rata (Fig. 7). Como puede observarse en la Figura 7, tanto los lactotropos (PRL+) como los gonadotropos (β LH+) y somatotropos (GH+) expresan mPR α . La expresión de dicho receptor había sido previamente reportada en gonadotropos (Ashley et al., 2009), pero no así en lactotropos y somatotropos, donde la expresión y función de este receptor no estaban descriptas.

Con el objetivo de determinar el porcentaje de células hipofisarias que expresaban mPR α y más específicamente qué proporción de lactotropos expresaban dicho receptor, se realizaron ensayos de citometría de flujo, luego de una previa doble inmunomarcación para mPR α y PRL en células de cultivo primario de adenohipófisis de ratas en diestro con una técnica que preserva la integridad de la membrana celular (Sandra Zarate et al., 2012). Se cuantificaron aquellas células (eventos) inmunomarcadas para cada anticuerpo (Figura 8) y se obtuvieron los siguientes porcentajes del análisis de los resultados:

- el $42.1 \pm 11.6\%$ del total de células de la hipófisis anterior resultaron positivas para mPR α (Figura 8A)
- el 63% de las mPR α + también resultaron positivas para PRL (Figura 8B-C).

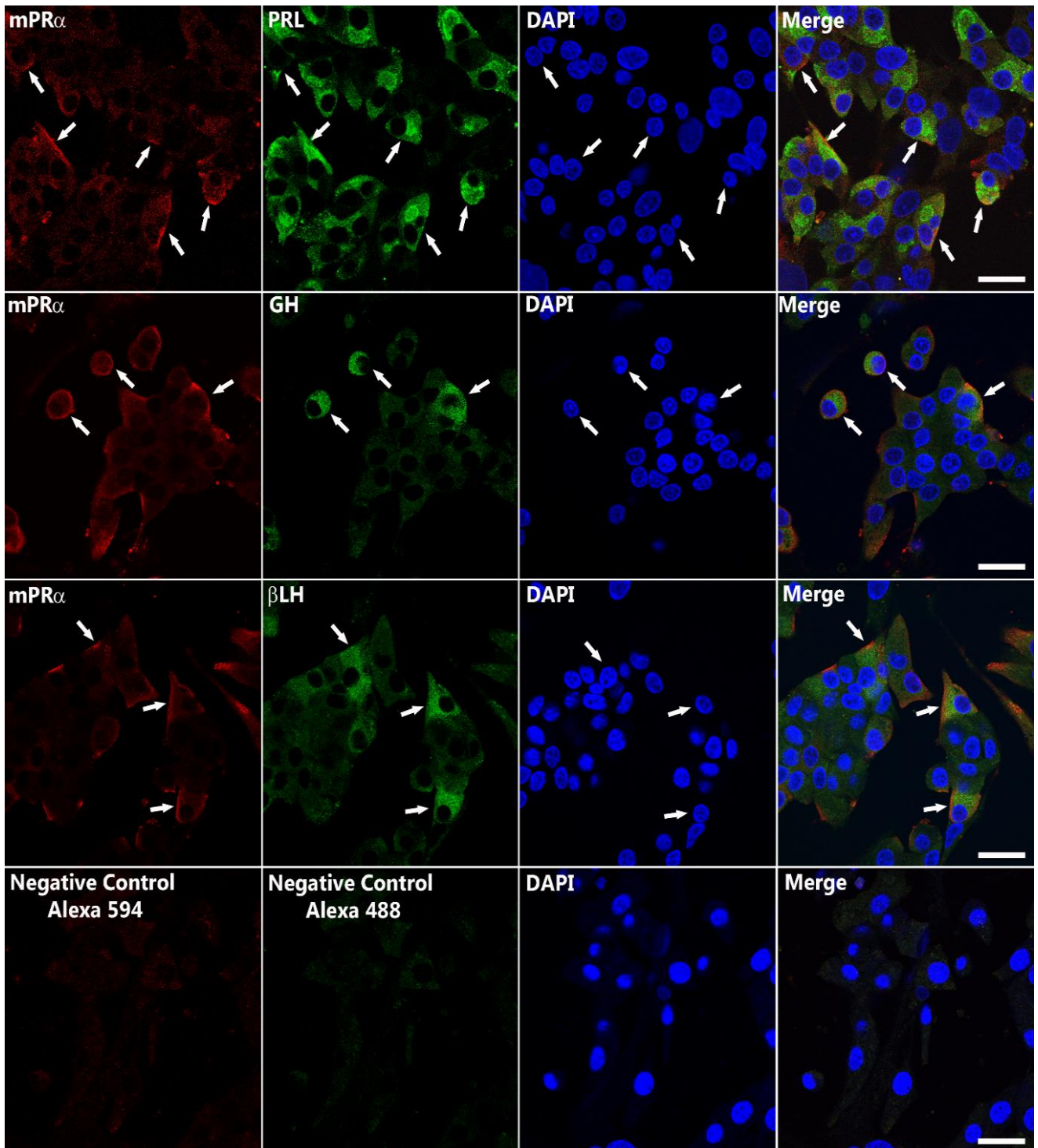
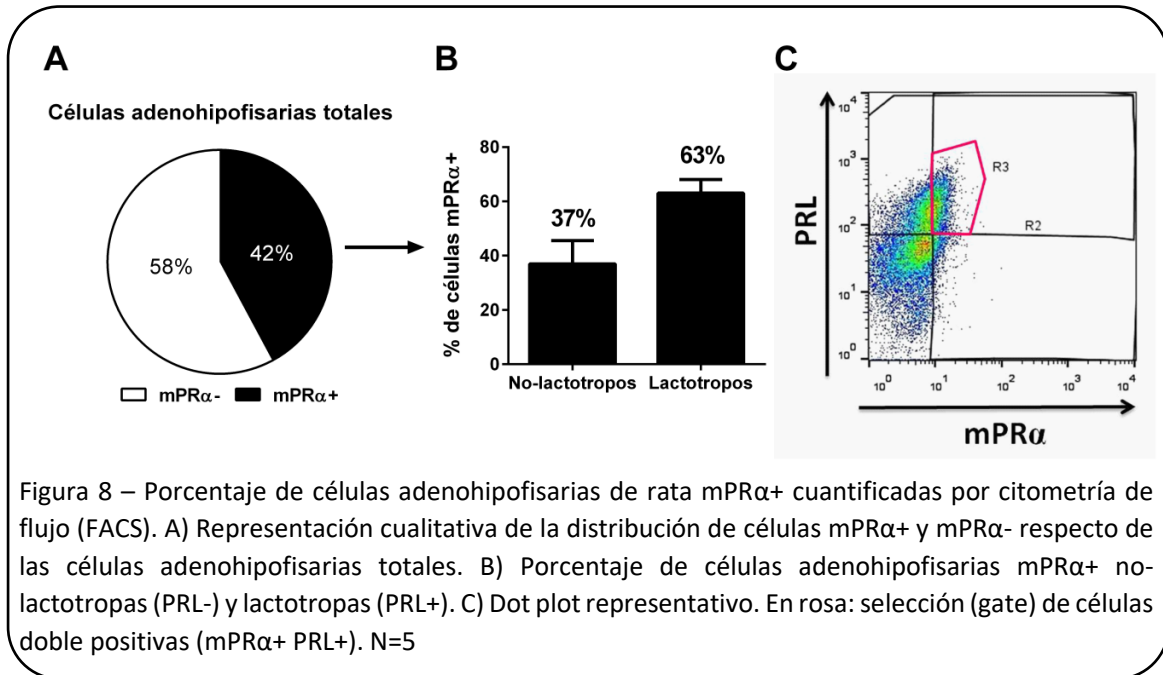


Figura 7 – Expresión de mPR α en células dispersas de adenohipófisis de rata SD hembra adulta. La identificación y co-localización de mPR α con las hormonas hipofisarias PRL, GH y LH se realizó por doble inmunofluorescencia indirecta. Las células adenohipofisarias fueron dispersadas en cultivo e incubadas con los anticuerpos específicos correspondientes (anti-rat mPR α 306t, Thomas, 1:50 y anti-PRL, GH o LH específicos provistos por el Dr. A Parlow 1:1000). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas blancas indican lactotropos (PRL+), somatotropos (GH+) y gonadotropos (β LH+) expresando mPR α . Para validar la especificidad del anticuerpo, células adenohipofisarias fueron incubadas con suero normal o IgGs correspondientes a la especie de los anticuerpos primarios y luego incubadas con anticuerpo secundario Alexa 594 o Alexa 488 en una dilución 1:2000. Barra de escala = 20 μ m



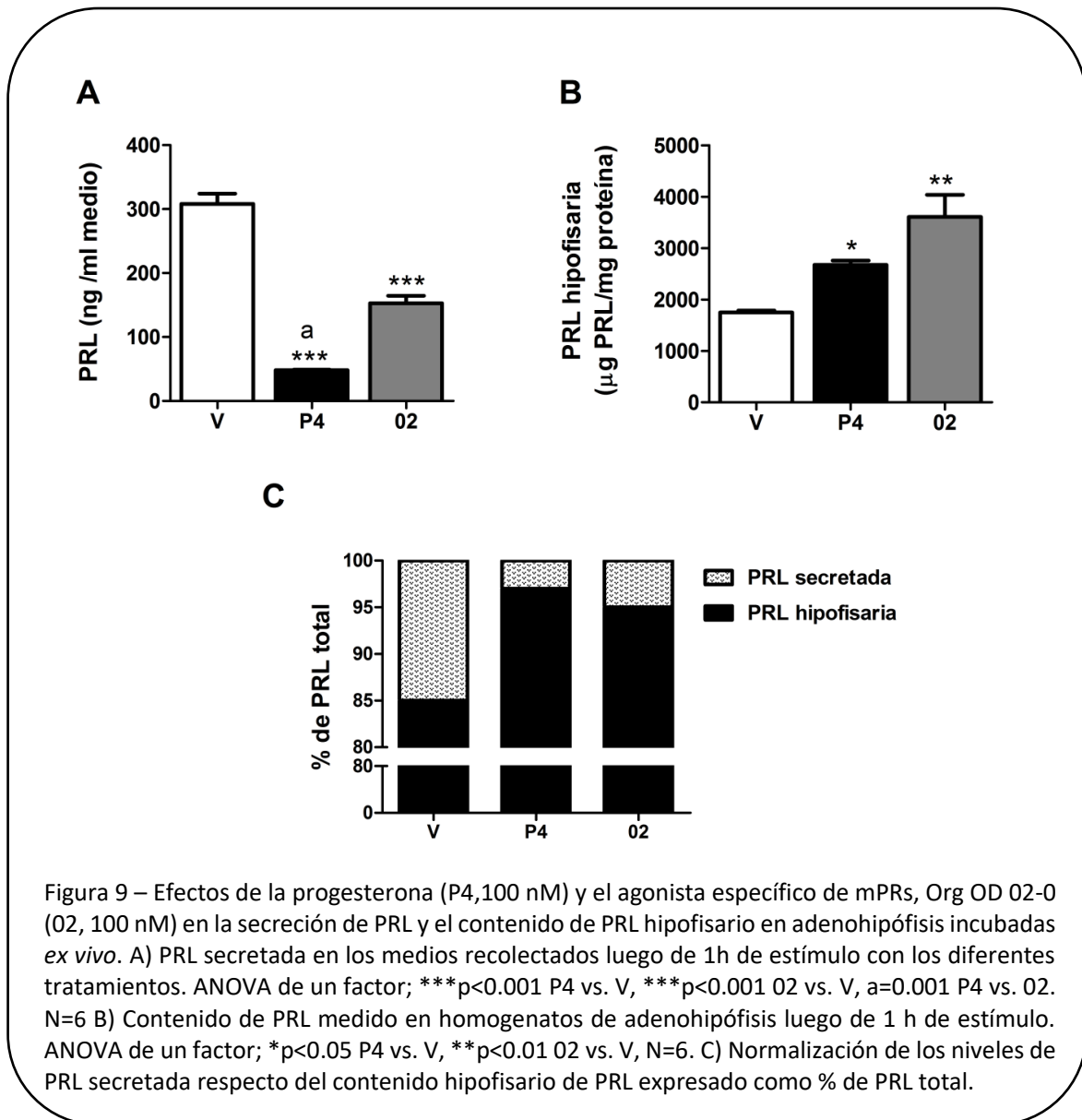
Habiendo observado que una gran proporción de células mPR α + eran lactotropos, y con el fin de evaluar el papel de dicho receptor en la funcionalidad del lactotropo, valiéndonos de estrategias farmacológicas, estudiamos el efecto de un agonista selectivo de mPR α / β : Org OD 02-0⁹; sin actividad agonista para los nPRs (Castelnovo et al., 2017; Peter Thomas et al., 2007; Zuloaga et al., 2012) sobre la secreción de PRL.

Para ello realizamos incubaciones ex vivo de explantes hipofisarios de ratas hembra adultas. El uso de este modelo experimental permite estudiar el efecto directo de P4 y/o el agonista de mPR α / β en la hipófisis, evitando las bien conocidas acciones de P4 en el hipotálamo que afectan indirectamente la función del lactotropo (Ver detalles de la metodología en MyM, Páginas 37-39).

Resultó interesante que el tratamiento con P4 (100 nM), durante 1 hora, inhibió fuertemente la liberación de PRL (Figura 9A), aumentando en consecuencia el contenido de PRL en la hipófisis (Figura 9B). El mismo efecto se observó luego del tratamiento con

⁹ Químicamente, Org OD 02-0 es un compuesto metilado derivado de la progesterona (10-etenil-19-norprogesterona) cuya especificidad de unión a mPR α y - β ha sido previamente demostrada en diversos tipos celulares de rata, ratón y humano (Castelnovo et al., 2017; Kelder et al., 2010; Zuloaga et al., 2012).

Org OD 02-0 (100nM), sugiriendo la participación de mPRs en esta acción a corto plazo de progesterona en la secreción de PRL. En la Figura 9C se muestran los valores normalizados a PRL total (contenido hipofisario + PRL secretada al medio) de forma tal de evidenciar que el aumento en el contenido de PRL en la glándula después del tratamiento con P4 u Org OD 02-0 se debe principalmente a la inhibición de la secreción hormonal.



Hasta aquí, y habiendo observado que la activación específica de mPR α/β conducía a una inhibición en la secreción de PRL *ex vivo*, nos propusimos validar nuestros resultados en un modelo *in vitro* utilizando la línea celular GH3.

El clon de células GH3, establecido en Julio de 1965 por A.H. Tashjian y colaboradores, es una línea celular somatolactotropa derivada de un tumor hipofisario desarrollado en ratas de la cepa Wistar Furth a los 7 meses de edad (Bancroft & Tashjian, 1970; Tashjian et al., 1970). Representa un excelente modelo para estudiar tanto los efectos y mecanismos involucrados en la regulación de la secreción de PRL, como el comportamiento de células lactotropas tumorales ante diferentes estímulos *in vitro*.

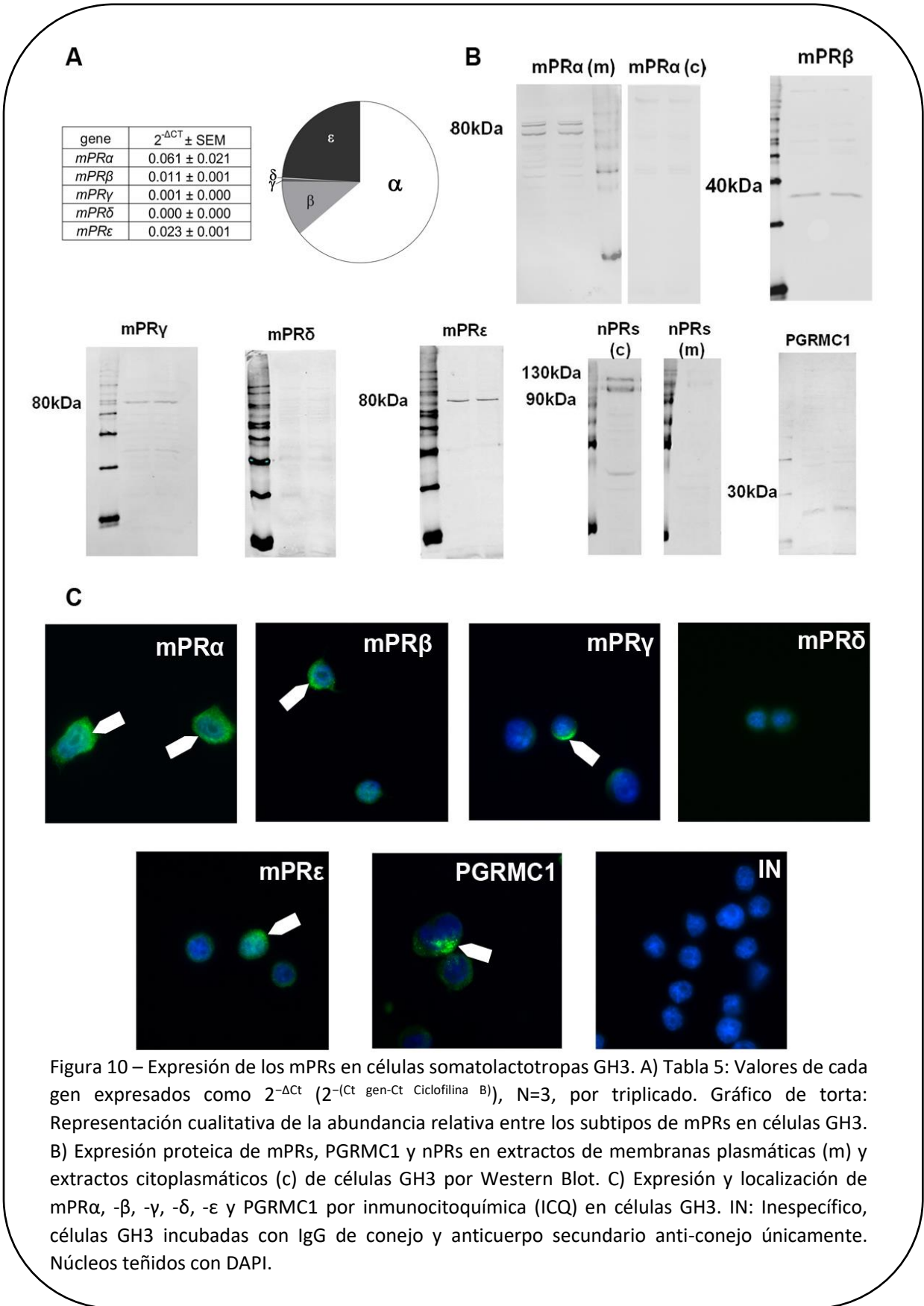
mPRs en células GH3

En primer término, tuvimos que caracterizar los mPRs en esta línea celular, y para ello comenzamos estudiando la expresión génica de mPRs por RT-qPCR (Fig. 10) y encontramos que todas las isoformas de mPRs se encontraban expresadas en las células GH3 y, al igual que en células hipofisarias normales, mPR α fue el subtipo más abundante entre los mPRs, seguido de mPR ϵ y mPR β .

Luego evaluamos la expresión proteica de los mPRs en las células GH3 por Western Blot (WB) y por ICQ. Utilizando extractos de membrana plasmática de células GH3, y anticuerpos específicos contra mPRs, nPRs y PGRMC1 (Materiales y Métodos, Tabla 3) detectamos la expresión proteica de mPRs, nPRs y PGRMC1 (Fig. 10B) mediante WB. Se observaron bandas inmunorreactivas de los tamaños predichos previamente por otros autores (Castelnovo et al., 2017; Pang et al., 2013, 2015; Peter Thomas, 2008) que probablemente representan dímeros de mPR α (\approx 80 kDa), mPR γ y mPR ϵ (\approx 80 kDa), y monómeros de mPR β (\approx 40 kDa) y PGRMC1 (\approx 28 kDa).

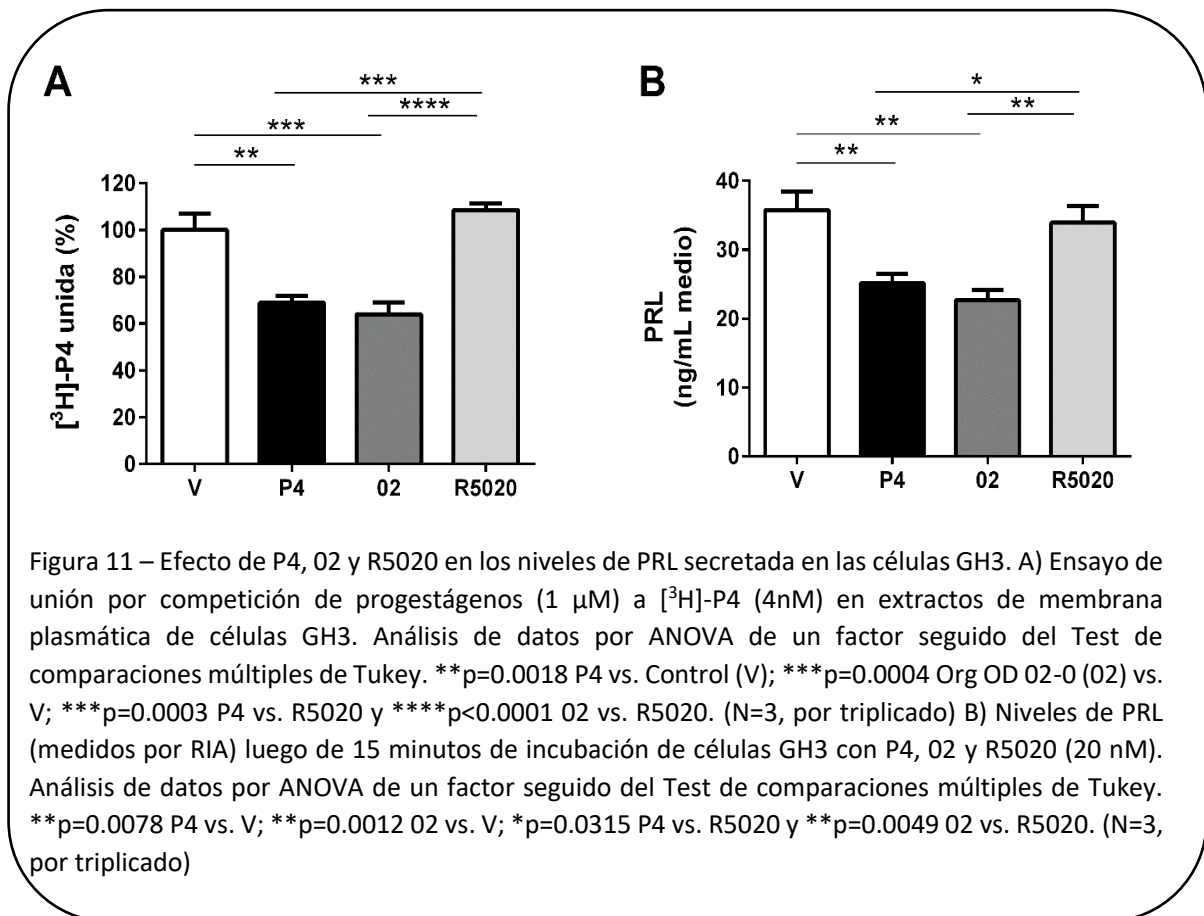
Cabe destacar también que con un anticuerpo específico para nPRs se detectaron dos bandas a los pesos moleculares descriptos para PR-A y PR-B en las muestras de extracto citosólico del lisado celular (c), observándose bandas débiles a los mismos pesos moleculares en las muestras de extractos de membrana (m).

Además, examinamos la expresión y localización de mPRs por ICQ y como puede observarse en la Fig. 10C, mPR α , β , γ , ϵ y PGRMC1 se expresan en células GH3, mientras que no logramos detectar mPR δ , hecho que probablemente refleja los bajos niveles de ARNm encontrados por q-PCR.



En pos de corroborar no sólo la expresión, sino también que efectivamente los mPRs poseían la capacidad de unir P4 y Org OD 02-0 en las células GH3, realizamos un ensayo de competición simple. Para tal fin, incubamos extractos de membranas plasmáticas de células GH3 con P4, O2 y R5020 (1 μ M) en presencia de progesterona radioactiva ($[^3\text{H}]\text{-P4}$, 4nM) y luego medimos la capacidad de desplazamiento de los competidores a la $[^3\text{H}]\text{-P4}$ unida en un contador de centelleo (Fig. 11A). Como puede observarse, tanto P4 como O2; pero no R5020, tienen la capacidad de unirse a los mPRs en las células GH3.

Con estos resultados positivos acerca de la presencia y especificidad de los mPRs en la línea celular, realizamos luego ensayos *in vitro* para analizar la funcionalidad de los mismos, incubando a las células GH3 con los progestágenos mencionados (Fig. 11B). Observamos, luego de tan sólo 15 minutos de incubación, que tanto P4 como el agonista de mPRs Org OD 02-0 ejercen un efecto rápido, inhibitorio sobre la secreción de PRL; mientras que este efecto no se observó con R5020, sugiriendo la participación de mPRs, pero no de los nPRs, en dicho efecto.



Estudios de mecanismos de señalización celular

Como mencionáramos en la introducción general, los mPRs son receptores de 7 pasos transmembrana acoplados a proteínas G (Y. Zhu et al., 2003; Yong Zhu et al., 2008). Siendo que la señalización de mPR α en lactotropos era desconocida, como punto de partida comenzamos estudiando las vías involucradas previamente reportadas para este receptor en otros tipos celulares (Dressing et al., 2012; Pang et al., 2015).

Participación de la proteína G inhibitoria en la activación de mPR α en las células GH3

Para estudiar la participación de la vía G inhibitoria, realizamos un pretratamiento de las células durante 30 minutos con la Toxina de *Bordetella pertussis* (PTX, 2.5 μ g/ml), que desacopla la unión receptor-proteína G inhibitoria, y luego incubamos las células con la batería de estímulos (P4, Org OD 02-0, R5020, 20 nM). Finalizado el tiempo de tratamiento (15 minutos), medimos niveles de PRL en el medio (Fig. 12A). Como resultado de este experimento pudimos observar que Org OD 02-0 disminuye los niveles de PRL en el grupo sin actividad de PTX (control con PTX previamente inactivada). Sin embargo, este efecto no se observó al pretratar las células con PTX indicando que el efecto inhibitorio mediado por mPR α es dependiente de la activación de una proteína G inhibitoria.

En segundo lugar, medimos niveles de Adenosín Monofosfato Cíclico (AMPC) intracelular luego de incubar las células con los progestágenos (Fig. 12B). Al cabo de 15 minutos, observamos que tanto P4 como Org OD 02-0, disminuyeron los niveles de AMPC intracelular (medidos por enzimoimmunoanálisis), mientras que este efecto no se observó con R5020.

Por otra parte, estudiamos la implicancia de la vía de MAPK/ERK luego de la activación de mPR α : incubamos las células con P4 y Org OD 02-0 (20nM) durante 15 minutos y a partir del lisado celular, preparamos las muestras para WB y analizamos la relación entre ERK fosforilada y ERK total. Como se muestra en la Fig. 12C, tanto P4 como

el agonista de mPR α/β aumentan la relación entre la quinasa fosforilada y la total respecto de las células tratadas con vehículo (V), indicado la participación de esta vía.

El resumen de las vías de señalización involucradas luego de la activación de mPR α en células GH3 se esquematiza en la Fig. 12D.

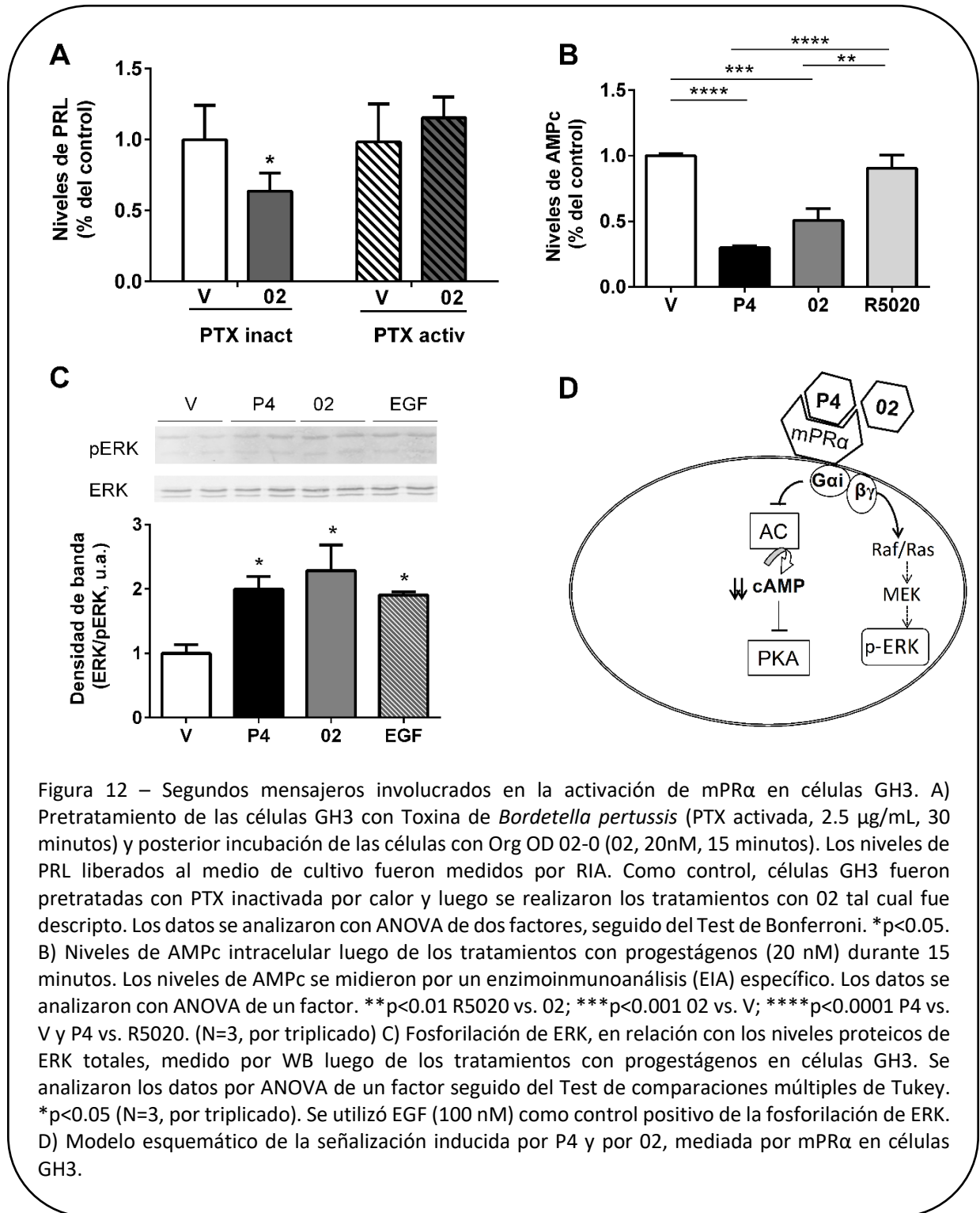


Figura 12 – Segundos mensajeros involucrados en la activación de mPR α en células GH3. A) Pretratamiento de las células GH3 con Toxina de *Bordetella pertussis* (PTX activada, 2.5 μ g/mL, 30 minutos) y posterior incubación de las células con Org OD 02-0 (O2, 20nM, 15 minutos). Los niveles de PRL liberados al medio de cultivo fueron medidos por RIA. Como control, células GH3 fueron pretratadas con PTX inactivada por calor y luego se realizaron los tratamientos con O2 tal cual fue descrito. Los datos se analizaron con ANOVA de dos factores, seguido del Test de Bonferroni. * $p < 0.05$. B) Niveles de AMPc intracelular luego de los tratamientos con progestágenos (20 nM) durante 15 minutos. Los niveles de AMPc se midieron por un enzoinmunoanálisis (EIA) específico. Los datos se analizaron con ANOVA de un factor. ** $p < 0.01$ R5020 vs. O2; *** $p < 0.001$ O2 vs. V; **** $p < 0.0001$ P4 vs. V y P4 vs. R5020. (N=3, por triplicado) C) Fosforilación de ERK, en relación con los niveles proteicos de ERK totales, medido por WB luego de los tratamientos con progestágenos en células GH3. Se analizaron los datos por ANOVA de un factor seguido del Test de comparaciones múltiples de Tukey. * $p < 0.05$ (N=3, por triplicado). Se utilizó EGF (100 nM) como control positivo de la fosforilación de ERK. D) Modelo esquemático de la señalización inducida por P4 y por O2, mediada por mPR α en células GH3.

Mecanismo novel de señalización de los mPRs implicado en la inhibición de PRL

Factor de Crecimiento Transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$)

El factor de crecimiento transformante $\beta 1$ (TGF $\beta 1$) es una citoquina ampliamente distribuida en diversos tejidos, al igual que sus receptores serina/treonina kinasa tipos I y II (Pastorcic, De, Boyadjieva, Vale, & Sarkar, 1995; Sarkar, Chaturvedi, Oomizu, Boyadjieva, & Chen, 2005; Sarkar, Kim, & Minami, 1992). TGF $\beta 1$ se encuentra implicado en múltiples procesos biológicos como embriogénesis, desarrollo y homeostasis celular, inmunidad humoral, proliferación y apoptosis (Itoh, Watabe, & Miyazono, 2014; Watabe & Miyazono, 2009; Zhang, 2018).

La biología de TGF $\beta 1$ es compleja e involucra numerosos componentes que, en conjunto, regulan la actividad biológica de esta potente citoquina.

Luego de su síntesis, TGF $\beta 1$ es secretado acoplado a proteínas de latencia que lo mantienen anclado en la matriz extracelular, donde permanece inactivo, como reserva. La liberación de la citoquina de sus complejos latentes se denomina “activación” y representa un paso clave en la regulación de su actividad biológica (Annes, Munger, & Rifkin, 2003; Rifkin, 2005; Todorovic et al., 2005). En este proceso intervienen diferentes factores, entre ellos diversas proteasas, como plasmina, trombospondina 1 y metaloproteasas, que en general, son tejido específicos (Li et al., 2017; Rosini et al., 2018). Es así como, en la mayoría de los tejidos, sólo una pequeña proporción de TGF $\beta 1$ se encuentra en estado activo.

Resultados previos de nuestro laboratorio sugieren que la activación local de TGF $\beta 1$ en hipófisis es una buena estrategia terapéutica para el tratamiento de prolactinomas (Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux, Camilletti, Rifkin, Becu-Villalobos, & Díaz-Torga, 2012; M.V. Recouvreux, Camilletti, Rifkin, & Díaz-Torga, 2016; M.V. Recouvreux et al., 2018).

En particular, antecedentes demuestran que:

- TGF β 1 hipofisario media, al menos en parte, los efectos inhibitorios de la dopamina sobre la proliferación y secreción de lactotrofos. (M Victoria Recouvreux, Guida, Rifkin, Becu-Villalobos, & Diaz-Torga, 2011; Sarkar et al., 2005).
- Los niveles de TGF β 1 activo se encuentran disminuidos en hipófisis tumorales respecto de las hipófisis control (normales) en diferentes modelos animales de prolactinoma. (Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2012).

Tratamientos *in vivo* con activadores locales de TGF β 1 lograron reducir el peso de las hipófisis y normalizar los niveles de prolactina sérica en modelos experimentales de prolactinoma rata y ratón al cabo de 4 semanas de tratamiento (Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2012).

Por otra parte, trabajos previos del laboratorio demostraron que, tanto dopamina como estradiol, los principales factores reguladores de la función del lactotrofo, modulan también la síntesis hipofisaria de TGF β 1 y su activación local. Sin embargo, se desconocen aún los efectos de la progesterona sobre la activación de TGF β 1 en hipófisis y los receptores involucrados.

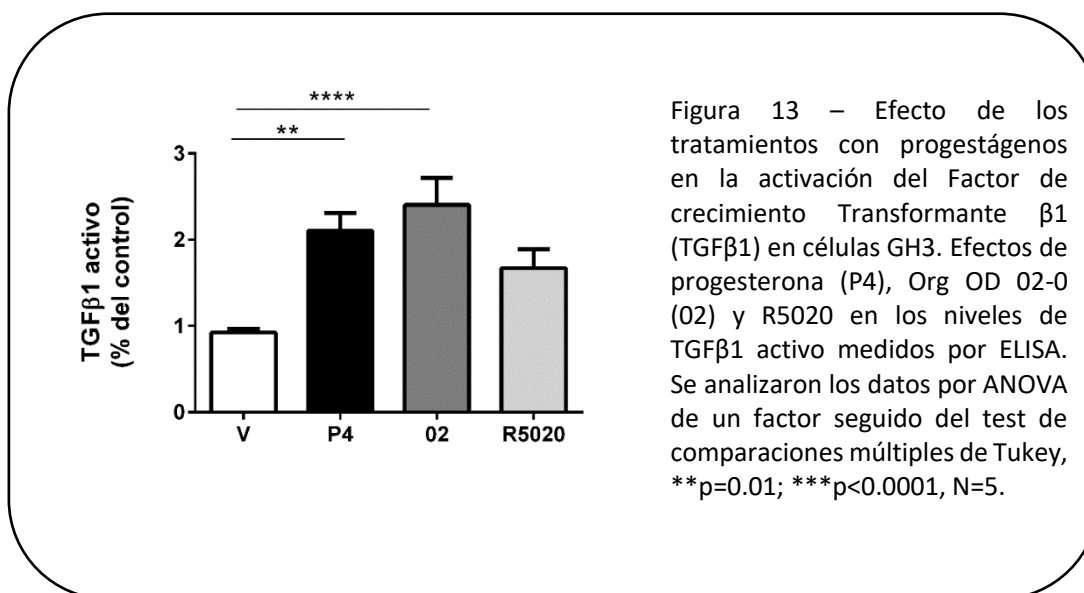
Trabajos recientes demuestran que P4 induce la decidualización de endometrio mediante un aumento de TGF β 1 activo en células epiteliales que luego actuaría en forma paracrina sobre los receptores de TGF β 1 presentes en las células estromales (M. R. Kim et al., 2005). Otra evidencia de la relación P4-TGF β 1 ha sido demostrada en el tejido óseo, donde se describió que P4 induce un aumento en la actividad de TGF β 1 en osteoblastos favoreciendo el proceso de remodelación ósea (Luo, Liao, & Su, 2002). Finalmente se observó que un co-tratamiento de E2 + P4 es necesario para mantener la actividad apoptótica de p53 en el epitelio mamario y así suprimir la tumorigenesis de la glándula. Este efecto de los esteroides sería mediado por TGF β 1 (Becker et al., 2005).

Con estos antecedentes, nos propusimos profundizar la señalización intracelular inducida por activación de mPRs y evaluar la regulación que ejerce progesterona y sus análogos sobre la activación de TGF β 1 y los receptores involucrados.

Efecto de P4, O2 y R5020 en la activación de TGFβ1 en células GH3

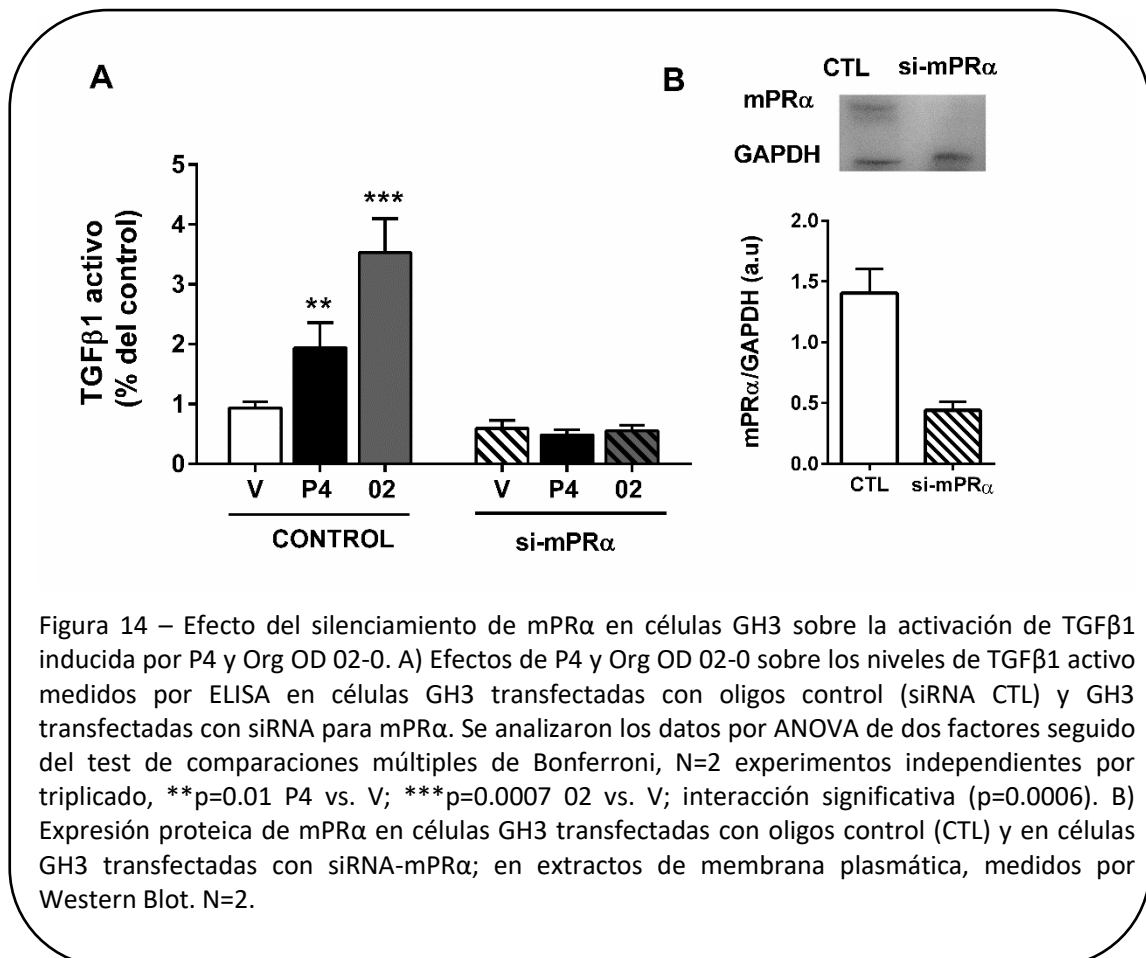
Postulamos que TGFβ1 mediaría, al menos en parte, la inhibición de las funciones del lactotrofo ejercida por P4 a través de los mPRs. Para corroborar esta hipótesis estudiamos los efectos rápidos de P4 y Org OD 02-0 sobre la activación hipofisaria de TGFβ1. Continuamos con los ensayos *in vitro* en la línea celular GH3, y, como puede observarse en la Figura 13, cuando las células GH3 fueron estimuladas con progesterona (P4, 20mM) o con Org OD 02-0 (O2, 20mM) durante 15 minutos se observó un aumento significativo de la actividad de TGFβ1 (niveles de TGFβ1 activo en el medio de cultivo, medidos por ELISA específico (DY1679-05, R&D Systems)).

Este efecto no fue observado (al menos no de significancia estadística) cuando las células fueron estimuladas con un agonista específico de los receptores clásicos de progesterona (nPRs): R5020 (20nM), indicando que la activación de TGFβ1 inducida por progesterona sería mediada por los mPRs en la línea celular GH3.



Estos resultados demuestran por primera vez un mecanismo novel de acción de P4 a través de los mPRs. Para evaluar si específicamente el efecto observado de P4 y Org OD 02-0 en la activación de TGFβ1 estaba mediado por mPRα realizamos un ensayo de silenciamiento génico.

Para ello, células GH3 fueron transfectadas con ARN pequeño de interferencia (siRNA-mPR α) o con oligos inespecíficos (CTL) durante 48hs. Luego, ambos grupos de células fueron incubadas con P4, Org OD 02-0 y R5020 (20 nM) durante 15 minutos a 37°C y finalizado el tiempo, se midieron los niveles de TGF β 1 activo en los medios recolectados por un ELISA. Como puede observarse en la Figura 14, el silenciamiento de mPR α anuló completamente el efecto de P4 y Org OD 02-0 sobre la activación de TGF β 1 en las células GH3 corroborando la participación necesaria de mPR α en la activación de TGF β 1 inducida por ambos progestágenos. Como control de estos ensayos, se verificó el efecto estimulador de P4 y Org OD 02-0 en células GH3 transfectadas con oligos inespecíficos (Figura 14A, Panel izquierdo). Asimismo, se confirmó por Western Blot la eficacia del procedimiento de silenciamiento del receptor con siRNA -mPR α , al no observarse la expresión proteica del mismo (la banda específica que sí se observó en el grupo de células controles) (Fig. 14B).



Vías de señalización involucradas en la activación de TGFβ1

A continuación, estudiamos las vías de señalización involucradas en el efecto observado sobre la activación de TGFβ1 mediado por mPRα. Comenzamos estudiando la participación de una proteína G de tipo inhibitoria. Realizamos un pretratamiento de las células GH3 con PTX (2.5 µg/ml, 30 min) y luego incubamos con Org OD 02-0 (20nM, 15 min) (ver metodología completa en M&M página 42). Al finalizar el período de incubación, recolectamos los medios y medimos TGFβ1 activo por ELISA (Fig.15A). Observamos que 02 incrementó significativamente los niveles de TGFβ1 activo; pero este efecto no fue observado en aquellas células pretratadas con PTX, sugiriendo que el efecto estimulador de 02 sobre los niveles de TGFβ1 activo es dependiente de la activación de una proteína G inhibitoria.

Para estudiar si efectivamente el efecto de mPRα involucra la típica cascada de señalización vía Gi, con inhibición de la adenilato ciclasa, tratamos las células GH3 con un inhibidor farmacológico de la enzima, el 2',5'-dideoxyadenosine (ddAdo) (Enzo Life Sciences, Farmingdale, NY). Como se observa en la figura 15B, ddADO imita el efecto estimulador de Org OD 02-0 sobre la activación de TGFβ1, indicando que la inhibición de adenilato ciclasa es un evento involucrado en este proceso. Además, confirmamos la participación de esta vía estimulando a las células con un análogo permeable de AMPc en alta concentración (8-Br-AMPc, 10 µM) en co-tratamiento con los progestágenos. Al cabo de 15 minutos, recolectamos los medios y medimos niveles de TGFβ1 activo por ELISA (Fig. 15C). La co-incubación con 8-Br-AMPc anuló el efecto de 02 sobre TGFβ1. Es decir, para que la activación de TGFβ1 se produzca, es necesario que ocurra una disminución de los niveles intracelulares de AMPc, por lo tanto, frente al agregado de AMPc exógeno, el efecto estimulador de Org OD 02-0 en la activación de TGFβ1 desaparece.

Por último, evaluamos la participación de la vía de ERK/MAPK. Utilizando un inhibidor de MEK1 y 2, pertenecientes a la cascada de las MAPK (PD98059, 10 µM),

preincubamos las células durante 1 h y luego co-incubamos con Org OD 02-0 (20 nM, 15 min) (Fig. 15D). Tanto en el grupo pretratado con PD98059 como en el grupo control, vimos un aumento significativo en los niveles TGFβ1 activo de las células incubadas con Org OD 02-0 respecto de las células control, indicando que la vía de MAPK/ERK no estaría implicada en dicho efecto.

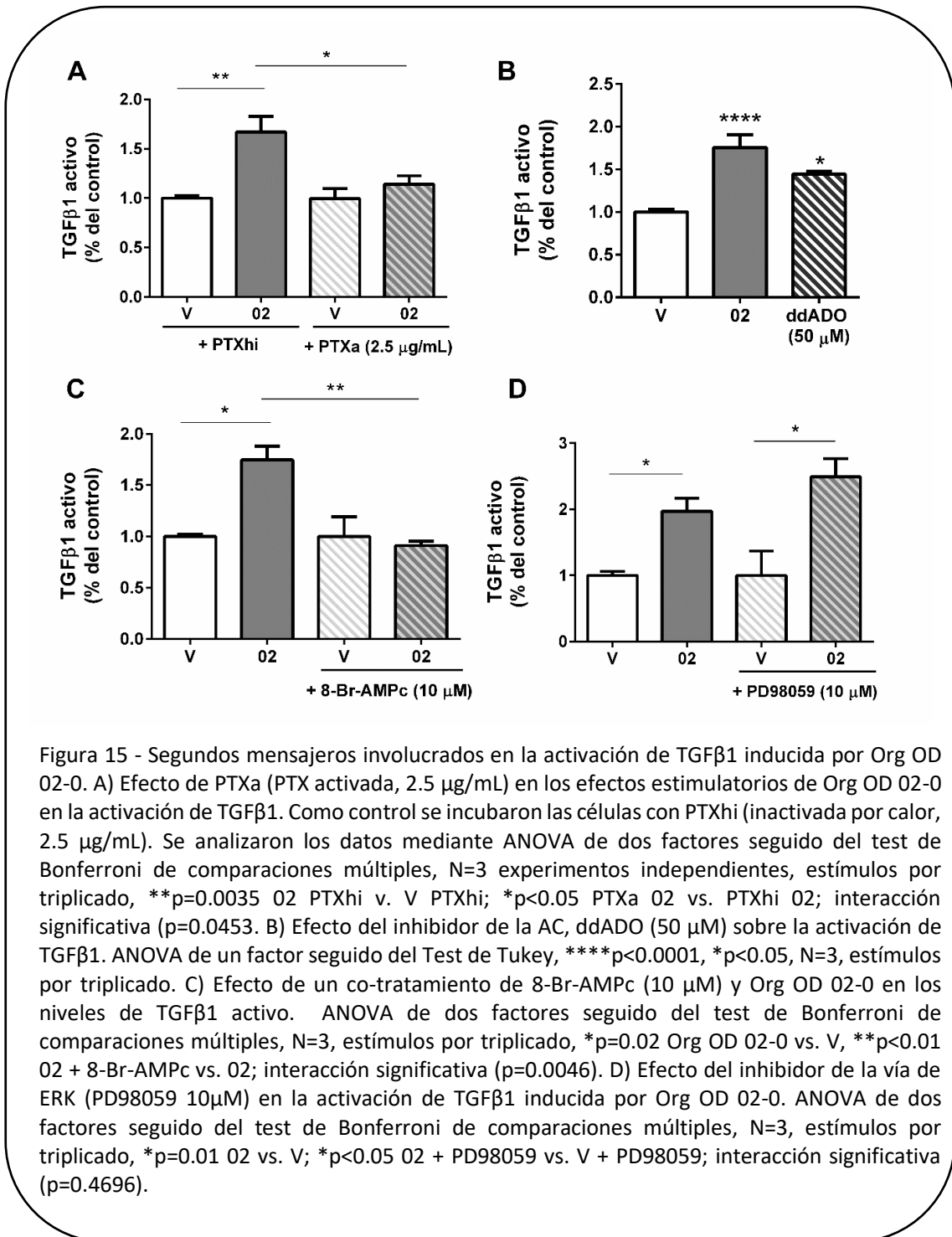


Figura 15 - Segundos mensajeros involucrados en la activación de TGFβ1 inducida por Org OD 02-0. A) Efecto de PTXa (PTX activada, 2.5 μg/mL) en los efectos estimulatorios de Org OD 02-0 en la activación de TGFβ1. Como control se incubaron las células con PTXhi (inactivada por calor, 2.5 μg/mL). Se analizaron los datos mediante ANOVA de dos factores seguido del test de Bonferroni de comparaciones múltiples, N=3 experimentos independientes, estímulos por triplicado, **p=0.0035 02 PTXhi v. V PTXhi; *p<0.05 PTXa 02 vs. PTXhi 02; interacción significativa (p=0.0453). B) Efecto del inhibidor de la AC, ddADO (50 μM) sobre la activación de TGFβ1. ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey, ****p<0.0001, *p<0.05, N=3, estímulos por triplicado. C) Efecto de un co-tratamiento de 8-Br-AMPC (10 μM) y Org OD 02-0 en los niveles de TGFβ1 activo. ANOVA de dos factores seguido del test de Bonferroni de comparaciones múltiples, N=3, estímulos por triplicado, *p=0.02 Org OD 02-0 vs. V, **p<0.01 02 + 8-Br-AMPC vs. 02; interacción significativa (p=0.0046). D) Efecto del inhibidor de la vía de ERK (PD98059 10μM) en la activación de TGFβ1 inducida por Org OD 02-0. ANOVA de dos factores seguido del test de Bonferroni de comparaciones múltiples, N=3, estímulos por triplicado, *p=0.01 02 vs. V; *p<0.05 02 + PD98059 vs. V + PD98059; interacción significativa (p=0.4696).

Acción de progesterona en el hipotálamo mediada por mPRs

Además de la acción directa sobre la población de lactotrofos, P4 también regula indirectamente la secreción de PRL, al actuar sobre las neuronas dopaminérgicas en el hipotálamo (Lydia A. Arbogast & Voogt, 1994, 2002; Liu & Arbogast, 2010; Gerardo G. Piroli et al., 1996; Gerardo Piroli et al., 1998). Este efecto ha sido bien estudiado en el modelo de rata. Sin embargo, la contribución de mPRs en este efecto era, hasta el momento, desconocida.

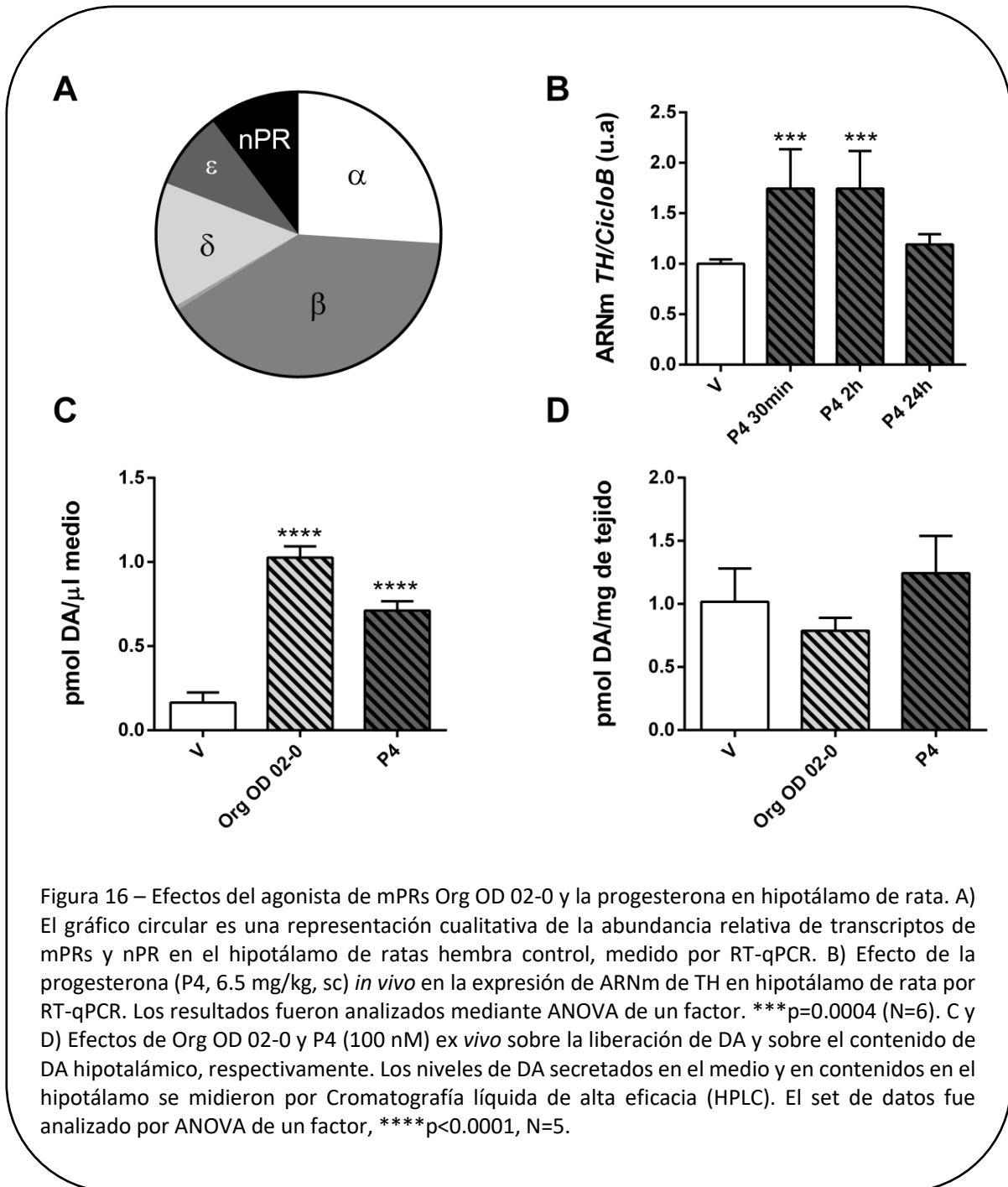
Nuestra hipótesis de trabajo es que los mPRs se expresan en el hipotálamo y participan en acciones rápidas no genómicas de la progesterona regulando indirectamente la funcionalidad del lactotrofo.

Para evaluar la contribución de los mPRs en la acción de progesterona sobre la liberación de dopamina (DA) (acción que afectará indirectamente la liberación de PRL) comenzamos evaluando la expresión de mPRs en hipotálamo. Realizamos un ensayo preliminar en tres ratas hembra, en el cual evaluamos la expresión de todos los tipos de receptores de P4 mediante RT-qPCR en dos áreas hipotalámicas diferentes, por separado, con el fin de determinar si había diferencias en la expresión de estos genes en esas áreas: el hipotálamo anterior, incluido el área óptica, y el hipotálamo medio-basal, incluida la eminencia media, extrayendo dichas áreas como se describió previamente en (Catalano et al., 2010). No se encontraron diferencias en cuanto a la expresión de mPRs entre estas 2 áreas (datos no mostrados), por lo tanto los siguientes estudios se realizaron en hipotálamos enteros de ratas hembra SD en diestro.

Gen	$2^{-\Delta Ct} \pm SEM$
<i>mPRα</i>	1.270 \pm 0.097
<i>mPRβ</i>	1.875 \pm 0.124
<i>mPRγ</i>	0.021 \pm 0.006
<i>mPRδ</i>	0.736 \pm 0.103
<i>mPRϵ</i>	0.424 \pm 0.055
<i>nPR</i>	0.498 \pm 0.045

Tabla 6 - Valores de cada gen calculados como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(Ct \text{ gen} - Ct \text{ Ciclofilina B})}$)

En base a los resultados de $2^{-\Delta Ct}$ mostrados en la Tabla 6 se presenta un análisis cualitativo de las proporciones relativas de la expresión hipotalámica de los receptores de progesterona como gráfico de torta (Fig. 16A).



En la Fig. 16A, puede observarse claramente, y llamativamente, que los mPRs representan aproximadamente el 90% de los receptores de progesterona en el hipotálamo de rata. Este porcentaje es realmente alto, en comparación con la expresión de nPRs (aproximadamente un 10%), y en comparación con los datos obtenidos en hipófisis. Del mismo análisis se deduce que mPR α y mPR β tienen la expresión más alta entre los mPRs en el hipotálamo.

A la luz de estos resultados, proponemos que los mPRs participan en las acciones de P4 a nivel hipotalámico y en pos de profundizar el estudio examinamos:

- El efecto de P4 *in vivo* sobre la expresión de la enzima Tirosina Hidroxilasa (TH) en hipotálamos de ratas hembra
- El efecto de P4 y el agonista de mPRs Org OD 02-0 en la liberación de DA en ensayos *ex vivo*

Para ello, se realizó un tratamiento con progesterona *in vivo* (6.5mg/kg hidroxiprogestero, Proluton Depot, Schering, sc) en ratas hembra adultas de la cepa SD inyectando a los animales y sacrificándolos a diferentes tiempos (30 min, 2hs y 24 hs) de tratamiento. Como controles se usaron ratas en diestro inyectadas con aceite de ricino (vehículo). Se extrajeron los hipotálamos en Trizol[®] y se analizó la expresión de ARNm de TH mediante RT-qPCR. Como puede observarse en la Figura 16B, P4 estimuló significativamente la expresión génica de TH hipotalámica a los 30 min y 2 h, normalizándose los niveles después de 24 h de tratamiento.

A continuación, y en base a estos resultados, evaluamos el efecto directo de P4 y Org OD 02-0 (100 nM) sobre la liberación de DA en explantes de hipotálamo de rata incubados *ex vivo* (Faraoni et al., 2017) (Detalles en MyM páginas 37-39). Los niveles de DA liberados al medio, y el contenido hipotalámico de DA fueron evaluados por Cromatografía Líquida de Alta Eficiencia (HPLC) (Fig. 16C). Al cabo de 1 hora de tratamiento, tanto P4 como Org OD 02-0, aumentaron significativamente la liberación de DA al medio. Sin embargo, no se encontraron diferencias en el contenido hipotalámico de DA después de los tratamientos (Fig. 16D).

CONCLUSIONES CAPITULO 1

- Los mPRs se encuentran expresados en hipófisis, siendo mPR α y mPR β los de mayor expresión.
- Los lactotropos presentan alta expresión de mPR α .
- La activación específica de mPR α produce una inhibición en la secreción de prolactina *ex vivo*.
- La línea celular GH3 derivada de un prolactinoma de rata, expresa mPRs, siendo el α el más abundante.
- La activación de mPR α , vía proteína G inhibitoria: (i) disminuye los niveles de AMPc, (ii) aumenta la fosforilación de ERK (iii) e induce la activación de TGF β 1 (un potente inhibidor de la función del lactotrofo); sugiriendo posibles mecanismos para la inhibición de PRL en células GH3.
- Los mPRs se encuentran altamente expresados en hipotálamo (90% del total de receptores de progesterona), siendo mPR α y mPR β los de mayor expresión.
- La activación de los mPRs hipotalámicos induce la liberación de dopamina.

DISCUSION DEL CAPITULO 1

Los mPRs median una gran variedad de acciones no genómicas de los progestágenos y se encuentran localizados en la mayoría de los tejidos reproductivos en mamíferos (Dressing et al., 2011; Karteris et al., 2006). Los resultados del presente estudio demuestran que los mPRs (ARNm y proteínas) se expresan en la glándula hipofisaria y en la línea celular somatolactotropa GH3 siendo mPR α el mPR más abundante. Esto es consistente con estudios previos que muestran a mPR α como el subtipo principal de mPRs expresado en hipófisis de otras especies (Ashley et al., 2009; Hanna & Zhu, 2009; Kazeto, Goto-Kazeto, & Trant, 2005).

Asimismo, mediante técnicas histológicas, detectamos la expresión de mPR α en gonadotropos, somatotropos y lactotropos. La presencia del receptor en gonadotropos enfatiza la implicancia de mPR α en el control del eje gonadotrópico-GnRH (Ashley et al.,

2009). Estudios realizados por Sleiter y colaboradores, demuestran claros efectos inhibitorios de P4 en la secreción de GnRH y LH mediados por mPR α en roedores, inclusive en el modelo transgénico de ratones KO para el receptor clásico nuclear (PR KO) (Sleiter et al., 2009). La expresión en somatotropos también fue un hallazgo interesante, ya que no existen al momento evidencias de un rol para este receptor en la regulación de GH por progesterona. Por otro lado, el hecho de que mPR α se encuentre tan altamente expresado en la población lactotropa, sugería un rol fisiológico de este receptor en relación a la regulación de PRL.

El rol de la progesterona en la regulación de PRL es controversial. Algunos estudios han reportado una inhibición (Haug & Gautvik, 1976; Huang, Tsai, Tung, & Wang, 1995) mientras que otros sugieren que P4 promueve la secreción de PRL (Yen & Pan, 1998). Nuestros resultados postulan una acción regulatoria negativa de P4 sobre la función del lactotrofo actuando vía mPRs.

De acuerdo con nuestros resultados, previas observaciones de Cramer et al. demuestran que un tratamiento *in vivo* con progesterona estimula la liberación de dopamina al sistema porta-hipofisario en ratas hembra (Cramer, Parker, & Porter, 1979b). De igual manera, otros autores sostienen que P4 actúa a nivel hipotalámico, incrementando la actividad de TH, la principal enzima en la síntesis de dopamina, conduciendo indirectamente a la inhibición de secreción de PRL (L A Arbogast & Voogt, 1993).

Por otro lado, durante mucho tiempo se pensó que tanto las acciones directas como indirectas de la P4 en la secreción de PRL dependían de la activación de los receptores nucleares (nPRs) (Jensik & Arbogast, 2011). Sin embargo, a lo largo de este capítulo hemos demostrado la participación de receptores no clásicos de membrana en acciones rápidas de la P4 tanto a nivel hipofisario como hipotalámico. Mediante ensayos *ex vivo*, que evitan la influencia hipotalámica, comprobamos que tanto P4 como el agonista de mPR α/β Org OD 02-0 disminuyen significativamente la secreción de PRL sugiriendo un rol inhibitorio de P4 sobre el lactotrofo, actuando vía mPRs. Si bien nuestros resultados sugieren efectos directos en lactotrofos, no descartamos la posibilidad de participación de efectos paracrinós siendo que mPR α se encuentra

presente también en otros tipos celulares hipofisarios como gonadotropos y somatotropos.

Asimismo, estudiamos las vías de señalización implicadas en las acciones rápidas inhibitorias de P4 en la secreción de PRL, utilizando la línea celular somatolactotropa GH3. En primer lugar, demostramos por las técnicas de Real Time qPCR, Western Blot e ICQ que las 5 isoformas de mPRs se encontraban expresadas en las células GH3. Nuevamente mPR α resultó ser el subtipo más abundante. En segundo lugar, demostramos, mediante un ensayo de binding por competición simple, que P4 y Org OD 02-0 pero no R5020 (agonista de nPRs) eran capaces de desplazar la unión de P4 radioactiva en extractos celulares de membranas plasmáticas de células GH3, evidenciando la presencia de mPRs específicos y funcionales en células GH3. Demostramos también *in vitro* (células GH3) que la secreción de PRL es inhibida por P4 y por Org OD 02-0 (y no así por R5020) en concordancia con los resultados obtenidos con los mismos tratamientos en explantes hipofisarios. Además, concluimos que el efecto inhibitorio de Org OD 02-0 involucra la activación de una proteína G inhibitoria, dado que el efecto del agonista de mPRs sobre la liberación de PRL se previno con un pretratamiento con la Toxina de *Bordetella pertussis*. De hecho, corroboramos que tanto los tratamientos con P4 como con Org OD 02-0 son capaces de disminuir los niveles de AMPc intracelulares, probablemente por la inhibición de la enzima adenilato ciclasa. Por último, observamos que P4 y Org OD 02-0 aumentan la fosforilación de ERK sugiriendo otro posible mecanismo para la inhibición de PRL en células GH3.

Cabe destacar aquí que ambos mecanismos de acción, vía proteína G_i y niveles reducidos de AMPc, y la activación de ERK habían sido previamente descritos como los principales mecanismos mediante los cuales dopamina regula la síntesis y secreción de PRL en el lactotrofo (Ben-Jonathan & Hnasko, 2001).

Por otra parte, ha sido descrito que, en hipófisis, TGF β 1 es uno de los posibles mediadores de la acción inhibitoria dopaminérgica en lactotropos. La dopamina, actuando a través del Drd2, up-regula la expresión y secreción de TGF β 1 contribuyendo al efecto inhibitorio de dopamina (Sarkar et al., 2005, 1992, 1998). Según estudios previos de nuestro laboratorio, la actividad de TGF β 1 hipofisario se encuentra finamente

regulada por dopamina y estradiol, los principales factores involucrados en el control de la función lactotropa (M Victoria Recouvreux et al., 2011); sin embargo nada se sabía aún sobre la regulación de esta citoquina por progesterona. Otros grupos han reportado que la progesterona es capaz de activar TGF β 1 en células tumorales de mama y en células de pulmón (M. R. Kim et al., 2005; Kunzmann, Ottensmeier, Speer, & Fehrholz, 2018). Sin embargo, los mecanismos por los cuales la progesterona induce la activación de TGF β 1 y los receptores de progesterona involucrados se desconocen al presente.

Un descubrimiento novel de esta tesis es la activación rápida de TGF β 1 por progesterona en un mecanismo mediado por mPR α en células lactotropas. Demostramos que mPR α participa de estos efectos (i) con el uso de agonistas farmacológicos, donde demostramos que Org OD 02-0 imita la acción estimuladora de P4, mientras que esto no se observa con el agonista del nPR R5020; y (ii) en estudios de silenciamiento génico con ARN pequeño de interferencia, donde evidenciamos que la expresión de mPR α es indispensable para que ocurra este efecto rápido de P4 en la activación de TGF β 1.

El efecto estimulador de Org OD 02-0 en la activación de TGF β 1 involucra la vía de activación vía proteína G inhibitoria y niveles reducidos de AMPc siendo que estas acciones de Org OD 02-0 fueron bloqueadas frente a un pretratamiento con la toxina de *Bordetella pertussis* y un co-tratamiento con un análogo permeable de AMPc (8-Br-AMPc) respectivamente. Es interesante destacar, que esta misma vía de señalización ha sido descrita previamente en la activación de TGF β 1 por dopamina a través de sus receptores tipo 2 acoplados a proteínas de tipo G inhibitoria en lactotropos de rata (Sarkar et al., 2005). De acuerdo con nuestros resultados, Pastorcic y Sarkar (Pastorcic & Sarkar, 1997) demostraron que un tratamiento de células adenohipofisarias con Forskolina, un activador de AC, inhibió significativamente los niveles de TGF β 1 en el medio de cultivo y los niveles del mensajero de TGF β 1 en extractos celulares. Por tanto, es posible que la inhibición de AMPc sea un mecanismo involucrado en la activación de TGF β 1 por progestágenos.

Además de la vía de AMPc, se ha observado que componentes de la vía de MAPK participan en la cascada de activación de los mPRs en varios tipos celulares (Dressing et al., 2012; Pang et al., 2013). Es así como demostramos que la fosforilación de ERK se

encontraba involucrada en la inhibición de PRL. Sin embargo, la inhibición farmacológica de esta vía no fue suficiente para bloquear el efecto inducido por el agonista de los mPRs en la activación de TGF β 1, sugiriendo que la cascada de MAPK no sería un evento indispensable en dicho efecto.

Con respecto a la expresión de los mPRs en el hipotálamo, encontramos expresión de todas las isoformas, siendo mPR α la más abundante, concordante con estudios anteriores en rata y en tejido humano que muestran altos niveles de expresión génica y proteica de estos receptores, no sólo en hipotálamo sino también en otras regiones cerebrales (Intlekofer & Petersen, 2011; Pang et al., 2013; Zuloaga et al., 2012).

Esto resulta de particular interés teniendo en cuenta que la regulación de la secreción de PRL por progesterona puede darse también por un efecto indirecto a través del hipotálamo. Se ha descrito que P4 actúa sobre las neuronas del núcleo arcuato regulando los niveles de expresión de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), clave en la síntesis de dopamina. Estas acciones, no obstante, son controversiales en la bibliografía. Si bien se han encontrado evidencias de que un tratamiento con P4 es capaz de inhibir TH facilitando la liberación de PRL (Arbogast & Voogt 1993; Arbogast & Voogt 1994), estudios previos demuestran que la inducción de la expresión de TH por P4 actuaría contrarrestando los efectos crónicos estrogénicos y disminuyendo los niveles de PRL sérica (Piroli *et al.* 1996). Esta discrepancia en los resultados podría deberse a varios factores: el tipo de tratamiento (dosis, tipo de progestágeno, duración del estímulo), el entorno hormonal, pero seguramente también al tipo de receptor de progesterona involucrado, no tenido en cuenta en esos trabajos previos. Nuestros resultados demuestran que la activación específica de mPR α y β induce la liberación rápida de DA en explantes hipotalámicos. Esta secreción rápida de DA *in vivo* conduce a una inhibición de la secreción de PRL.

Resumiendo: demostramos la expresión, especificidad y función hipofisaria e hipotalámica de los mPRs, mediante los cuales P4 inhibe la secreción de PRL: *i*) por acción directa en hipófisis activando una proteína Gi; e *ii*) induciendo la rápida liberación de dopamina a nivel hipotalámico. Estos resultados han sido recientemente publicados en (Camilletti et al., 2018).

CAPÍTULO 2

Progesterona y sus
receptores en prolactinomas
inducidos por estrógenos.

Impacto de una OVX

INTRODUCCION CAPITULO 2

ANTECEDENTES

Como mencionamos en la introducción, este proyecto nace por la inquietud de buscar terapias alternativas para prolactinomas resistentes a las terapias con drogas dopaminérgicas. Dentro de ese contexto, nos enfocamos a estudiar la participación de la progesterona en el desarrollo de prolactinomas debido a la gran controversia existente en la bibliografía. Esta controversia fue detallada en la introducción y se encuentra resumida en la Tabla 7.

TIPO DE P4	CEPA RATA/ RATÓN	♀/♂	OVX	MODELO	DOSIS	EFFECTOS DE P4 EN HIPÓFISIS
PROGESTERONA (SIGMA)	HOLTZMAN	♀	✓		0,8 MG/KG	INHIBE EFECTOS POSITIVOS ESTROGÉNICOS SOBRE LA SECRECIÓN DE PRL (Brann et al., 1988)
LEVONORGESTREL (LNG)	FISCHER F344	♀	✓	RATAS DES	PELLET 12MG POR RATA	DISMINUYE TAMAÑO TUMORAL Y PRL SÉRICA ACTUANDO SOBRE GALANINA, ESTIMULADO POR E2 (G G PIROLI ET AL., 2001)
PROGESTERONA (SIGMA)	SPRAGUE- DAWLEY	♂	×	RATAS DES	CÁPSULA- NO FIGURA	DISMINUYE TAMAÑO TUMORAL Y PRL SÉRICA. ACTÚA VIP, ESTIMULADO POR E2 (Heinzlmann et al., 2010)
PROGESTERONA (SIGMA)	SPRAGUE- DAWLEY	♂	×	RATAS DES	CÁPSULA - NO FIGURA	CAMBIA DISTRIBUCIÓN DE CÉLULAS FOLÍCULO ESTRELLADAS EN LA GLÁNDULA, ACTÚA CON UN ROL PROTECTOR EN LA FORMACIÓN DEL TUMOR (HEINZLMANN & KOVES, 2008)

TIPO DE P4	CEPA RATA/RATÓN	♀/♂	OVX	MODELO	DOSIS	EFFECTOS DE P4 EN HIPÓFISIS
PROGESTERONA (ROUSSEL-UCLAF LABORATORY)	WISTAR	♀	✓	EX VIVO, A LAS DOS SEMANAS DE LA OVX	10 ⁻⁶ M	ANTAGONIZA LOS EFECTOS PRO-APOPTÓTICOS DE TNF- α EN LACTOTROPOS MEDIADO POR LOS ESTRÓGENOS (CANDOLFI ET AL., 2005)
PROGESTERONA ENDÓGENA OVÁRICA	RATÓN TRANSGÉNICO O HCGB+	♀	×	RATÓN TRANSGÉNICO HCGB+	-	LOS ALTOS NIVELES DE PROGESTERONA ESTARÍAN COLABORANDO EN LA FORMACIÓN DE PROLACTINOMAS (RATNER ET AL., 2012)
PROGESTERONA ENDÓGENA/FACTORES OVÁRICOS	RATÓN DRD2 KO	♀	✓	RATÓN DRD2 KO		LA OVX DISMINUYE LOS NIVELES DE PRL Y EL TAMAÑO HIPOFISARIO. UN TRATAMIENTO CON E2 NO RESTABLECE LOS NIVELES DE PRL SÉRICA NI EL TAMAÑO HIPOFISARIO ALCANZADO PREVIO A LA OVX SUGIRIENDO LA PARTICIPACIÓN DE LA P4 EN LA FORMACIÓN DE PROLACTINOMAS (SCHUFF ET AL., 2002)

Tabla 7 – Diferentes resultados encontrados en la literatura sobre el rol de la progesterona en la tumorigénesis hipofisaria

Esta disparidad de resultados podría explicarse, al menos en parte, por:

- La cepa y el sexo de la rata utilizada dado que es conocido que diferentes cepas poseen diferente sensibilidad al efecto estrogénico (Banerjee, De, & Sarkar, 1994; Banerjee, Sarkar, Weston, De, & Campbell, 1997; G Piroli, Lima, Diaz-Torga, & De Nicola, 1994). Muchos grupos han realizado los estudios en ratas macho para evitar la influencia del ciclo estral y de los factores ováricos (Heinzlmann & Koves, 2008; Heinzlmann et al., 2010);
- los diferentes procedimientos experimentales utilizados (tipo de tratamiento, duración, momento de inicio del co-tratamiento con progesterona, dosis utilizadas, entre otros);
- y en ninguno de los estudios realizados previamente se había considerado la posible acción de progesterona vía mPRs.

Respecto al primer ítem, en el caso de las ratas hembra, además de utilizarse diferentes cepas, se habían utilizado modelos de ratas estrogenizadas enteras o previamente ovariectomizadas (OVX), con resultados controvertidos. En este contexto, lo primero que quisimos evaluar es el efecto de un co-tratamiento con P4 en nuestro modelo experimental de ratas hembra Sprague Dawley de 60 días, y a su vez evaluar si la OVX afectaba realmente tanto el efecto crónico de los estrógenos como el posterior co-tratamiento con P4.

Utilizamos los siguientes modelos animales:

- RATAS OVARIECTOMIZADAS (OVX)

La castración de ratas hembra adultas SD fue realizada bajo anestesia quirúrgica inducida por Ketamina y Xilacina según dosis recomendada por personal veterinario del Bioterio IByME (k: 50 mg/kg y x: 10 mg/kg, IP). Los ovarios fueron removidos por una incisión en la región dorsal, y procurando conservar la integridad muscular de la zona. Al finalizar el procedimiento se suturó la incisión de forma tal de facilitar el proceso de cicatrización. Los animales recibieron analgésico en el agua de bebida durante los 5 días post cirugía. Como grupo control se utilizaron ratas de la misma cepa y edad, en diestro al momento del sacrificio. Las etapas del ciclo estral fueron determinadas mediante el análisis de las proporciones celulares en muestras de frotis vaginal observados al microscopio óptico durante 2 ó 3 ciclos consecutivos. Se eligió el estadio diestro para disminuir la variabilidad en los controles, debido a que es el momento del ciclo estral de menor concentración hormonal de E2, PRL, P4.

- RATAS HEMBRA ESTROGENIZADAS (RATAS DES)

El modelo de ratas tratadas crónicamente con estrógenos ha sido ampliamente utilizado en el estudio de los prolactinomas (Banerjee et al., 1994, 1997; Gerardo G. Piroli et al., 1996). El tratamiento estrogénico crónico *in vivo* induce, en primer lugar una hiperplasia, una hipertrofia y una desgranulación de los lactotropos, con la consecuente hiperprolactinemia y pérdida proporcional de otros tipos celulares hipofisarios. Estudios bioquímicos señalan que alrededor de la cuarta semana, esta hiperplasia deriva en un adenoma de lactotropos o prolactinoma. Posteriormente se produce la ruptura de la estructura de acinos celulares típica de la glándula, la desorganización de la red de

reticulina, la aparición de lagunas sanguíneas y un marcado aumento de la angiogénesis local. Bajo una exposición estrogénica más prolongada, el adenoma puede llegar a convertirse en un adenocarcinoma.

Este modelo experimental, en nuestro laboratorio, consiste en la aplicación de un pellet subcutáneo de 20 mg del estrógeno sintético dietilestilbestrol (DES) en hembras adultas SD, que induce, en alrededor de 4-6 semanas, un prolactinoma (Grupo DES). Este procedimiento es realizado bajo anestesia con ketamina y Xilacina, según dosis anteriormente descrita. Si bien esta cepa SD es menos sensible a los estrógenos que la Fischer 344 (F344), se ha demostrado que ya a la cuarta semana de tratamiento crónico con estos esteroides en las ratas SD se produce una considerable hiperplasia e hipertrofia de lactotropos que duplica o triplica en tamaño a una hipófisis normal (Diaz-Torga, Gonzalez Iglesias, Achaval-Zaia, Libertun, & Becu-Villalobos, 1998; Suarez et al., 2003). Un grupo de estos animales fue tratado con progesterona (6.5mg/kg de progesterona, Sigma-Aldrich, sc, 1 vez por semana), desde la semana 0 de colocado el pellet DES (co-tratamiento con estradiol) hasta la semana 4 (Grupo DES + P4) como se esquematiza en la Figura 17.

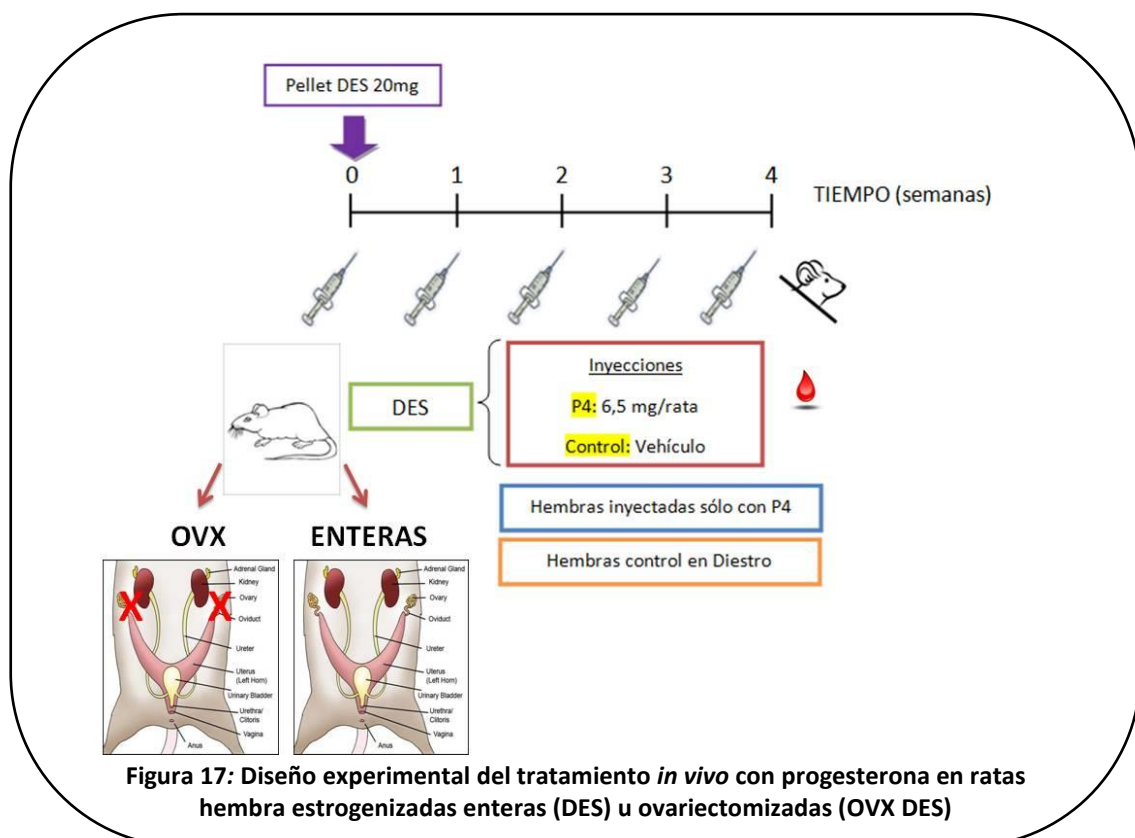


Figura 17: Diseño experimental del tratamiento *in vivo* con progesterona en ratas hembra estrogenizadas enteras (DES) u ovariectomizadas (OVX DES)

Se utilizaron además hembras control en diestro (inyectadas con vehículo, V) y otro grupo de hembras no estrogenizadas tratadas sólo con progesterona (Grupo P4).

Este mismo esquema fue realizado en paralelo en otro grupo de hembras previamente OVX (OVX 15 días antes del implante del pellet DES), contando así con los grupos: OVX-Control (V, vehículo), OVX + P4, OVX DES, OVX DES+P4). Luego de cuatro semanas del inicio del experimento, y a las 48hs posteriores a la última inyección de P4, se sacrificaron los animales de todos los grupos. Se pesaron las adenohipófisis extraídas (sin el lóbulo neurointermedio) y se recolectó sangre troncal para la medición de PRL sérica por RIA. La Figura 18 muestra comparativamente los parámetros de peso hipofisario y prolactina sérica en todos los grupos experimentales evaluados.

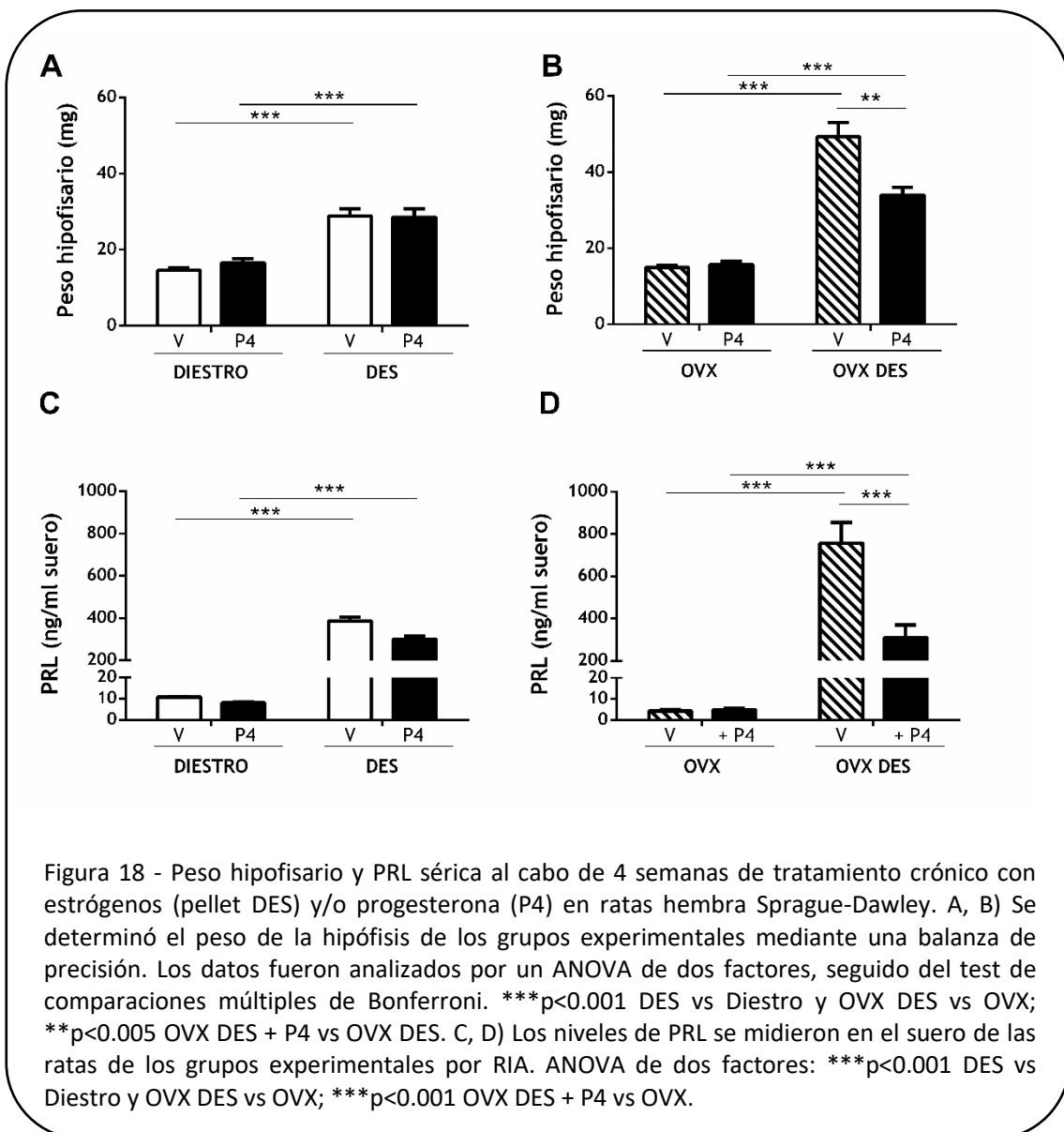


Figura 18 - Peso hipofisario y PRL sérica al cabo de 4 semanas de tratamiento crónico con estrógenos (pellet DES) y/o progesterona (P4) en ratas hembra Sprague-Dawley. A, B) Se determinó el peso de la hipófisis de los grupos experimentales mediante una balanza de precisión. Los datos fueron analizados por un ANOVA de dos factores, seguido del test de comparaciones múltiples de Bonferroni. *** $p < 0.001$ DES vs Diestro y OVX DES vs OVX; ** $p < 0.005$ OVX DES + P4 vs OVX DES. C, D) Los niveles de PRL se midieron en el suero de las ratas de los grupos experimentales por RIA. ANOVA de dos factores: *** $p < 0.001$ DES vs Diestro y OVX DES vs OVX; *** $p < 0.001$ OVX DES + P4 vs OVX.

Como puede observarse en la Figura 18:

- El tratamiento con P4 no tuvo ningún efecto *per sé* sobre el peso hipofisario y los niveles de PRL en hembras enteras ni en OVX (grupos Diestro + P4 y OVX + P4)
- El efecto del DES fue más potente en las hembras que habían sido previamente OVX (OVX DES) generado prolactinomas de mayor tamaño y una hiperprolactinemia más elevada respecto a las ratas intactas con tratamiento DES (comparación de grupos inyectados con vehículo: OVX DES vs DES).
- El co-tratamiento con P4 logró contrarrestar, al menos parcialmente, el efecto estrogénico (tamaño del prolactinoma e hiperprolactinemia) sólo en las hembras previamente OVX (OVX DES + P4), (no se observó efecto del co-tratamiento con P4 en aquellas hembras con implante DES no ovariectomizadas).

A partir de estos resultados experimentales se remarca la importancia que tiene la elección del modelo experimental (OVX o intacta) para la evaluación de los efectos de esteroides en hipófisis normales y tumorales.

Por otro lado, de estos resultados, más que conclusiones, surgen nuevos interrogantes... Entre ellos:

1. ¿Por qué un co-tratamiento con progesterona previene, al menos parcialmente, el desarrollo del tumor sólo en las hembras previamente OVX?
2. ¿Por qué las hembras previamente OVX tienen mayor sensibilidad al efecto estrogénico, respecto a las hembras enteras con igual tratamiento? (desarrollan tumores más grandes);

Para responder estos interrogantes, dividimos el estudio posterior en dos áreas:

1. Efectos de la progesterona y tipo de receptores involucrados en hipófisis normal vs. tumoral (Capítulo 3). Impacto de una ovariectomía en la expresión de los receptores (Capítulo 2).
2. Efectos estrogénicos y receptores no clásicos de estrógenos (GPER) que participan en hipófisis de ratas hembras en diestro intactas vs. OVX (Capítulo 4)

🌀 HIPOTESIS del capítulo 2

“La ovariectomía altera la expresión hipofisaria de receptores clásicos y no clásicos de progesterona determinando el perfil de respuesta a progesterona en ratas tratadas crónicamente con estrógenos”

🌀 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el impacto de la OVX en la expresión de los nPRs y mPRs en hipófisis y la regulación de mPRs por estradiol y progesterona.

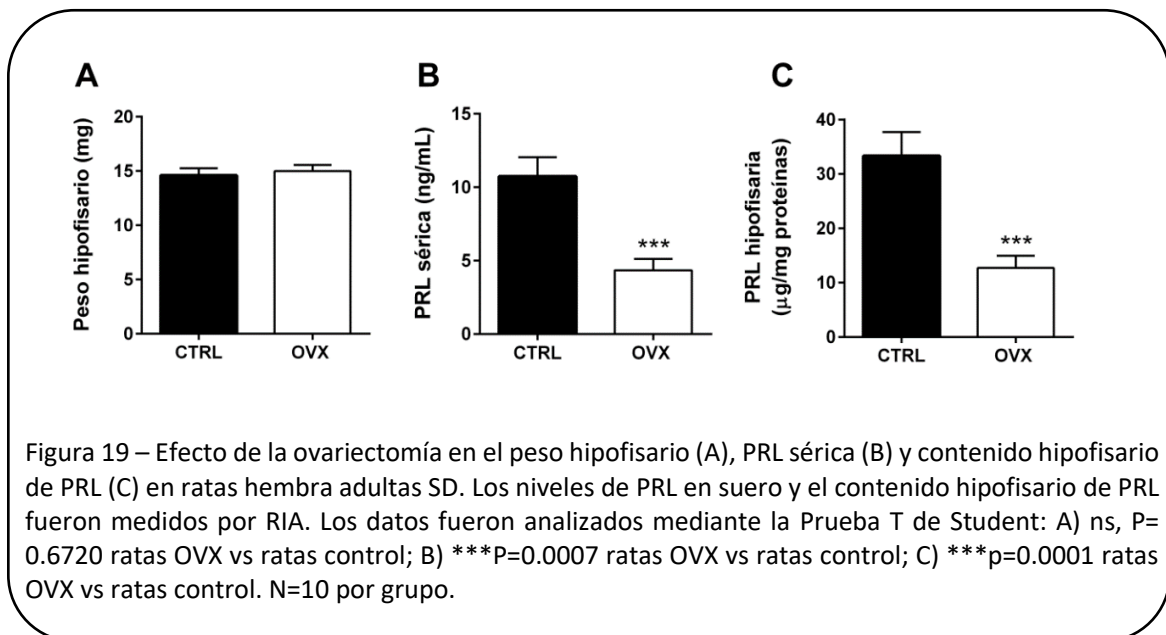
Objetivos específicos:

- 🌀 Evaluar por RT-qPCR las alteraciones en la expresión y en la abundancia relativa de mPRs hipofisarios inducidas por OVX
- 🌀 Analizar la abundancia relativa de cada uno de los diferentes receptores en hipófisis de ratas control, OVX y OVX con reemplazo estrogénico
- 🌀 Evaluar si existe una regulación ejercida por el estradiol y la progesterona *in vivo* sobre la expresión de nPRs y mPRs post OVX

RESULTADOS CAPÍTULO 2

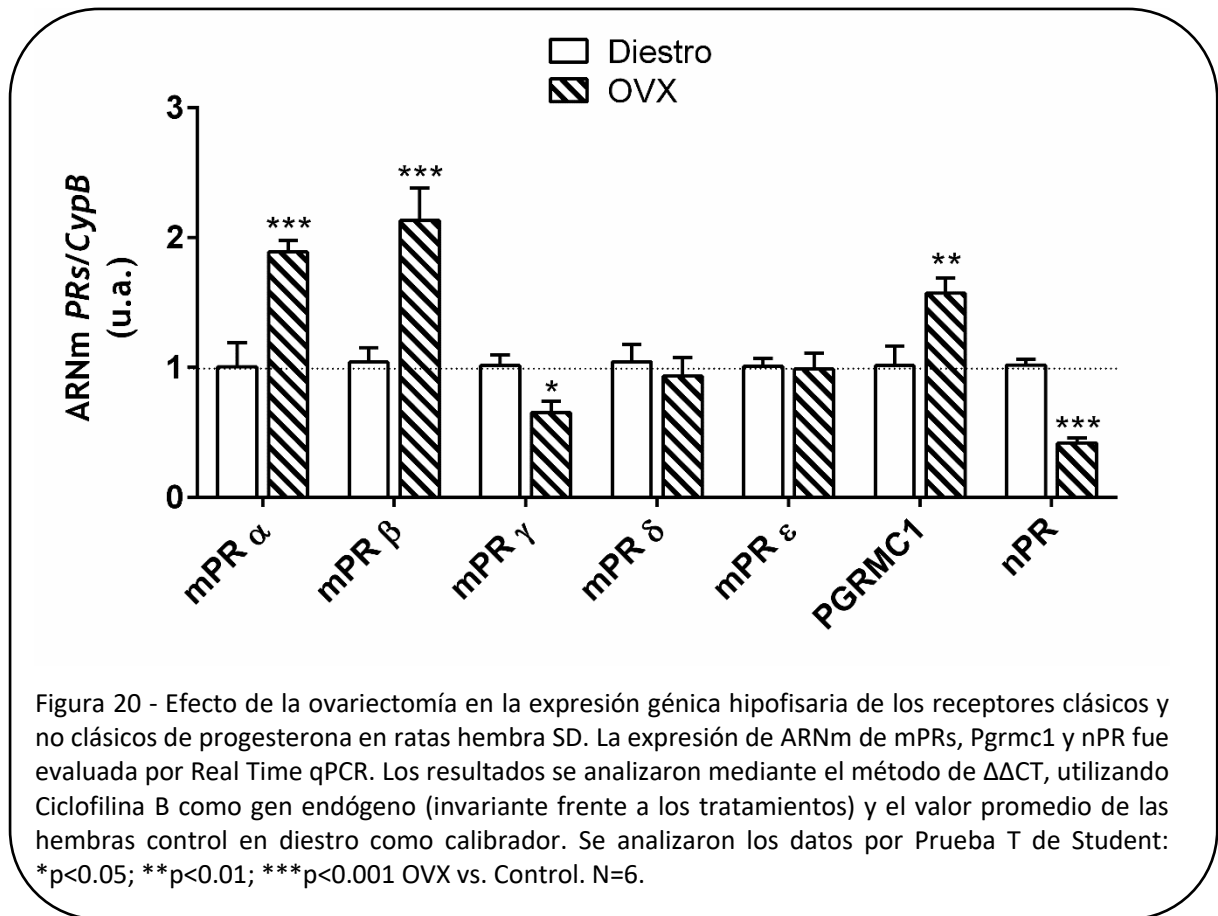
Impacto de la OVX en la expresión de los mPRs en hipófisis.

Es bien sabido que las hormonas ováricas regulan la proliferación de células hipofisarias, así como la secreción de PRL (Ben-Jonathan, LaPensee, & LaPensee, 2008; DeMaria et al., 2000; Freeman et al., 2000). En esta sección evaluamos las alteraciones en la expresión de los mPRs hipofisarios inducidas por la OVX en nuestro modelo experimental: hembras intactas en diestro, y hembras luego de 15 días de OVX. Observamos, tal cual fuera demostrado anteriormente (Nolan & Levy, 2009a), que la OVX no modificó el peso de la hipófisis (Fig. 19A), aunque los niveles de PRL en suero se redujeron significativamente (Fig. 19B).



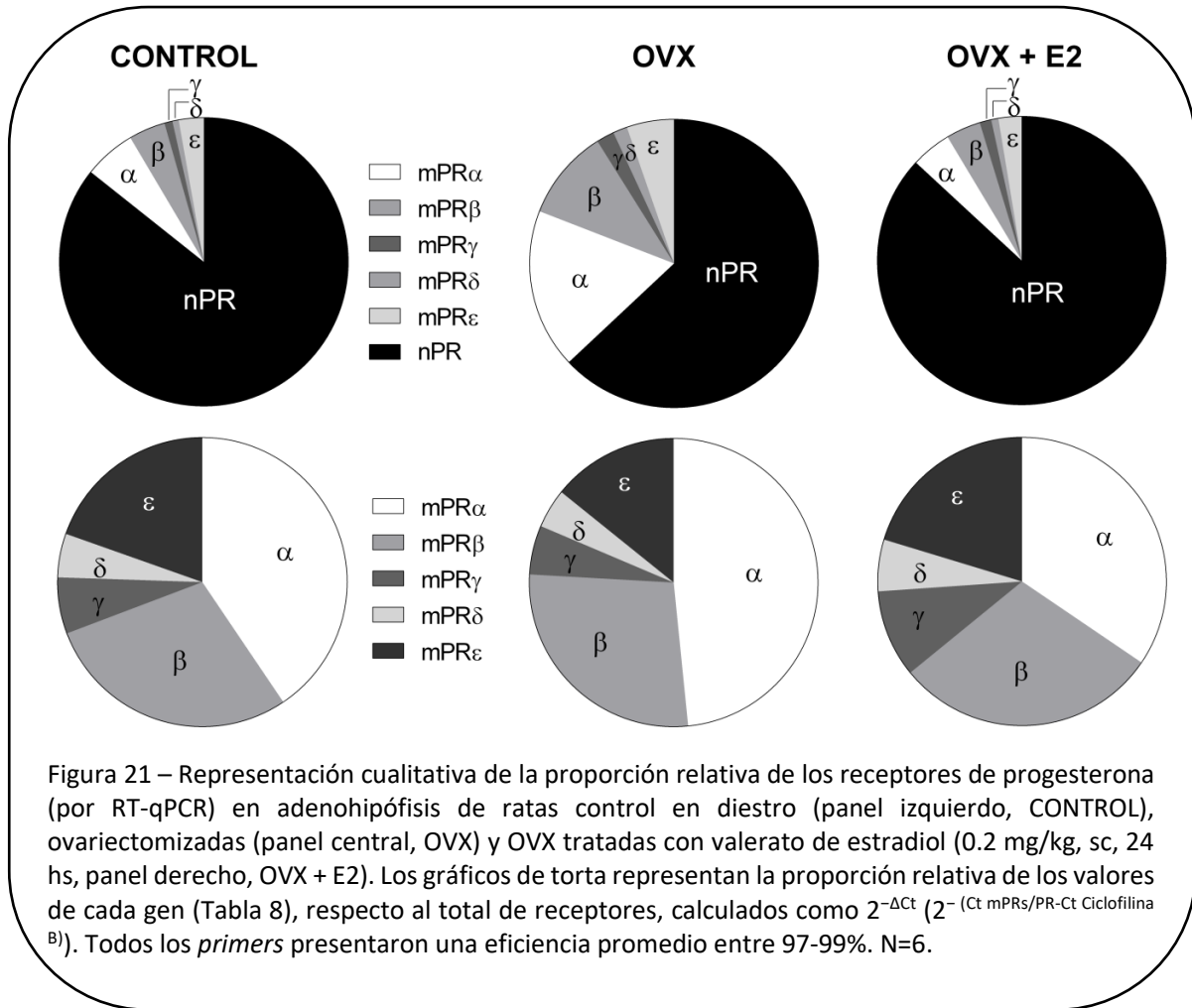
Llamativamente, cuando evaluamos por RT-qPCR las alteraciones en la expresión de mPRs hipofisarios inducidas por OVX, encontramos que luego de una OVX aumenta significativamente la expresión génica de *mPRα*, *mPRβ* y *PGRMC1* en hipófisis (Fig. 20). No se observó ningún efecto de la OVX sobre la expresión de *mPRδ* y *mPRε*. Por el contrario, los niveles de ARNm de *mPRγ* se encontraron reducidos en las hipófisis de hembras OVX respecto a hipófisis de hembras enteras. Cabe destacar aquí que la OVX

indujo también una disminución muy significativa en la expresión de los receptores clásicos de progesterona *nPRs*.



Esta alteración en la expresión hipofisaria de los receptores de P4 inducidas por la OVX, que resultó ser específica para cada receptor, provoca a su vez una importante alteración en las proporciones relativas de los mismos, hecho que seguramente impacta en la respuesta final hipofisaria a la acción de P4.

Para evaluarlo, analizamos por RT-qPCR la abundancia relativa de cada uno de los diferentes receptores en hipófisis de ratas hembra SD en Diestro (CONTROL), ovariectomizadas (15 días post OVX), y ovariectomizadas con reemplazo estrogénico (OVX + valerato de estradiol (E2, sc, 0.2 mg/kg, 24hs, tratamiento realizado 15 días post OVX) (Figura 21).



El valor de cada gen representado fue calculado como $2^{-\Delta Ct}$, siendo el ΔCt equivalente al Ct de cada receptor – Ct del gen de referencia (Ciclofilina B), detallado en la Tabla 8. Este análisis nos permite además comparar en forma cualitativa la proporción aproximada de cada receptor respecto al total de receptores de P4 (Metodología propuesta por (Pang et al., 2013).

Gen	Control	OVX	OVX + E2
	$2^{-\Delta Ct} \pm SEM$		
<i>mPRα</i>	0.155 ± 0.011	0.083 ± 0.019	0.038 ± 0.002
<i>mPRβ</i>	0.113 ± 0.008	0.047 ± 0.005	0.032 ± 0.003
<i>mPRγ</i>	0.025 ± 0.003	0.009 ± 0.002	0.011 ± 0.001
<i>mPRδ</i>	0.020 ± 0.001	0.008 ± 0.001	0.006 ± 0.001
<i>mPRϵ</i>	0.0725 ± 0.010	0.024 ± 0.004	0.022 ± 0.002
<i>nPR</i>	2.602 ± 0.379	0.292 ± 0.044	0.729 ± 0.043

Tabla 8 - Valores de cada gen calculados como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(Ct\ gen-Ct\ Ciclofilina\ B)}$)

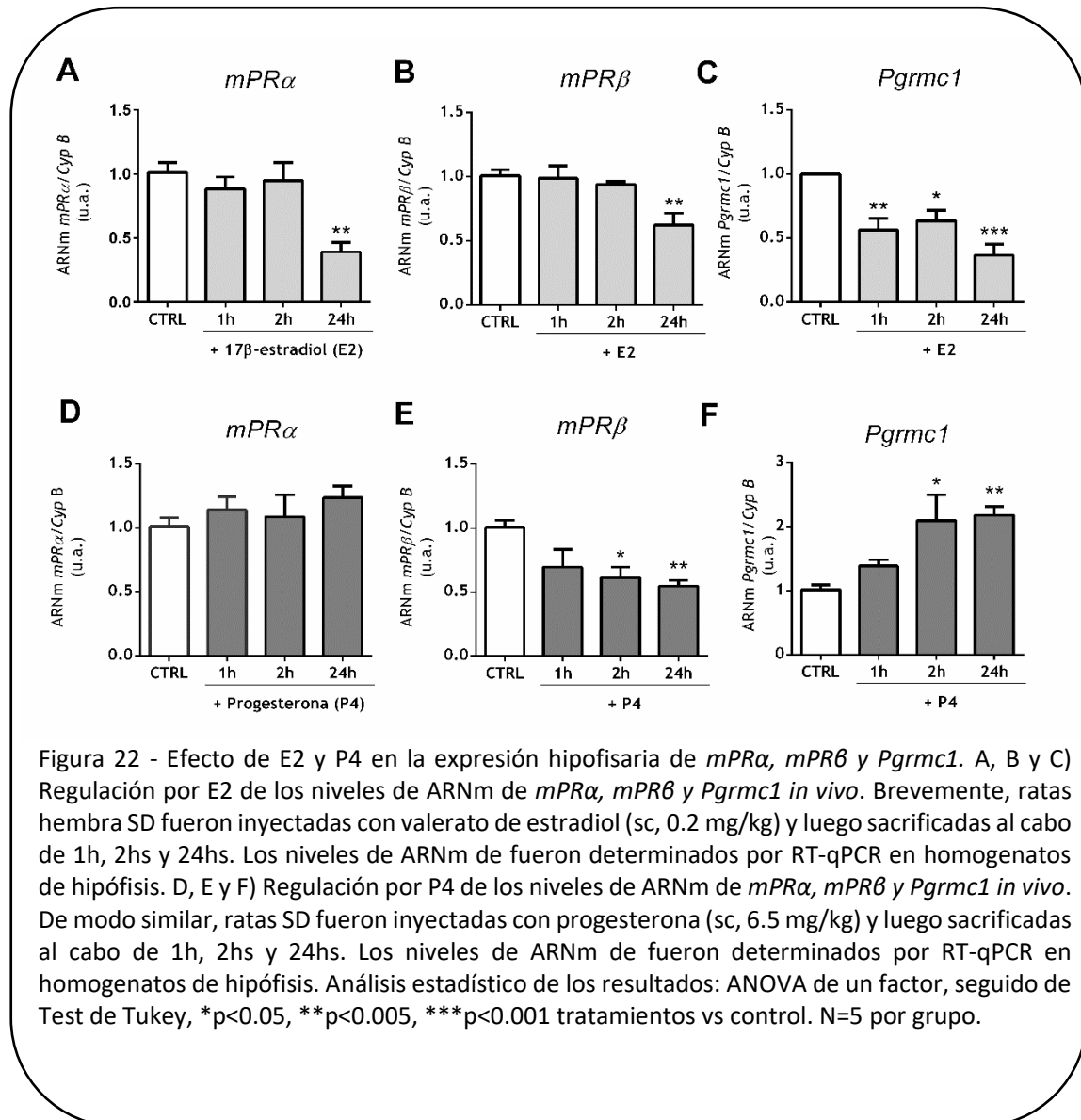
Como puede observarse en forma gráfica, luego de una OVX se incrementa significativamente la expresión relativa de los mPRs entre todos los receptores de P4. Es interesante destacar que en la hipófisis de una rata control, el % de mPRs corresponde aproximadamente a un 15% del total, y esta proporción aumenta a prácticamente el triple en la hipófisis de una hembra OVX (45%). Este aumento, estaría dado principalmente por un incremento de la proporción de *mPR α* y *mPR β* y por una disminución significativa en la proporción de *nPRs*. Estas alteraciones se revierten totalmente luego de un tratamiento de 24hs con E2 (OVX+E2).

Entre las alteraciones inducidas por la OVX sobre la expresión de receptores de progesterona, se destacan en particular el aumento observado en la expresión de *mPR α* , *mPR β* y *PGRMC1* y la marcada disminución de los *nPRs* (Figura 20). El hecho de que las proporciones relativas de estos receptores se recuperen luego de un tratamiento estrogénico de 24hs, sugiere un control negativo ejercido por los esteroides ováricos.

Con el objetivo de evaluar esta regulación más en detalle, se realizaron nuevos estudios *in vivo*: tratamientos agudos a diferentes tiempos (1h, 2hs y 24hs) con E2 o P4 en hembras adultas SD en diestro, considerando los siguientes grupos:

- E2 (0.2 mg/mg, valerato de estradiol, sc)
- P4 (6.5mg/kg progesterona, Sigma-Aldrich, sc)
- Controles: inyectados con aceite de ricino (vehículo, sc)

Al finalizar los tratamientos los animales fueron sacrificados, se extrajeron las hipófisis anteriores y se analizó la expresión génica de *mPR α* , *mPR β* y *PGRMC1* en los diferentes grupos (Figura 22).

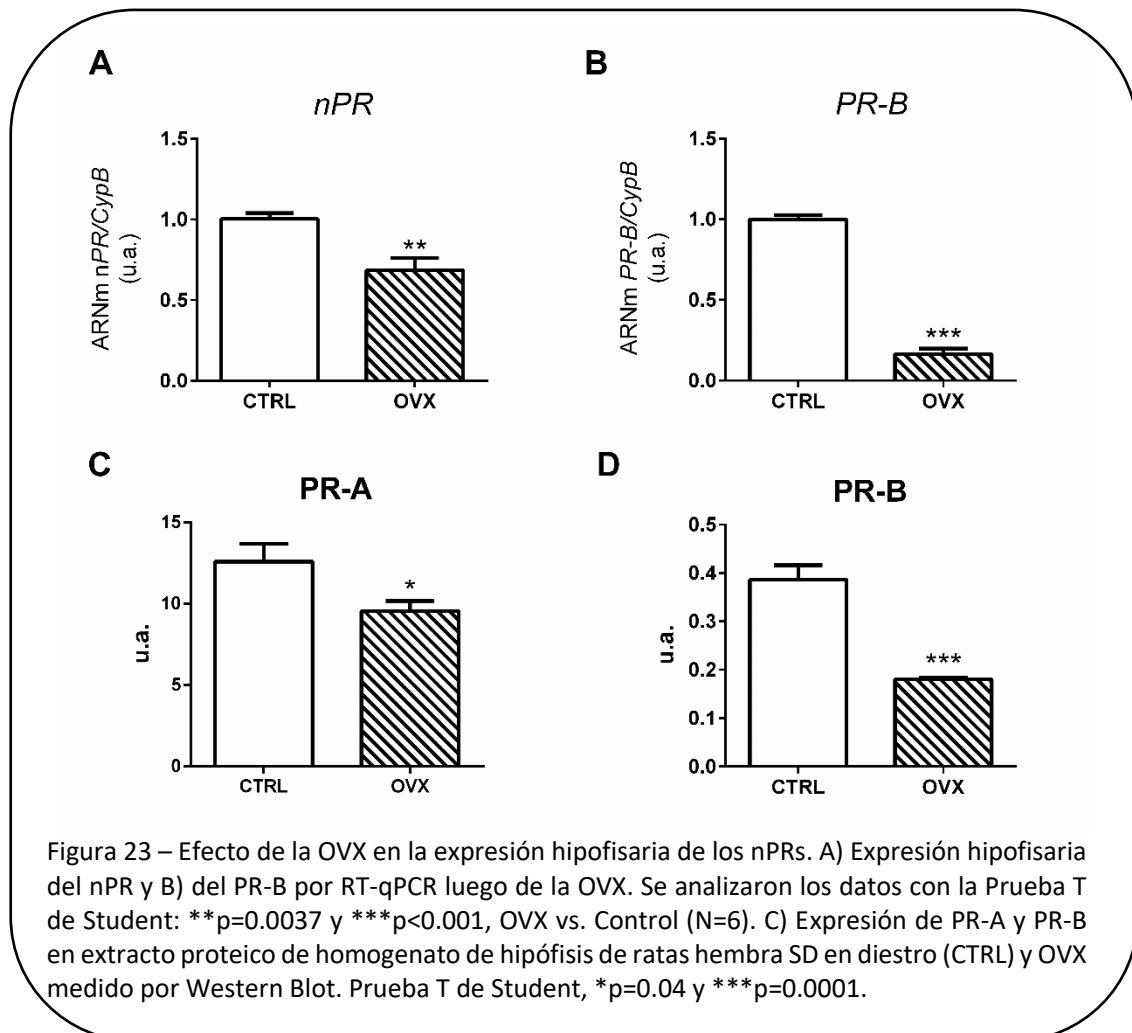


Con estos ensayos podemos deducir que la expresión hipofisaria de *mPR α* , *mPR β* y *Pgrmc1* se encuentra bajo una regulación estrogénica negativa (Fig. 22A, B y C). Esto explicaría, al menos en parte, el incremento en la expresión de los mismos observado luego de una OVX. El efecto del tratamiento con P4, en cambio, fue específico para cada receptor: no modificó la expresión de *mPR α* (Fig. 22D), disminuyó significativamente la expresión de *mPR β* (Fig. 22E), y aumentó significativamente expresión génica de *Pgrmc1* (Fig. 22F).

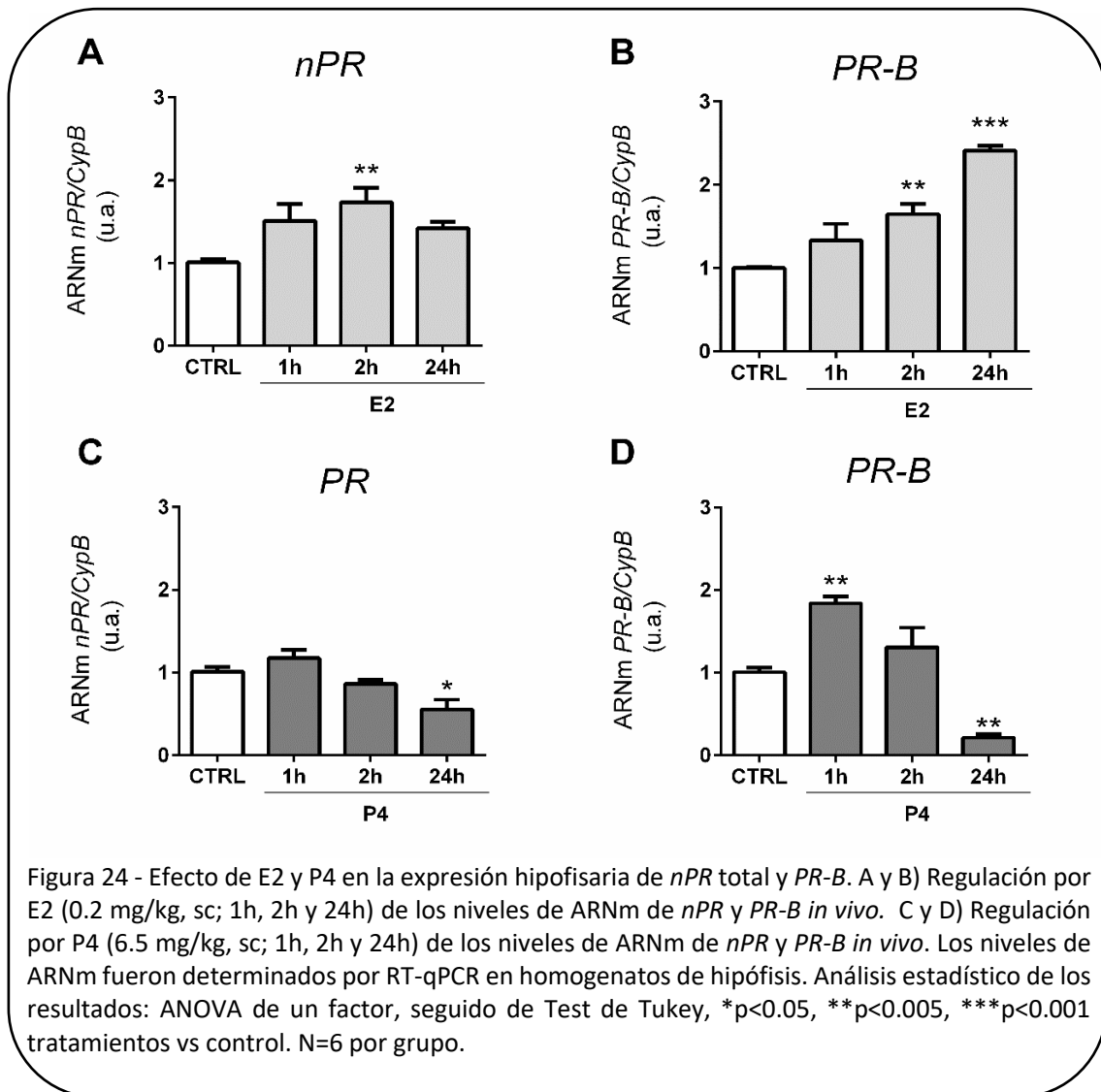
Por otro lado, estudiamos en profundidad la disminución de los *nPRs* luego de una OVX. Es sabido que la respuesta a P4 depende íntimamente de la correcta relación

entre las dos isoformas del nPR: PR-A y PR-B; y esta proporción cambia en el proceso tumorigénico (Lamb, Fabris, Jacobsen, Molinolo, & Lanari, 2018; Rojas et al., 2017; Wargon et al., 2015).

Evaluamos el impacto de la OVX en ambas isoformas analizando comparativamente los niveles de ARNm del nPR total (PR-A + PR-B) y utilizando un segundo set de *primers* para detectar específicamente al PR-B. Como se observa en la Figura 23, los niveles de *nPR* fueron significativamente menores en ratas OVX (Fig. 23A) y esto parecería estar dado por una marcada disminución de la isoforma B (Fig. 23B). Para corroborar nuestros resultados, medimos la expresión proteica de ambas isoformas por Western Blot (Fig. 23C y D).



A continuación, como vimos una alteración en los *nPRs* frente a la falta de esteroides ováricos, ensayamos la regulación *in vivo* de E2 y P4 de los *nPRs* y específicamente de la isoforma B. Observamos que el E2 modula positivamente los niveles hipofisarios de ARNm del *nPR* total (Fig. 24A) y P4 lo hace negativamente (Fig. 24C) tal como fue descrito en (Turgeon & Waring, 2000). Curiosamente, estas regulaciones parecerían ser ejercidas específicamente sobre el *PR-B* hipofisario. Como se muestra en la Figura 24B, los niveles de ARNm del *PR-B* aumentaron significativamente con el tratamiento con E2, siendo este efecto máximo a las 24h de tratamiento. Por el contrario, el efecto de un tratamiento agudo con P4 fue bifásico, con un aumento significativo luego de 1 h y una marcada disminución luego de las 24 h de tratamiento (Fig. 24D).



CONCLUSIONES CAPITULO 2

- En ratas hembra, una ovariectomía induce importantes alteraciones en la sensibilidad de respuesta a los esteroides ováricos.
- Un tratamiento crónico con estrógenos desarrolla un prolactinoma de mayor tamaño y una hiperprolactinemia más severa cuando la hembra es previamente OVX (en comparación con el tumor desarrollado en una hembra intacta).
- Un co-tratamiento con P4 contrarresta parcialmente el efecto estrogénico, sólo en hembras previamente OVX.
- La OVX induce un aumento significativo en la expresión hipofisaria de *mPR α* y *mPR β* . Esto es debido, al menos en parte, a la regulación negativa ejercida por el estradiol sobre la expresión de ambas isoformas.
- Esta alta proporción de *mPR α* y *mPR β* en hipófisis de hembras OVX, sumado a los resultados del capítulo 1 del presente trabajo (donde demostramos que P4 inhibe PRL vía mPRs), podrían explicar por qué la progesterona logra contrarrestar el efecto del tratamiento crónico estrogénico sólo en hembras OVX (Grupo DES OVX + P4).

DISCUSIÓN CAPITULO 2

La acción protectora de P4 en el desarrollo tumoral ha sido demostrada en ratas hembra tratadas crónicamente con estrógenos (Heinzlmann & Koves, 2008; Heinzlmann, Koves, Kovacs, & Csernus, 2011; Heinzlmann et al., 2010; Gerardo G. Piroli et al., 1996) previamente ovariectomizadas. Acorde a estos estudios, en este capítulo observamos que un tratamiento con P4 previene parcialmente los efectos de DES sólo en hembras previamente OVX. Estos resultados podrían ser explicados a la luz de la incrementada expresión de los receptores no clásicos de progesterona de membrana.

En ratas OVX, la expresión hipofisaria de *mPR α* se triplica y la de *mPR β* duplica. En consecuencia, la proporción relativa de los mPRs respecto de los receptores totales de P4 aumenta considerablemente en la hipófisis de ratas OVX. Es decir que, si tenemos presentes los resultados del Capítulo 1, podemos inferir que la hipófisis de una hembra OVX será más sensible a los efectos inhibitorios de P4 ejercidos a través de los mPRs.

Además, encontramos que los niveles de ARNm de *Pgrmc1* incrementaban tres veces luego de la OVX. Este aumento de *mPR α* , *β* y *Pgrmc1* probablemente es debida, al menos en parte, a la falta de estrógenos ováricos, dado que encontramos una regulación negativa del estradiol sobre la expresión de los mismos.

Si bien en el presente trabajo no evaluamos los efectos sobre proliferación, la participación de P4 en efectos anti-proliferativos y/o apoptóticos vía mPRs se encuentra detallada en la literatura: (i) Investigaciones en una línea celular de cáncer de ovario prueban que tanto progesterona como el agonista de los mPRs aumentan la expresión de genes pro-apoptóticos como BAX mediante la activación de la vía de JNK 1/2 y p38, y los autores proponen que la activación farmacológica de *mPR α* , *- β* y *- γ* , altamente expresados en ovario, podría proveer un potencial abordaje terapéutico para pacientes con un estadio de enfermedad avanzada (Charles, Thomas, & Lange, 2010); (ii) De acuerdo con estos estudios, la activación de mPRs en dos líneas celulares de mama carentes de nPR (MCF10A y MCF12A) disminuye la proliferación celular en un efecto mediado por la vía de MAPK y AKT/JNK (Salazar, Lerma-Ortiz, Hooks, Ashley, & Ashley, 2016).

Ciertas acciones anti-apoptóticas mediadas por *mPR α* y *mPR β* , han sido reportadas en cáncer de mama. Tales efectos de P4 dependerían de la transactivación del PR-B (Dressing et al., 2012). Esto resulta particularmente interesante si consideramos que los tumores de mama resistentes o que adquieren resistencia a terapias endocrinas con anti-progestágenos muestran mayores niveles de PR-B (McGowan et al., 2007; Rojas et al., 2017; Wargon et al., 2015) y los efectos proliferativos de P4 en la glándula mamaria estarían mediados principalmente por este receptor.

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados y nuestros resultados, postulamos P4 logra contrarrestar parcialmente el efecto de un tratamiento crónico estrogénico sólo en hembras OVX. Esto es debido, al menos en parte, a: (i) la alta proporción de *mPR α* , *mPR β* y *Pgrmc1*, (ii) la marcada disminución del *PR-B* observada en hipófisis de hembras OVX, y (iii) tal como demostramos en el Capítulo 1, la acción inhibitoria que ejerce la P4 vía mPRs (significativamente incrementados en OVX).

Estos resultados en conjunto clarifican los antecedentes contradictorios en bibliografía acerca del efecto de un co-tratamiento con progesterona sobre el desarrollo de un prolactinoma inducido por estrógenos; y, por otro lado, enfatizan cuánto impacta el modelo animal utilizado, ya que por ejemplo una OVX sensibiliza a la hipófisis al efecto proliferativo de los estrógenos y a su vez altera completamente la proporción de PRs hipofisarios y por lo tanto la respuesta final a progesterona.

CAPÍTULO 3
**mPRs en modelos
experimentales de
prolactinoma**

INTRODUCCION CAPITULO 3

El uso de la progesterona y sus análogos en tratamiento médicos ha aumentado notablemente durante la última década. La administración exógena de esta hormona tiene múltiples aplicaciones: en mujeres se utiliza para mantener el embarazo en ciclos de reproducción asistida, para controlar el sangrado anovulatorio persistente, en la prevención de nacimiento prematuros y en terapias de reemplazo hormonal en la menopausia (Haas, Hathaway, & Ramsey, 2018; Mirkin, Amadio, Bernick, Pickar, & Archer, 2015). Por otro lado, está siendo investigada como potencialmente beneficiosa en el tratamiento de la esclerosis múltiple (Xin et al., 2015) y siendo utilizada para tratamientos en cáncer (J. J. Kim, Kurita, & Bulun, 2013) y trastornos neurológicos en ambos sexos (De Nicola et al., 2013; Hoffman, Merchenthaler, & Zup, 2006).

Particularmente en esta tesis, nos propusimos estudiar la participación de la progesterona en la tumorigénesis hipofisaria, y los receptores involucrados.

Habiendo descrito previamente que

- Los mPRs se expresan en la población lactotropa normal y en la línea celular tumoral GH3
- Los mPRs participan de los efectos inhibitorios de la P4 sobre los lactotrofos.

En esta sección, y basados en los resultados anteriores, evaluamos las alteraciones en la expresión de mPRs durante la tumorigénesis hipofisaria en tres modelos experimentales de prolactinomas:

Modelos animales de prolactinomas

1. MODELO DE PROLACTINOMA EN RATAS (RATAS DES)

Previamente detallado en el Capítulo 2 del presente trabajo.

2. RATONES KNOCKOUT PARA EL RECEPTOR DOPAMINÉRGICO D2 (DRD2KO)

Los ratones knockout para el receptor dopaminérgico D2 (RD2), (designación oficial de la cepa: B6.129S2-Drd2^{tm1low} a cargo del *Induced Mutant Resource* en el Laboratorio Jackson (Bar Harbor, ME)), fueron generados por los Dres. Malcolm Low y Marcelo Rubinstein en Portland, Oregon, USA, por mutagénesis dirigida del gen RD2 en células embrionarias (Asa, Kelly, Grandy, & Low, 1999). Específicamente se realizó una delección completa del exón 7 y la mitad 5' del exón 8 del gen del receptor dopaminérgico D2 murino mediante recombinación homóloga. Dichos exones codifican para los últimos dos dominios transmembrana del receptor D2, el tercer loop extracelular y el extremo carboxi-terminal intracitoplasmático, por lo cual estos ratones genéticamente modificados (desde ahora: KO) carecen de RD2 funcionales. La cepa híbrida original (129S2/Sv X C57BL/6J) con el alelo mutado para el RD2 fue retrocruzada por ocho generaciones consecutivas con ratones silvestres C57BL/6J. En nuestro laboratorio se demostró anteriormente que los ratones KO de ambos sexos poseen mayores niveles de PRL sérica que sus pares salvajes (desde ahora: WT) ya en la sexta semana de vida y que, en las hembras, la prolactinemia siempre es mayor que en los machos (Diaz-Torga et al., 2002). A los 8 meses las hembras KO desarrollan hiperplasia hipofisaria de lactotrofos con un aumento del peso de la hipófisis de 2-3 veces respecto a las hembras WT. Histológicamente se pueden observar zonas con peliosis o glóbulos rojos extravasados en cavidades no circunscriptas por células endoteliales. A esta edad no se ven signos de transformación neoplásica, manteniéndose intacta la arquitectura determinada por la red de fibras de reticulina. Por otro lado, los machos de 9 a 12 meses no presentan mayores alteraciones adenohipofisarias.

En los siguientes experimentos, los animales de este modelos fueron utilizados a la edad de 8 meses.

3. RATONES hCG β +:

Los ratones hCG β +, desarrollados por el Dr. Huhtaniemi y la Dra. Rulli, son ratones de la cepa FVB/n genéticamente modificados que expresan en forma hemicigota el gen de la subunidad β de la gonadotropina coriónica humana (hCG β) bajo el promotor de la ubiquitina C (Rulli et al., 2002). La alta bioactividad de LH/hCG produce una elevada estimulación ovárica, y masiva luteinización, con una

consecuente elevada secreción de progesterona (hembras hCG β + 200 nM vs. hembras WT 10 mM). Las hembras hCG β + presentan pubertad precoz e infertilidad con estructura uterina anormal. Estas hembras exhiben un aumento transitorio de estradiol durante la peripubertad, mientras que en la adultez los niveles alcanzan valores normales. A pesar de niveles estrogénicos fisiológicos, las hembras hCG β + desarrollan prolactinomas de gran tamaño a edad avanzada (Ahtiainen et al., 2010). Los machos adultos de este modelo son fértiles y manifiestan espermatogénesis normal pese a los niveles reducidos de FSH y a la disminución en el tamaño testicular. Recientemente nuestro grupo ha descrito el rol del sistema TGF β 1 y las diferencias sexuales existentes en este modelo en el desarrollo de adenomas hipofisarios de lactotopos (Faraoni et al., 2017; M.V. Recouvreux et al., 2018). En los siguientes experimentos, los animales de este modelo fueron utilizados a la edad de 6 meses.

❧ HIPOTESIS

“La activación de mPRs representa una potencial herramienta alternativa para el tratamiento (inhibición) de la hiperprolactinemia patológica”

❧ OBJETIVOS

1. Caracterizar la expresión hipofisaria de mPRs en tres modelos experimentales de prolactinomas:
 - Ratones hembra *Drd2*KO (ratones que carecen del receptor de dopamina funcional tipo 2) (M. A. Kelly et al., 1997),
 - Ratones *hCGβ*+ (ratones que sobreexpresan *hCGβ*) (Rulli et al., 2002), y
 - Ratas DES, tratamiento crónico con estrógenos sintéticos (Gerardo G. Piroli et al., 1996)

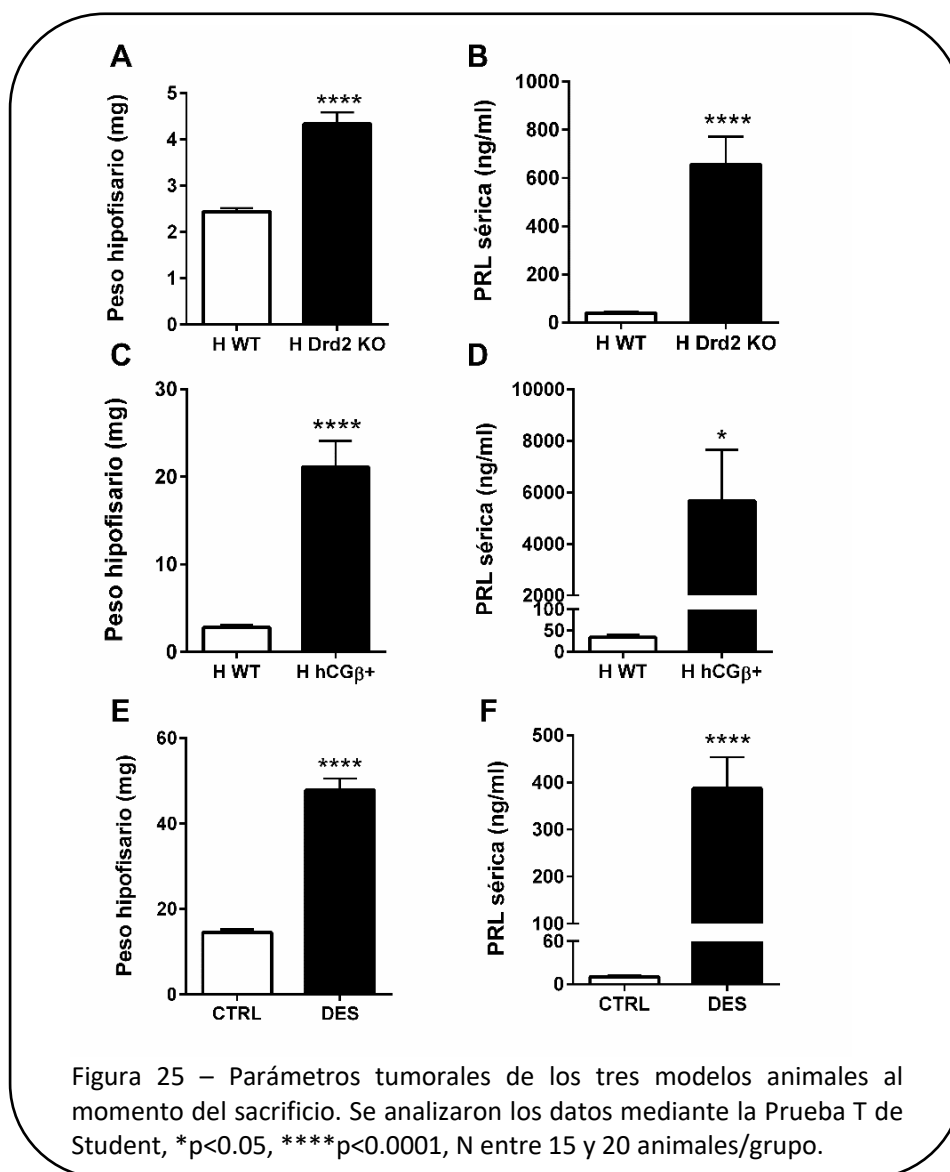
En los 3 casos, comparativamente con sus contrapartes de tipo salvaje (WT) / o rata control en diestro.

2. Estudiar el efecto de un agonista de mPRs Org OD 02-0 (Kelder et al., 2010; Pang et al., 2013) sobre la hiperprolactinemia presente en los modelos tumorales.

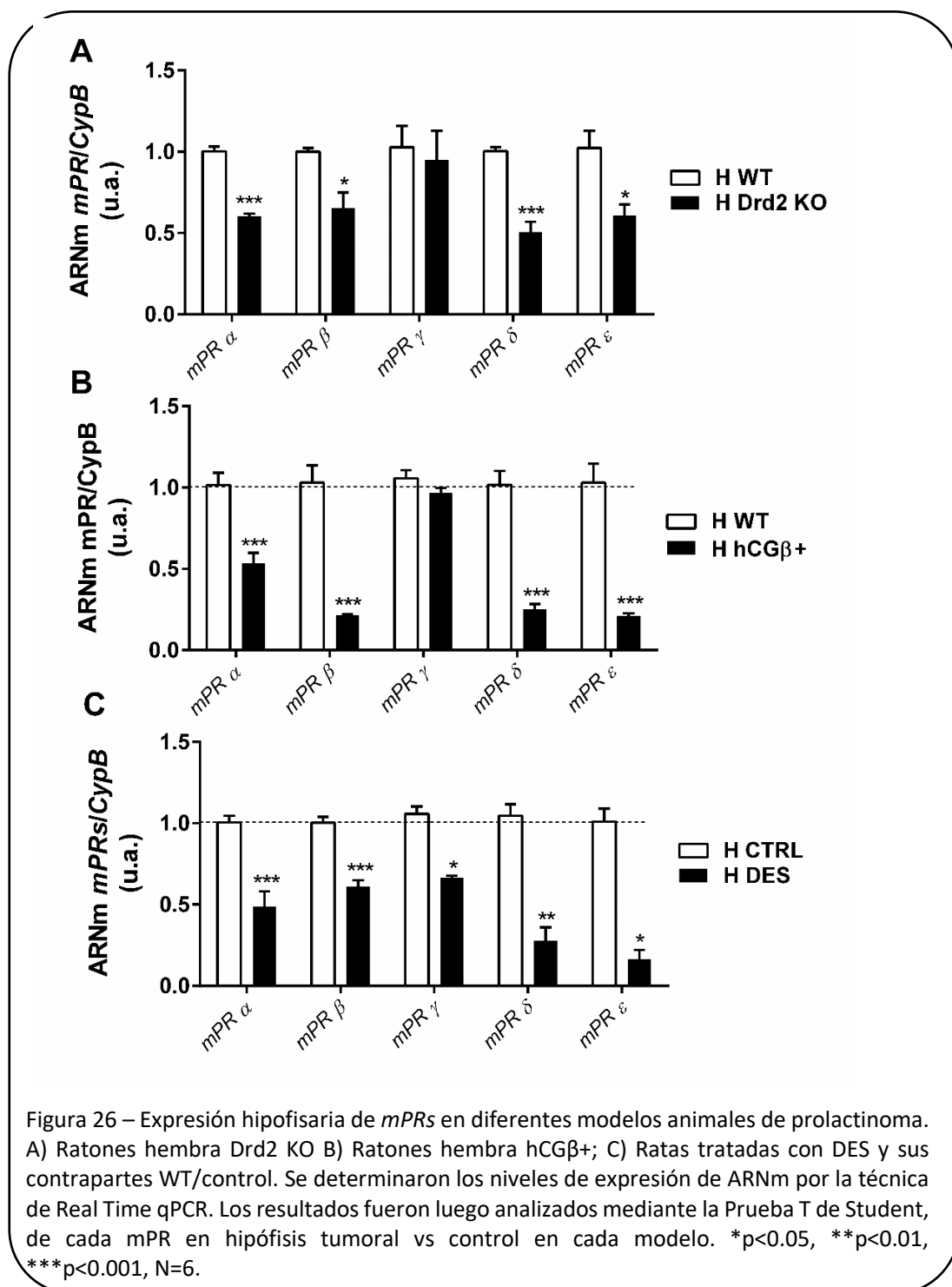
RESULTADOS CAPITULO 3:

Expresión de mPRs en tres modelos de prolactinoma

Comenzamos estudiando la expresión hipofisaria (por RT-qPCR) de *mPR* α , β , γ , δ y ϵ en hembras *Drd2*KO y *hCG* β + y ratas DES, en comparación con sus contrapartes WT/control en diestro. Como se muestra en la Figura 25, las hembras de los tres modelos animales de prolactinoma comparten las características asociadas al desarrollo tumoral, tales como el aumento del peso hipofisario y una marcada hiperprolactinemia.



En la Figura 26 puede observarse que a excepción de *mPR γ* , las expresiones de los otros mPRs (*mPR α* , *- β* , *- δ* y *- ϵ*) son significativamente menores en las hipófisis tumorales de *Drd2*KO y *hCG β +* en comparación con sus contrapartes de WT. En el modelo de ratas DES, en cambio, la expresión de todas las isoformas de *mPRs* se encontró disminuida en las hipófisis tumorales en comparación con las hipófisis control (hembras en diestro), (figura 26C).



La Tabla 9 muestra los valores promedio obtenidos para cada gen, incluidos los nPRs, expresados como $2^{-\Delta Ct}$: $2^{-(\text{gen Ct}-\text{Ct Ciclofilina B})}$. Puede observarse en la tabla que, mientras que el mPR α disminuye su expresión a aproximadamente la mitad en las hipófisis tumorales, los nPR disminuyen drásticamente hasta 8 veces su expresión.

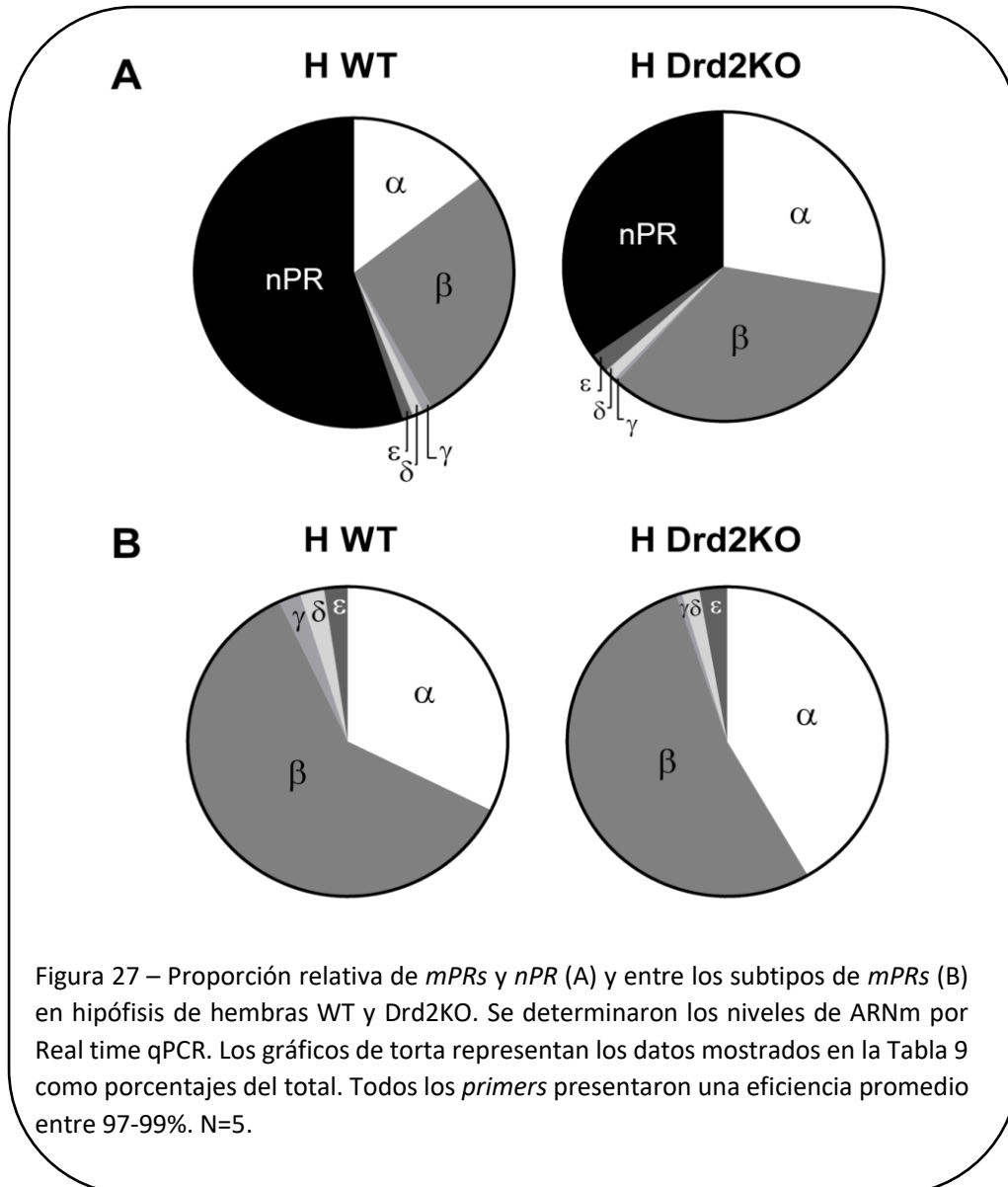
Utilizando estos datos, realizamos un análisis cualitativo de la proporción relativa de cada gen respecto al total de receptores, comparativamente entre ambos genotipos, y lo graficamos en forma de gráficos de torta (Figura 27).

	H WT	H Drd2KO
Gen	$2^{-\Delta Ct} \pm \text{SEM}$	
<i>mPRα</i>	0.192 \pm 0.052	0.080 \pm 0.011
<i>mPRβ</i>	0.413 \pm 0.155	0.103 \pm 0.021
<i>mPRγ</i>	0.023 \pm 0.014	0.001 \pm 0.000
<i>mPRδ</i>	0.020 \pm 0.009	0.003 \pm 0.001
<i>mPRϵ</i>	0.018 \pm 0.008	0.005 \pm 0.001
<i>nPR</i>	0.875 \pm 0.274	0.113 \pm 0.024

Tabla 9 - Valores de cada gen calculados como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(\text{Ct mPRs/PR}-\text{Ct Ciclofilina B})}$).

Puede observarse en la Figura 27A que los *mPR* representan casi 45% de los receptores totales de progesterona en las hipófisis de hembras WT, y semejante a lo que habíamos encontrado en hipófisis de rata hembra adulta, donde nuevamente, encontramos que *mPR α* y *mPR β* son los más abundantes, en ambos genotipos.

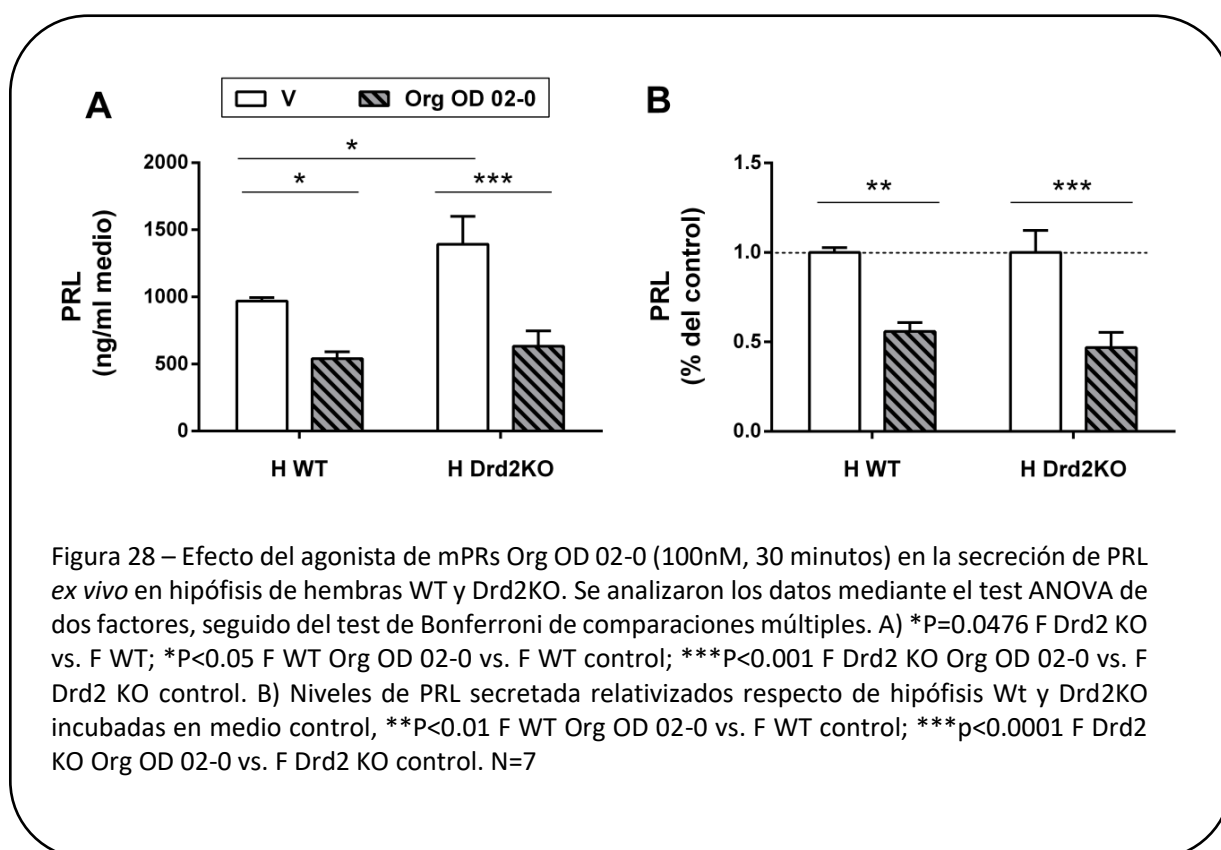
Cabe destacar aquí que, a pesar de que esta expresión de *mPR α* y *mPR β* se encontró disminuida en la hipófisis tumorales, la proporción relativa de *mPRs* incrementa significativamente en los prolactinomas (hembras Drd2KO) a expensas de la marcada disminución de la expresión de *nPRs* en las hipófisis tumorales (Figura 27)



Es decir, en los prolactinomas de este modelo experimental hay una alta proporción de *mPRα* y *mPRβ* (representando más del 60% del total de receptores de progesterona). Habiendo previamente comprobado que la activación específica de estos receptores induce una inhibición de la secreción de PRL, el siguiente paso fue evaluar el efecto del agonista selectivo de *mPRα/β* (Org OD 02-0) (Kelder et al., 2010; Pang et al., 2013) sobre la secreción de PRL en las hipófisis normales y tumorales de este modelo.

Nuevamente para evaluar el efecto directo de este compuesto sobre hipófisis, evadiendo el efecto indirecto a nivel hipotalámico, trabajamos con el modelo de explantes hipofisarios.

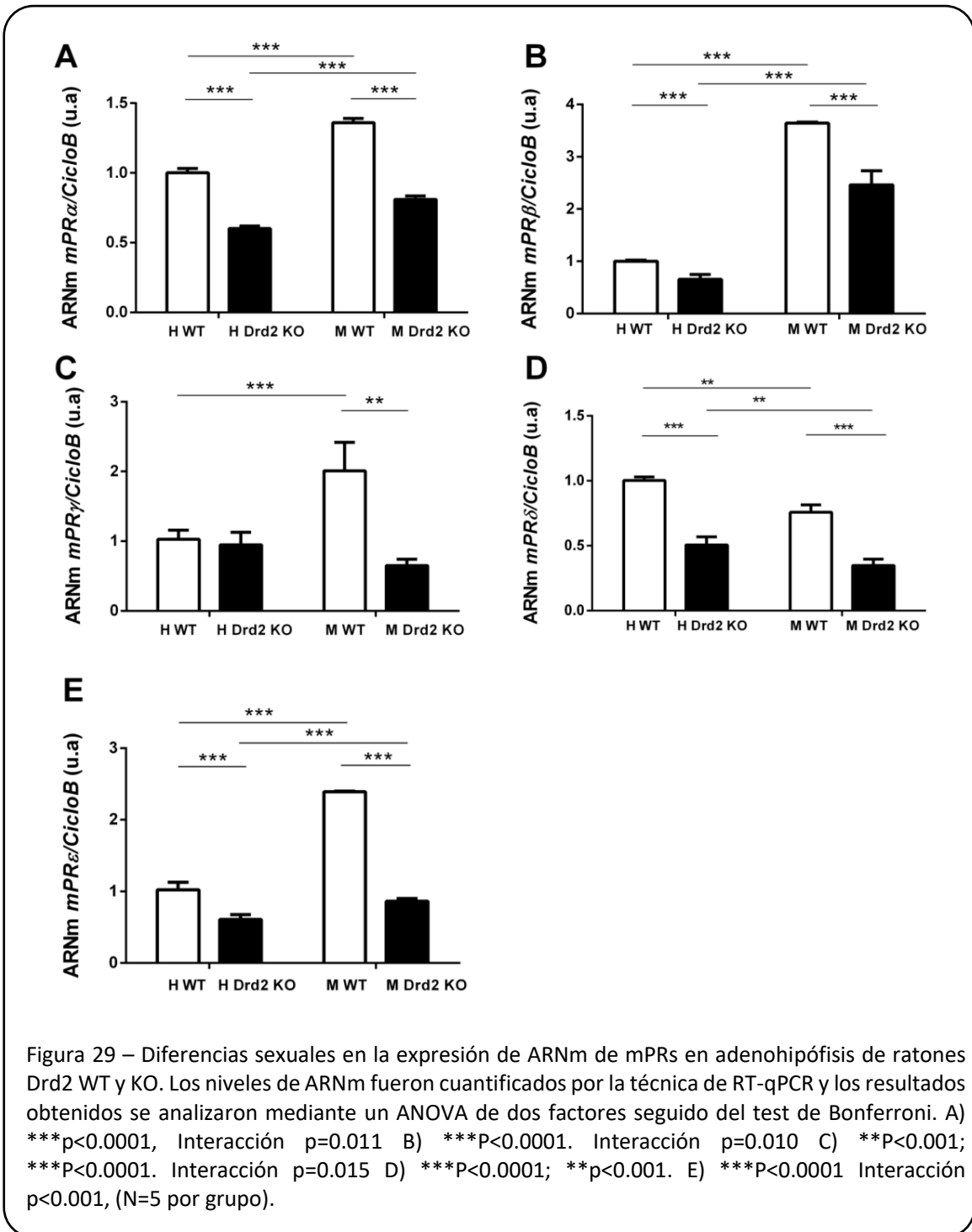
Hipófisis de ratones hembra WT y KO (8 meses de edad) se incubaron *ex vivo* en medio de cultivo con Org OD 02-0 o vehículo durante 30 minutos. Al final del período de tratamiento, los niveles de PRL se midieron en los medios secretados, por RIA. Como era de esperar, los niveles de PRL secretada por las hipófisis tumorales (Drd2KO) fueron mayores que aquella liberada por el tejido control (WT) (Fig. 28A). El tratamiento con Org OD 02-0 (100 nM) inhibió significativamente la liberación de PRL tanto en hipófisis normales como en las tumorales (Fig.28B).



Diferencias sexuales en la expresión de mPRs en hipófisis

En el modelo de ratones Drd2KO, las hembras, pero no los machos, desarrollan prolactinomas a pesar de la falta de inhibición dopaminérgica en ambos sexos (Asa et al., 1999; M.V. Recouvreux et al., 2013). Siguiendo con nuestro estudio de la participación de los mPRs en el desarrollo de prolactinoma, a continuación, exploramos las diferencias sexuales y de genotipo en la expresión de estos receptores en las hipófisis de nuestro modelo experimental. En la Figura 29 puede observarse que las hipófisis de machos presentan mayor expresión génica (RT-qPCR) de *mPRα* (29A), *β* (29B), *γ* (29C) y

ϵ (29E) respecto a hembras. Por el contrario, se encontró que la expresión hipofisaria de $mPR\delta$ es menor en los machos. (Fig. 29D). Con respecto a las diferencias entre genotipos, y de forma similar a lo que se observó en las hembras (Fig. 29A), la expresión de $mPRs$ también se encontró reducida en las hipófisis de machos KO en comparación con WT (Fig. 29A a E).

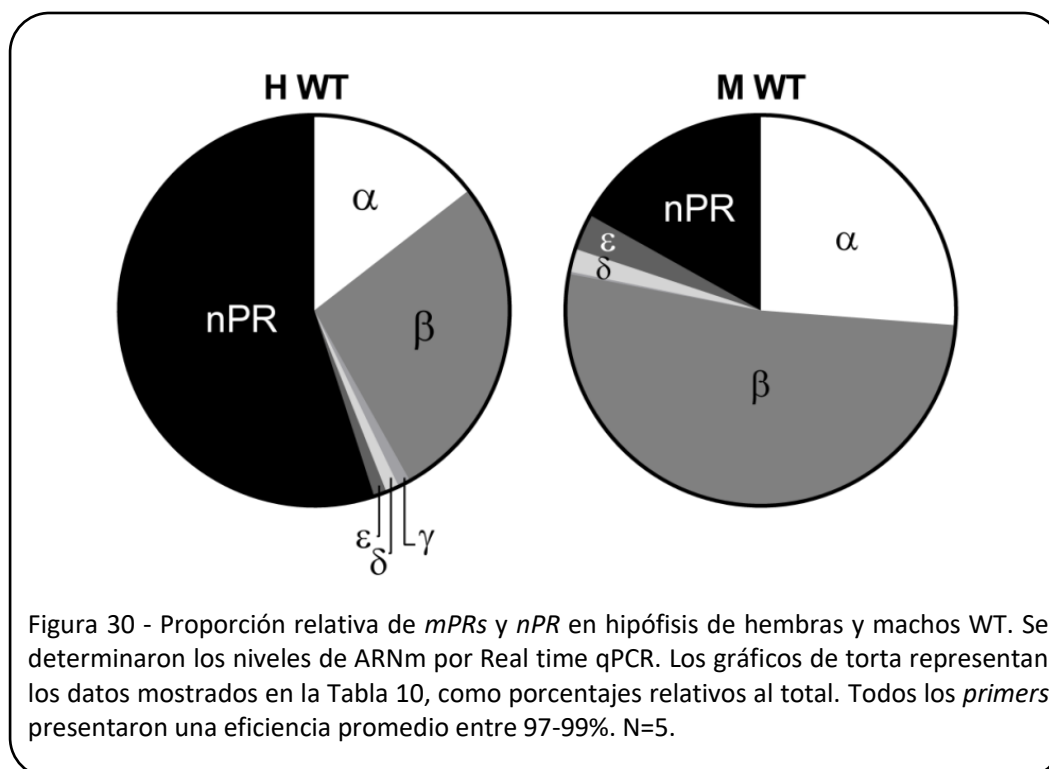


En base a los resultados de $2^{-\Delta Ct}$ obtenidos para cada gen, y que se muestran en la Tabla 10 se presenta un análisis cualitativo y comparativo de las proporciones relativas de los receptores de progesterona como gráficos de torta (Fig. 30). Puede observarse claramente la alta proporción de mPRs en hipófisis de machos respecto a los receptores clásicos (*nPRs*), y a lo observado en las hembras.

Las hipófisis de machos WT presentan una proporción relativa muy alta del *mPRβ*, seguido por el *mPRα*, a expensas de la menor expresión de *nPR*, en comparación con las hembras WT.

	H WT	H Drd2KO	M WT	M Drd2KO
Gen	$2^{-\Delta Ct} \pm SEM$			
<i>mPRα</i>	0.192 ± 0.052	0.080 ± 0.011	0.207 ± 0.008	0.113 ± 0.015
<i>mPRβ</i>	0.413 ± 0.155	0.103 ± 0.021	0.407 ± 0.013	0.197 ± 0.033
<i>mPRγ</i>	0.023 ± 0.014	0.001 ± 0.000	0.002 ± 0.000	0.001 ± 0.000
<i>mPRδ</i>	0.020 ± 0.009	0.003 ± 0.001	0.015 ± 0.001	0.007 ± 0.001
<i>mPRε</i>	0.018 ± 0.008	0.005 ± 0.001	0.024 ± 0.001	0.038 ± 0.007
<i>nPR</i>	0.875 ± 0.274	0.113 ± 0.024	0.207 ± 0.018	0.146 ± 0.016

Tabla 10 - Valores de cada gen calculados como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(Ct\ mPRs/PR-Ct\ Ciclofilina\ B)}$).



Expresión de mPRs en hipotálamo de ratón

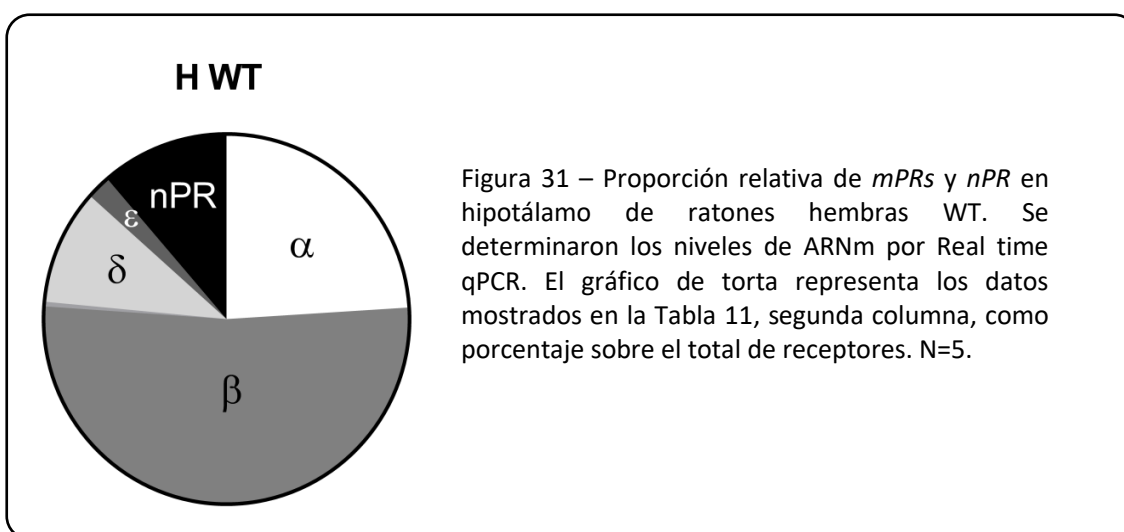
Finalmente, y dado que los *mPRs* se encontraron altamente expresados en el hipotálamo de rata (Capítulo 1 del presente trabajo), a continuación, y para profundizar el estudio en este modelo de ratones *Drd2KO*, exploramos comparativamente entre sexos y genotipos la expresión génica de *nPRs* y *mPRs* en hipotálamos. La Tabla 11 muestra los valores de $2^{-\Delta Ct}$ obtenidos para cada gen.

No se encontraron diferencias significativas entre los grupos, (ni entre sexos ni entre genotipos dentro del mismo sexo), por lo tanto, en la Figura 31 mostramos, a modo de ejemplo, sólo el gráfico circular del análisis cualitativo de la proporción relativa de los receptores de progesterona en el hipotálamo de ratón hembra WT.

Al igual que lo observado previamente en hipotálamo de rata (Figura 16A), los *mPRs* también representan un porcentaje llamativamente alto entre los receptores de P4 totales en el hipotálamo de ratones.

	H WT	H <i>Drd2KO</i>	M WT	M <i>Drd2KO</i>
Gen	$2^{-\Delta Ct} \pm SEM$			
<i>mPR</i> α	0.529 \pm 0.038	0.482 \pm 0.034	0.482 \pm 0.027	0.498 \pm 0.025
<i>mPR</i> β	1.186 \pm 0.183	1.176 \pm 0.080	1.309 \pm 0.109	1.096 \pm 0.047
<i>mPR</i> γ	0.009 \pm 0.001	0.007 \pm 0.001	0.015 \pm 0.004	0.008 \pm 0.000
<i>mPR</i> δ	0.227 \pm 0.047	0.221 \pm 0.021	0.201 \pm 0.027	0.217 \pm 0.009
<i>mPR</i> ϵ	0.047 \pm 0.005	0.047 \pm 0.004	0.050 \pm 0.003	0.037 \pm 0.002
<i>nPR</i>	0.259 \pm 0.042	0.233 \pm 0.029	0.336 \pm 0.043	0.340 \pm 0.016

Tabla 11 - Valores de cada gen calculados como $2^{-\Delta Ct}$ ($2^{-(Ct\ mPRs/PR-Ct\ Ciclofilina\ B)}$).



Efecto de un tratamiento *in vivo* con Org OD 02-0, sobre los niveles de PRL sérica en ratones Drd2KO

A partir de los resultados mencionados anteriormente, y considerando que:

- ✓ En las hipófisis tumorales existe una alta proporción de receptores *mPR α* y *mPR β*
- ✓ La activación de los *mPR α/β* disminuye la secreción de PRL por acción directa sobre el lactotrofo y por acción indirecta liberando DA del hipotálamo, tejido donde los mPRs se encuentran altamente expresados

Postulamos al agonista de *mPR α/β* Org OD 02-0 como un posible fármaco terapéutico para el tratamiento de la hiperprolactinemia patológica. Para corroborarlo, realizamos un ensayo *in vivo* con el agonista de mPRs en ratones hembra Drd2KO a los 8 meses de edad, momento en el cual las hembras KO ya presentan marcada hiperplasia de lactotrofos y una marcada hiperprolactinemia (Detalles de la metodología en MyM Página 37).

Como puede observarse en la Figura 32, una única dosis aguda de Org OD 02-0 logró disminuir significativamente la hiperprolactinemia en tan solo 15 minutos de tratamiento, prácticamente a la mitad de los valores de tiempo 0, efecto que se mantuvo a los 30 minutos, evidenciando un mecanismo rápido y potente de acción inhibitoria sobre la secreción de PRL.

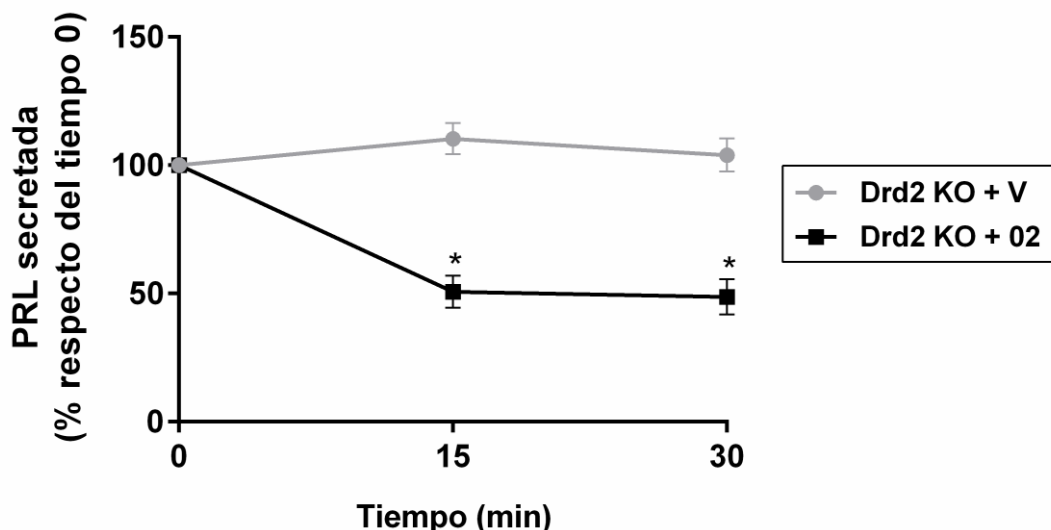
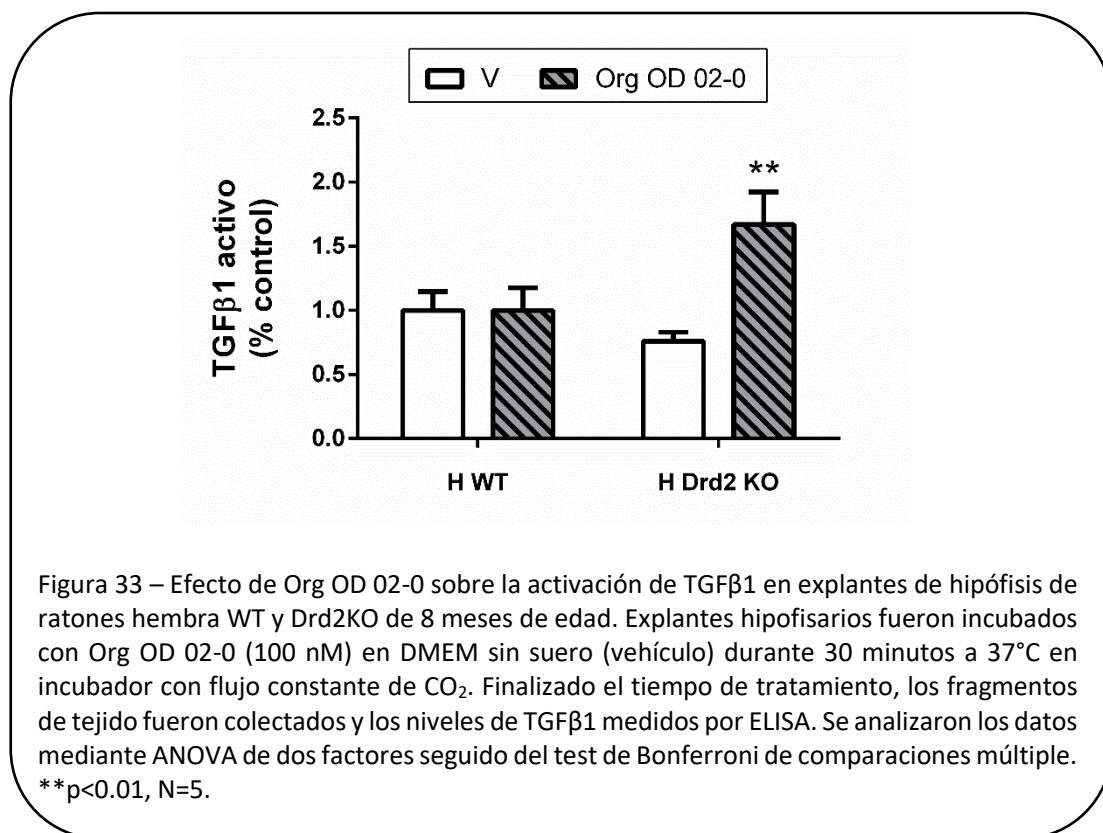


Figura 32 – Efecto de Org OD 02-0 en los niveles de PRL sérica en hembras Drd2KO. Los niveles de PRL sérica se midieron por RIA. Los resultados fueron analizados mediante ANOVA de una vía para medidas repetidas. * $p < 0.033$, $N = 5$ para cada grupo. Debido a la variabilidad en los valores de hiperprolactinemia presentada en cada animal, los resultados se muestran como porcentaje respecto al valor de PRL en tiempo 0.

En el capítulo 1 habíamos demostrado un mecanismo novel de señalización de P4 a través de los mPRs en la inhibición de PRL, que involucraba la activación de TGF β 1. Si bien los resultados obtenidos con la línea celular GH3 constituyen una aproximación al estudio de progesterona en la activación de TGF β 1, la respuesta obtenida en un cultivo celular puede llegar a ser muy diferente a lo que ocurre *in vivo*, en especial cuando los estímulos utilizados modifican procesos que ocurren en la matriz extracelular, como puede ser el caso de la activación de TGF β 1.

Para corroborar esta hipótesis, y comprobar si el mismo mecanismo podía observarse utilizando tejido hipofisario, decidimos realizar otro abordaje experimental, utilizando el modelo *ex vivo*, es decir, incubando hemi-hipófisis (explantes) en cultivo provenientes de ratones hembras Drd2KO (prolactinomas) y WT de 8 meses de edad, en presencia o ausencia de Org OD 02-0 (100 nM) durante 30 minutos. Finalizado el tiempo de tratamiento se colectó el medio y en homogenato de los explantes se midieron los niveles de TGF β 1. Como puede observarse en la Figura 33, la activación específica de los mPRs indujo un marcado incremento en los niveles hipofisarios de TGF β 1 activo, en

hipófisis tumorales de hembras adultas *Drd2KO*, en las cuales la proporción de *mPRs* se encuentra incrementada.



CONCLUSIONES CAPÍTULO 3

- Los prolactinomas (3 modelos animales con diferentes contextos hormonales) presentan menor expresión de receptores de progesterona (*mPRs* y *nPRs*) que las hipófisis normales.
- Los prolactinomas presentan un marcado aumento en la expresión relativa de *mPRs*, específicamente de *mPRα* y *mPRβ*, respecto al total de receptores, debido principalmente a una disminución marcada de la expresión de *nPRs*.
- Las hipófisis de machos presentan elevada expresión de *mPRs* comparado con las de las hembras.
- Los hipotálamos de ratón, al igual que en el modelo de rata, poseen una muy alta expresión de *mPRs*, sin diferencias sexuales ni genotípicas.

- Tanto P4 como el agonista mPR específico Org OD 02-0 ejercen un efecto inhibitorio de prolactina tanto en hipófisis normales como en prolactinomas
- La inhibición que induce P4 sobre la secreción de PRL vía mPRs, sería mediada, al menos en parte, por un incremento en la actividad local de TGF β 1

DISCUSION DEL CAPITULO 3

En el presente trabajo describimos cómo la expresión hipofisaria de los *mPRs* se ve alterada en diferentes modelos animales de prolactinomas. Pese a los menores niveles de expresión detectados en hipófisis tumorales respecto a la hipófisis normales, la proporción relativa de los *mPRs* respecto del total de los receptores de progesterona resultó ser mayor en los prolactinomas (60% mPRs en prolactinomas), debido a la marcada disminución observada en la expresión de los *nPRs*. Este cambio en la proporción de receptores seguramente implica alteraciones en la respuesta a progesterona en las hipófisis tumorales.

La regulación de la función del lactotrofo por P4 ha sido siempre controversial. Los primeros estudios en el tema fueron realizados en el modelo de rata. Durante mucho tiempo se pensó que estas acciones de P4 eran sólo de tipo indirectas, vía hipotálamo, actuando sobre las neuronas dopaminérgicas, ya que la expresión de los nPRs en hipófisis de rata se hallaba restringida únicamente a gonadotropos (Fox, Harlan, Shivers, & Pfaff, 1990). Posteriormente, se describió que, en hipófisis de ratones, los nPRs se expresaban también en lactotropos (Turgeon & Waring, 2000), complejizando el estudio de las acciones finales de P4 en la secreción de PRL, con la posibilidad de efectos directos (hipofisarios) e indirectos (hipotalámicos).

La situación se complejizó aún más en los últimos 15 años con el descubrimiento de una nueva familia de receptores de progesterona de membrana (Y. Zhu et al., 2003).

Como vimos en el Capítulo 1 de esta tesis, los mPRs se expresan en hipófisis de rata y la activación de mPR α inhibe la secreción de PRL, demostrando un efecto directo inhibitorio de P4 en la función lactotropa.

Los resultados del presente capítulo muestran una expresión hipofisaria disminuida de todos los receptores de P4 (*nPRs* y *mPRs*) en los tres modelos animales de prolactinoma comparativamente con tejido normal. Sin embargo, en dichas situaciones patológicas, la expresión relativa de *mPRs/nPR* es mayor. De hecho, mPR α y mPR β en conjunto representan más del 60% de los receptores totales de progesterona en hipófisis de hembras Drd2 KO (tumoraes). Es más, es interesante destacar que la activación de los mPRs en este modelo fue capaz de inhibir la secreción de PRL y este efecto, estaría mediado, al menos en parte, por el aumento de los niveles locales de TGF β 1 activo, un potente inhibidor de la función lactotrofo.

Si bien en el capítulo 1 demostramos la participación de TGF β 1 en la inhibición de PRL inducida luego de la activación de mPRs en células GH3, es sabido que las respuestas observadas en un cultivo celular pueden llegar a ser muy diferente a lo que ocurre *in vivo*, en especial cuando se encuentran involucrados procesos en los que intervienen componentes de la matriz extracelular, como puede ser el caso de la activación de TGF β 1. En el presente capítulo demostramos que la activación de mPRs es capaz de inducir un aumento en los niveles de TGF β 1 activo en explantes hipofisarios incubados *ex vivo*, tanto prolactinomas como hipófisis normales, modelo en el cual se mantiene la estructura tridimensional de la matriz extracelular.

Al igual que lo recalcamos en la discusión del capítulo 1, es interesante volver a destacar que P4 activa TGF β 1 vía mPRs involucrando la misma señalización intracelular que aquella utilizada por DA para activar la citoquina en hipófisis a través de los receptores Drd2 (Sarkar et al., 2005).

Otro hallazgo interesante de los resultados obtenidos son las diferencias sexuales respecto a la expresión de mPRs en los modelos de prolactinoma estudiados.

Existen diferencias sexuales en cuanto a la incidencia, tamaño y comportamiento de prolactinomas, no solo en humanos sino también en modelos animales. En humanos, por ejemplo, la prevalencia de prolactinomas es más alta en mujeres que en hombres durante el periodo fértil (entre 20 y 50 años) (Colao et al., 2003; Gillam, Molitch, Lombardi, & Colao, 2006). Por otra parte, los síntomas causados por la hiperprolactinemia en mujeres (*e.g.* desordenes del ciclo menstrual) son detectados con

antelación, y en general tienen un diagnóstico temprano de la presencia de un prolactinoma; en contraste con las manifestaciones clínicas en hombres, como ser disminución de la libido y disfunción sexual, síntomas usualmente asociados a otras patologías que conducen a una detección más tardía (Colao et al., 2003). Estas características, sin embargo, no explican las diferencias sexuales en el tamaño y la agresividad del tumor en ambos sexos; por lo que se sugiere que un comportamiento sexo-específico para los prolactinomas humanos (Molitch, 2015; Witek & Zielinski, 2013).

Es interesante que las diferencias sexuales en cuanto a incidencia y comportamiento de estos tumores se han observado también en diversos modelos animales de prolactinoma. En el ratón *Drd2* KO, pese a la falta de inhibición dopaminérgica, sólo las hembras desarrollan una marcada hiperplasia de lactotrofos e hiperprolactinemia a los 8 meses de edad (Asa et al., 1999; Diaz-Torga et al., 2002; M. A. Kelly et al., 1997), mientras que los machos *Drd2*-deficientes desarrollan pequeños pero más agresivos adenomas de lactotrofos entre los 17 y 20 meses de vida (Asa et al., 1999). Resultados similares han sido reportados en otros modelos animales de prolactinomas (resumido en (M.V. Recouvreux et al., 2018)): el ratón *hCGβ+* (Faraoni et al., 2017; Rulli et al., 2002), el ratón transgénico que sobreexpresa galanina en lactotrofos (Cai, Hayes, Patel, & Hyde, 1999), el modelo de ratón con sobreexpresión del factor de crecimiento nervioso (Borrelli, Sawchenko, & Evans, 1992), sobreexpresión de *FGFR4* (Ezzat, Wang, Pintilie, & Asa, 2017), sobre expresión de *TGFα* dirigida a lactotrofos (McAndrew, Paterson, Asa, McCarthy, & Kudlow, 1995) y el modelo de ratón KO para el receptor de PRL (Goffin et al., 1999). En todos estos modelos, la hiperprolactinemia y el desarrollo tumoral son observados solamente (o son más pronunciados) en hembras.

La participación de los esteroides ováricos en estas diferencias sexuales no puede ser excluida. En efecto, ratones hembras *Drd2* KO y *hCGβ+* no desarrollan prolactinomas al ser ovariectomizadas a edades prepuberales, y un reemplazo estrogénico en hembras OVX no es suficiente para recapitular el fenotipo tumoral (Ahtiainen et al., 2010; Hentges & Low, 2002), sugiriendo que otros factores ováricos se encuentran involucrados en las diferencias sexuales en el comportamiento tumoral.

Nuestros resultados muestran una alta expresión hipofisaria de $mPR\alpha/\beta$ en hipófisis de machos en comparación con las hembras representando alrededor del 80% del total de los receptores de progesterona. Es sabido que además de la síntesis ovárica y placentaria en hembras, la P4 también es sintetizada en las glándulas adrenales y en el sistema nervioso de hembras y machos. Dado que, la activación de $mPR\alpha/\beta$ conduce a la inhibición en la secreción de PRL; es probable que la alta expresión hipofisaria de $mPRs$ hallada en machos este protegiendo a este sexo del desarrollo de un prolactinoma.

Respecto de la expresión de $mPRs$ en hipotálamo de ratón, observamos altos niveles de $mPRs$ en ratón, sin diferencias en cuanto a sexo o genotipo. Este resultado es concordante con los resultados del Capítulo 1, donde demostramos que los $mPRs$ se expresan en hipotálamo de rata, siendo los más abundantes $mPR\alpha$ y β ; y que la activación específica de los $mPRs$ conduce a una liberación rápida de dopamina en explantes hipotalámicos. Esta liberación de dopamina *in vivo* de seguro impacta indirectamente en la secreción de PRL.

De esta manera, considerando tanto los efectos directos de Org OD 02-0 en la población lactotropa como los efectos a nivel hipotalámico, postulamos que la activación específica de $mPR\alpha/\beta$ podría representar una potencial herramienta terapéutica para reducir los altos niveles de PRL en situaciones patológicas de hiperprolactinemia.

Colectivamente nuestros resultados demuestran que la activación de $mPR\alpha/\beta$ inhibe la secreción de PRL actuando directamente en la población lactotropa, e indirectamente aumentando la liberación de DA en el hipotálamo.

Considerando que alrededor de un 20% de los pacientes que exhiben prolactinomas son resistentes a las terapias actuales con agonistas dopaminérgicos, y que a la fecha, no existen terapias alternativas; **nuestros descubrimientos posicionan al Org OD 02-0 como una herramienta farmacológica putativa para el tratamiento de prolactinomas resistentes, o la reducción de hiperprolactinemias no deseadas, como por ejemplo la suspensión de la lactancia.**

CAPITULO 4
**Rol de GPER en la
población lactotropa**

INTRODUCCION CAPITULO 4

Está bien documentado en la literatura el rol mitogénico de los estrógenos sobre los lactotropos (A Seilicovich, 2010). Inicialmente, las acciones proliferativas de los estrógenos en células lactotropas fueron descritas mediadas por el receptor clásico ER α (Sandra Zarate & Seilicovich, 2010). Sin embargo, más recientemente han sido comprobados claros efectos apoptóticos (S Zarate et al., 2009) y antiproliferativos (Perez et al., 2015); y que la acción apoptótica de los estrógenos dependería de la coacción con otros factores, por ejemplo IGF (Silvina Gutierrez et al., 2008). Si bien estos resultados en conjunto parecerían contradictorios, las diferencias podrían deberse a la utilización de distintos modelos experimentales. La elección del modelo experimental es un factor fundamental al estudiar los efectos esteroideos. Como demostramos en el Capítulo 2 de la presente Tesis, por ejemplo, una OVX altera en forma significativa la proporción de los receptores esteroideos hipofisarios y, por lo tanto, la respuesta final obtenida.

Por otro lado, el tipo de receptores de estrógenos involucrados y la localización subcelular de los mismos también contribuye a la dispersión de los resultados observados en las diferentes condiciones experimentales. Es así como la activación de ER α nuclear puede inducir proliferación de los lactotropos, mientras que el ER α localizado en membrana (mER α) ha sido asociado a efectos anti-mitogénicos (Silvina Gutierrez et al., 2008) y apoptóticos de los estrógenos (S Zarate et al., 2009). Por otra parte, se ha descrito que el receptor clásico ER β (Mitchner, Garlick, & Ben-Jonathan, 1998), también expresado en lactotropos, mediaría un rol inhibitorio sobre la proliferación celular lactotropa; efecto mediado al menos en parte por la inhibición de la expresión de ER α (Perez et al., 2015).

A su vez, un gran número de estudios recopilados en los últimos años demuestran que los estrógenos son capaces de ejercer acciones rápidas, no genómicas a nivel de la membrana plasmática, aún en modelos carentes de ER α (M. J. Kelly & Levin, 2001; Levin & Hammes, 2016).

La participación de GPER (anteriormente denominado GPR30) en los efectos rápidos, no genómicos de los estrógenos ha estado en la mira de los científicos en los

últimos años. Se ha propuesto que GPER colabora con la señalización de $mER\alpha$, sin embargo, la especificidad de función del GPER en células que no expresan ERs ha sido ampliamente demostrada (E J Filardo et al., 2000; Edward J Filardo, 2002; Revankar, Cimino, Sklar, Arterburn, & Prossnitz, 2005; P Thomas et al., 2005). De acuerdo con estos estudios, trabajos en el ratón transgénico KO para GPER indican que GPER es un receptor autónomo con acciones específicas en el metabolismo de los glúcidos y el crecimiento óseo (Sharma & Prossnitz, 2016).

Respecto de su estructura proteica, GPER es un receptor de 7 pasos transmembrana que pertenece a la familia de receptores acoplados a proteína G (GPCRs). Fue identificado por primera vez en células de cáncer de mama pero luego fue reportado en numerosos tejidos incluidos cerebro e hipófisis en rata y ratón (Brailoiu et al., 2007; Hazell et al., 2009; Rudolf & Kadokawa, 2013). La mayoría de los estudios de GPER en hipófisis han estado focalizados principalmente en la función de los gonadotropos; mientras que se conoce poco de la expresión y función de este receptor en la fisiología y patología de los lactotropos.

☞ HIPÓTESIS

“La ovariectomía altera la expresión hipofisaria de receptores clásicos y no clásicos de estrógenos, predisponiendo la glándula a un entorno proliferativo”

☞ OBJETIVO GENERAL

Estudiar la expresión de los receptores clásicos y no clásicos de estrógenos en hipófisis normal y frente a una OVX

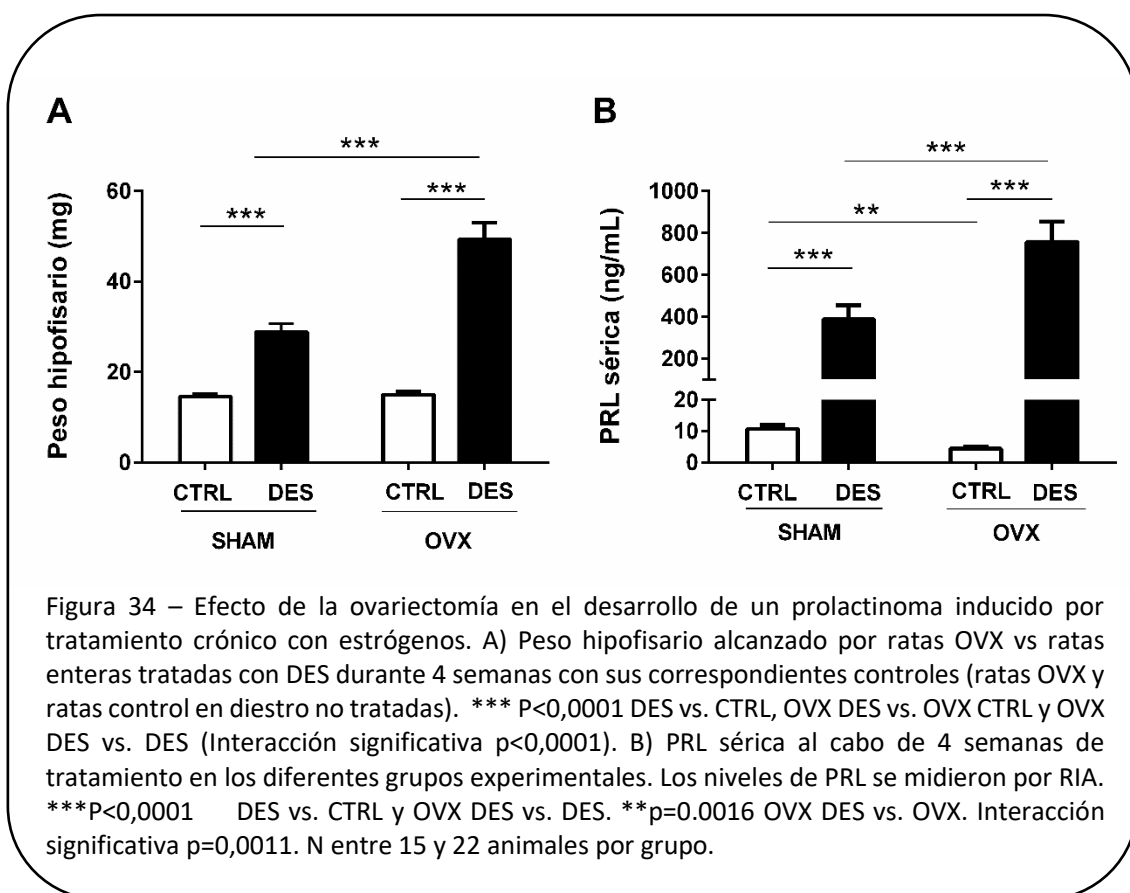
Objetivos específicos:

- ☞ Examinar la expresión y localización subcelular de GPER en la población lactotropa
- ☞ Estudiar las alteraciones inducidas luego de la OVX en la expresión de GPER en la adenohipófisis
- ☞ Evaluar la regulación local de GPER en hipófisis por estradiol y progesterona,
- ☞ Estudiar la implicancia de GPER en los efectos estrogénicos sobre la secreción de PRL valiéndonos de estrategias farmacológicas (agonistas y antagonistas de GPER) *in vitro* y *ex vivo*, en células GH3 y en hipófisis de rata respectivamente.

RESULTADOS CAPITULO 4

La ovariectomía facilita el desarrollo de un prolactinoma experimental inducido por estrógenos

Como vimos en el Capítulo 2 de la tesis, las hembras OVX desarrollan tumores más grandes y una hiperprolactinemia más marcada (vs ratas control) frente a un tratamiento con DES (Fig. 34).



En primer lugar, estudiamos si efectivamente la OVX estaba alterando la expresión de los receptores clásicos de estrógenos. Comenzamos analizando la expresión de ARNm de *ERα* y *ERβ* en ratas hembra adultas cicladas en diestro y ratas OVX (Fig. 35A, B).

Nuestros resultados muestran que, la expresión de ambos receptores clásicos, *ERα* y *ERβ*, se encuentra significativamente incrementada en hipófisis luego de una OVX, y que el incremento de *ERβ* es mayor en magnitud al de *ERα* (en hembras OVX respecto

de hembras control). Al ver que la falta de esteroides ováricos alteraba muy significativamente los niveles de expresión de ambos receptores, evaluamos la regulación de los mismos por estradiol y progesterona. Para ello realizamos un tratamiento agudo *in vivo* con estradiol (0,25 mg/ml valerato de estradiol, sc, 1, 2 y 24hs) y con progesterona (6,5mg/kg hidroxiprogestero, Proluton Depot, Schering, sc, 1, 2 y 24hs) en ratas hembra control (Fig. 35 C-F).

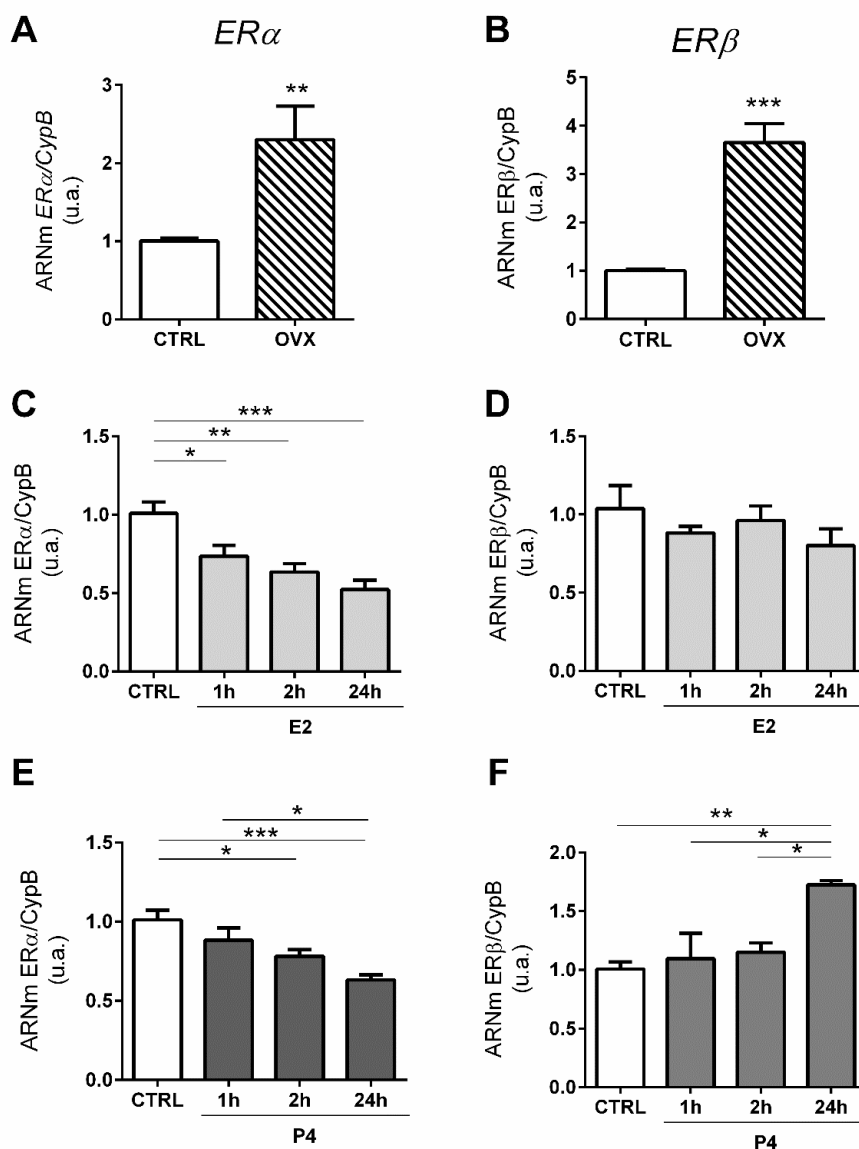


Figura 35 –Expresión de ARNm de *ERα* y *ERβ* en hipófisis de ratas hembra OVX y ratas control en diestro. Análisis estadístico: Prueba T de Student, N=8. A) *ERα*; **p=0.0061 OVX vs. Control. B) *ERβ*; ***p<0.0001 OVX vs. Control. Efecto de E2 (0.2 mg/kg; 1, 2 y 24 hs) en la expresión génica de C) *ERα* y D) *ERβ* en hipófisis de rata. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del Test de comparaciones múltiples de Tukey, N=6. *p<0.05 E2 1h vs. Control, **p<0.01 E2 2h vs Control, ***p<0.001 E2 24h vs. Control. Efecto de P4 (6.5 mg/kg; 1, 2 y 24 hs) en la expresión génica de E) *ERα* y F) *ERβ* en hipófisis de rata. Análisis estadístico: ANOVA de un factor, seguido del Test de comparaciones múltiples de Tukey, N=6. *p<0.05 E2 1h vs. Control, **p<0.01 E2 2h vs Control, ***p<0.001 E2 24h vs. Control.

Como puede observarse en la Figura 35 C y E, *ERα* hipofisario se encuentra regulado negativamente por E2 y P4, lo cual podría estar explicando el aumento significativo de la expresión hipofisaria ante la una ovariectomía. Por otra parte, no encontramos una regulación de *ERβ* por estrógenos, pero si un incremento de expresión inducido a las 24 hs por P4, pero esto no estaría explicando su aumento en la expresión hipofisaria luego de una OVX.

Estos resultados, y estudios previos que han reportado un claro efecto mitogénico y proliferativo de E2 en lactotrofos mediado por *ERα*, podrían explicar la respuesta diferencial e incrementada al DES en hembras OVX.

El rol de *ERβ* en cambio, no es tan claro. Según antecedentes bibliográficos, la expresión de este receptor en células lactotropas durante el desarrollo tumorogénico de la glándula se encuentra disminuida (Perez et al., 2018, 2015). Los mismos autores sugieren que la pérdida de la expresión de este receptor sería uno de los factores claves en la desregulación de la proliferación celular en el modelo de ratas hembra estrogenizadas.

Como fuera mencionado anteriormente, varios trabajos han explorado la participación de los receptores clásicos nucleares de estrógenos en los efectos proliferativos y/o apoptóticos de los estrógenos en el desarrollo de un prolactinoma. Por el contrario, el receptor no clásico de estrógenos GPER no había sido caracterizado en hipófisis normal y tumoral; desconociéndose su función en la población lactotropa.

GPER en hipófisis: expresión y localización en las células lactotropas

Con el objetivo de determinar la expresión y localización de GPER en lactotrofos y en otros tipos celulares adenohipofisarios (somatotrofos y gonadotrofos) realizamos una doble ICQ en células provenientes de cultivo primario de adenohipófisis de rata. Como puede observarse en la imagen obtenida por microscopía confocal (Fig. 36): lactotrofos (PRL+), somatotrofos (GH+) y gonadotrofos (β LH+) expresan GPER, tanto en la membrana plasmática, siguiendo un patrón de tinción circunferencial, como en el

citoplasma, donde se observa una señal más difusa de fluorescencia. Se determinó la especificidad del anticuerpo incubando a las células con el anticuerpo pre-adsorbido con el antígeno purificado o en ausencia de anticuerpo primario.

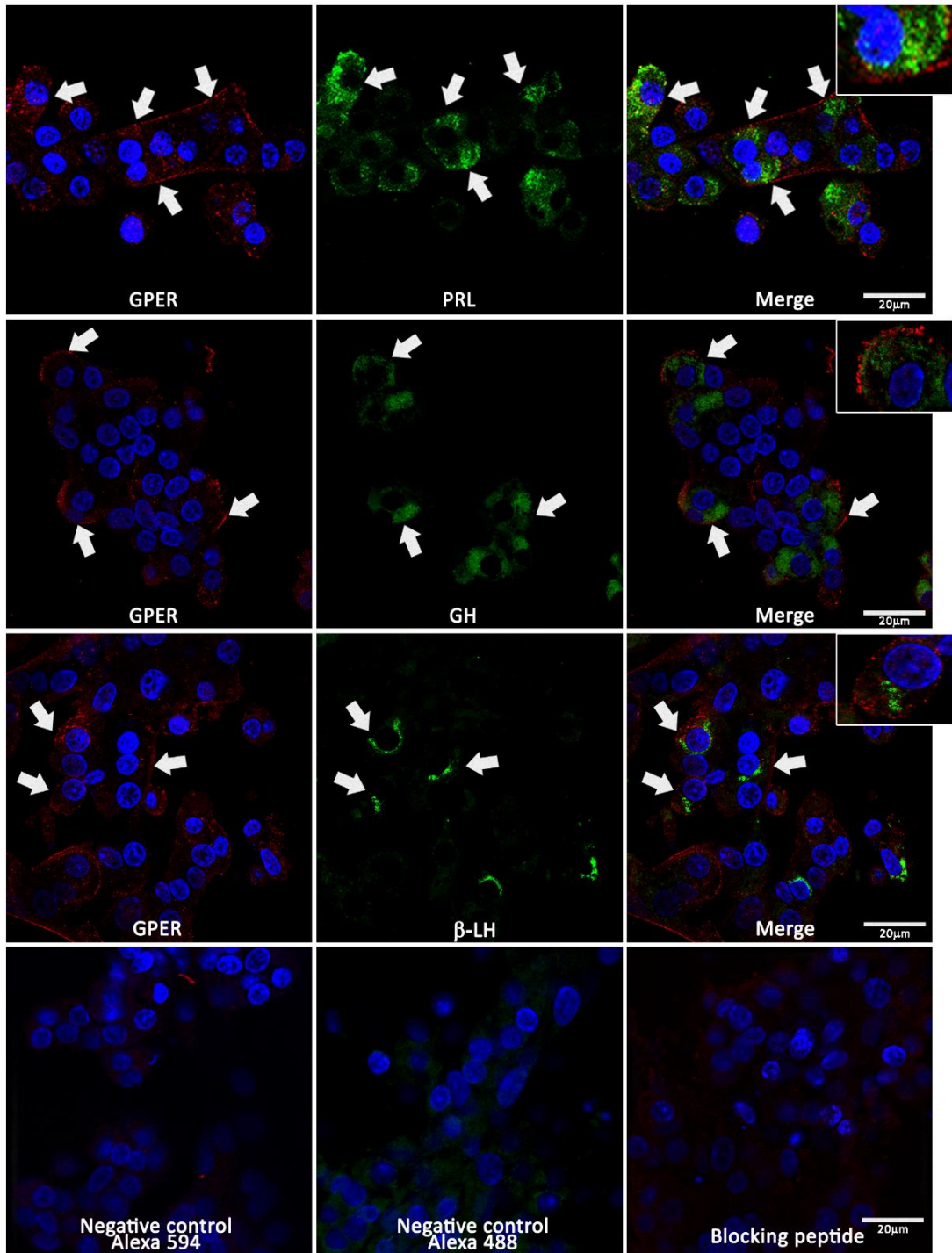


Figura 36 - Expresión de GPER en adenohipófisis de rata. La identificación y co-localización de GPER con las hormonas hipofisarias PRL, GH y LH se realizó por doble inmunofluorescencia indirecta en células provenientes de adenohipófisis de ratas hembra SD dispersadas en cultivo e incubadas con los anticuerpos específicos correspondientes (anti-GPER, ab39742, Abcam, 1:50 y anti-PRL, GH o LH específicos provistos por el Dr. A Parlow 1:1000). Los núcleos fueron teñidos con DAPI. Las flechas blancas indican lactotrofos (PRL), somatotrofos (GH) y gonadotrofos (β LH) expresando GPER. Para validar la especificidad del anticuerpo, se realizaron controles negativos pre incubando el anticuerpo primario de GPER con el péptido de bloqueo o bien reemplazando el anticuerpo primario con suero normal y luego incubando con anticuerpo secundario Alexa 594 o Alexa 488 en una dilución 1:2000. Barra de escala = 20 μ m

Para obtener específicamente el porcentaje de células adenohipofisarias y la proporción de lactotrofos que expresaban GPER, se realizó una doble inmunofluorescencia utilizando anticuerpos específicos para GPER y PRL en células provenientes de cultivo primario de adenohipófisis de rata y luego se determinó el porcentaje de células con marca simple (GPER+) o marca doble (GPER +, PRL +) mediante citometría de flujo (Tabla 12 y Figura 37).

% céls adeno hf GPER+	% céls GPER+ que son PRL+	% céls PRL+ que son GPER+
38.5 ± 8.4	49.5 ± 9.8	35.5 ± 3.5

Tabla 12 – Porcentaje (%) de eventos positivos (GPER+/PRL+) por FACS

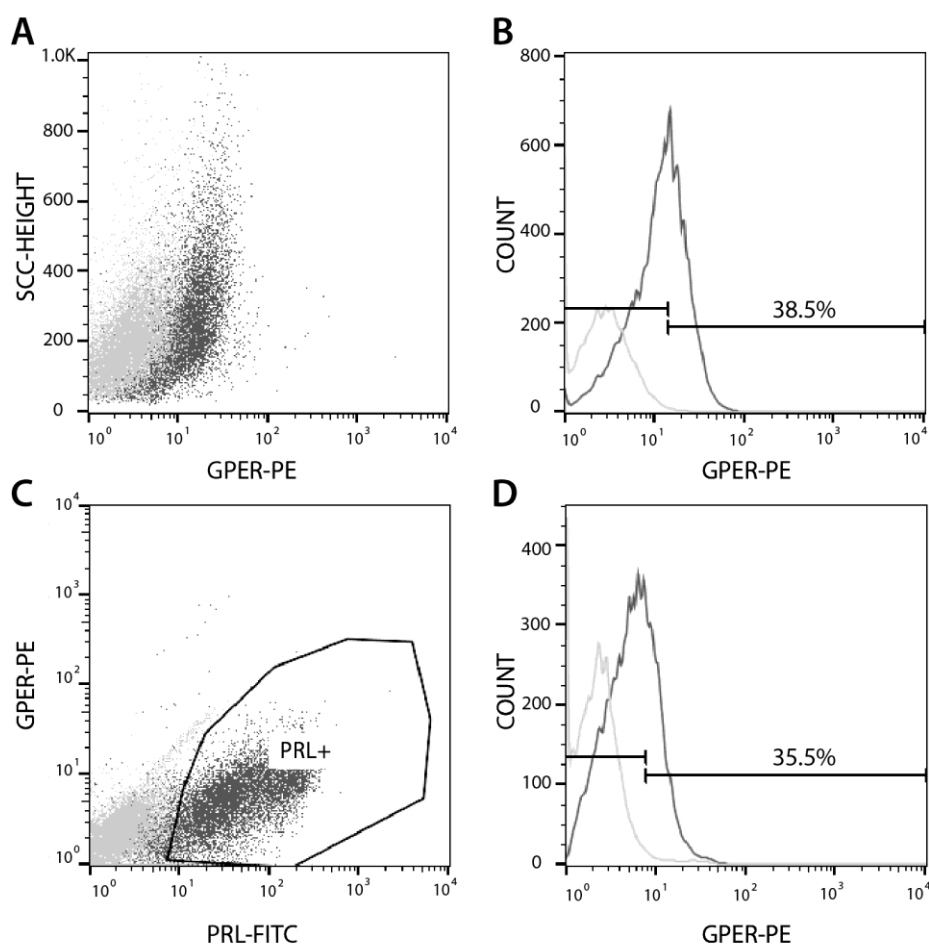


Figura 37 – Análisis de la proporción de células adenohipofisarias GPER-positivas por citometría de flujo. La inmunomarcación de GPER con PRL se realizó en células provenientes de adenohipófisis de ratas hembra SD dispersadas en cultivo incubadas con los anticuerpos específicos correspondientes (anti-GPER, ab39742, Abcam, 1:100 y anti-PRL Dr. A Parlow 1:10000). A) Dot plots representativos e histogramas mostrando A-B) porcentaje de células adenohipofisarias totales GPER+ y C-D) porcentaje de lactotrofos GPER-positivos. En gris: controles de isotipo. Área seleccionada: lactotrofos. N=8.

Regulación de *Gper* por estradiol y progesterona

Típicamente, E2 y P4 up-regulan o down-regulan la expresión de sus propios receptores (ver en figura 35 regulación de *ER α* y *ER β*) de acuerdo con el tejido y el contexto fisiológico. Para evaluar la regulación por ambos esteroides de los niveles de *Gper* en la hipófisis, a continuación, realizamos un tratamiento agudo *in vivo* en ratas hembras adultas (Fig. 38). El tratamiento *in vivo* con E2 disminuyó significativamente los niveles hipofisarios de *Gper* luego de 2 y 24 hs de respecto de ratas control en diestro (Fig. 38A). De igual modo, encontramos una regulación negativa de *Gper* por P4 a las 24 hs de tratamiento (Fig. 38B).

En concordancia con estos resultados, y debido a la falta del control por los esteroides ováricos, la expresión de *Gper* se encontró significativamente aumentada en la hipófisis de ratas hembra adulta OVX (Fig. 38C).

Asimismo, en pos de profundizar el estudio acerca de posibles alteraciones en la expresión de *Gper* en situaciones fisiológicas, evaluamos el impacto de la regulación por hormonas esteroideas gonadales durante el ciclo estral. Para ello, medimos los niveles de ARNm de *Gper* hipofisarios en ratas cicladas en diestro, proestro y estro al momento del sacrificio (Fig. 38D). Observamos que los niveles hipofisarios de *Gper* se encuentran muy disminuidos en proestro justamente cuando los niveles estrogénicos se encuentran en su máximo.

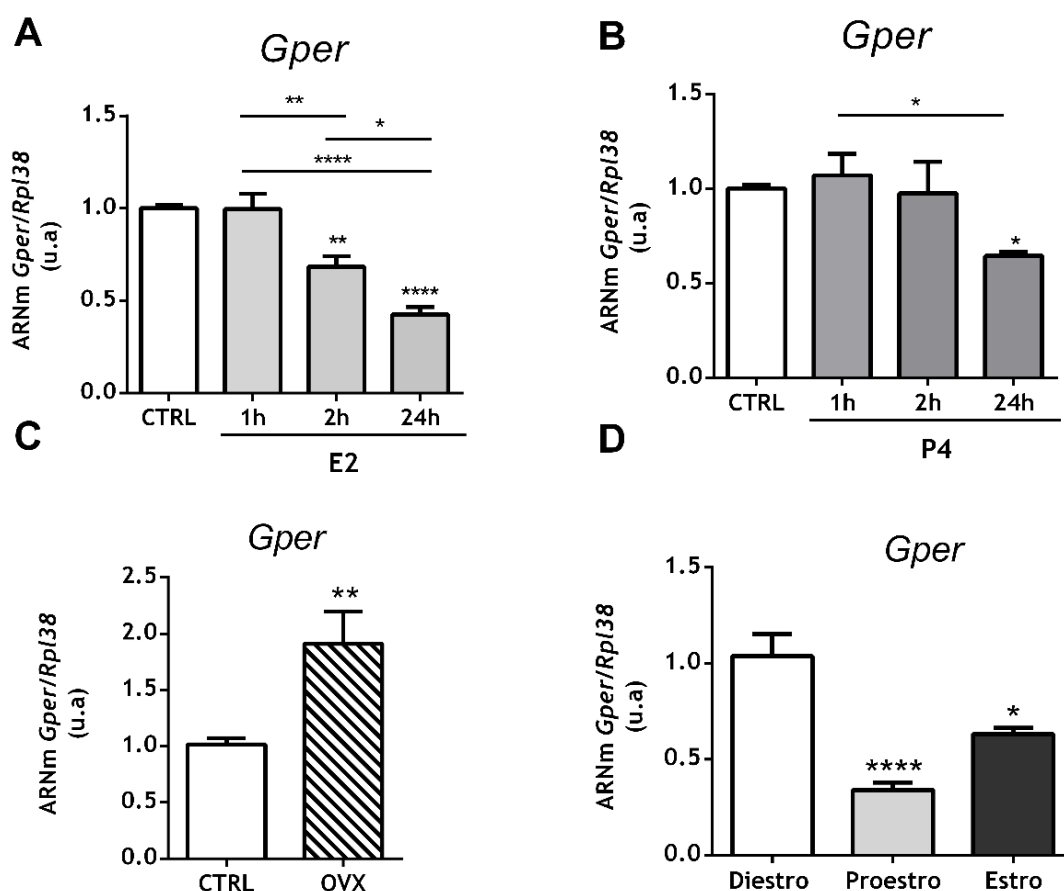


Figura 38 – Regulación de la expresión génica de *Gper* hipofisario por E2 y P4. Alteraciones inducidas por la OVX y durante el ciclo estral. A) Regulación por E2 de los niveles de ARNm de *Gper in vivo*. Ratas SD fueron inyectadas con valerato de estradiol (0.2 mg/kg, sc) y luego sacrificadas al cabo de 1h, 2hs y 24hs. Los datos fueron analizados por ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey, **p<0.0052 E2 2h vs CTRL; ****p<0.0001 E2 24h vs CTRL; **p=0.0059 E2 1h vs 2h; ****p<0.0001 E2 1h vs 24h y *p=0.0239 E2 2h vs 24hs. (N=5) B) Regulación por P4 de los niveles de ARNm de *Gper in vivo*. Ratas hembra SD fueron inyectadas con progesterona (6.5 mg/kg, sc) y luego sacrificadas al cabo de 1h, 2hs y 24hs. Los niveles de ARNm de fueron determinados por RT-qPCR en homogenatos de hipófisis. ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey, *p=0.0484 P4 24h vs CTRL and *p=0.0219 P4 1h vs 24h, (N=5). C) Efecto de la OVX (15 días post OVX) en los niveles hipofisarios de *Gper* analizados por RT-qPCR. Los datos fueron analizados por la Prueba T de Student, **p=0.0083 OVX vs control, (N=6). D) Niveles de ARNm de *Gper* en adenohipófisis de ratas en diestro, proestro y estro al momento del sacrificio. ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey, ***p<0.0001 proestro vs diestro; *p<0.0139 estro vs diestro. N=5 por grupo.

La OVX incrementa el porcentaje de células GPER-positivas en la población lactotropa

Con el propósito de examinar si el aumento de *Gper* hipofisario (ARNm) luego de la OVX se debía a un incremento específico de GPER (proteína) en la población lactotropa, estudiamos como variaba el porcentaje de células hipofisarias GPER-positivas y específicamente el de lactotropos GPER-positivos en hipófisis de ratas control vs. ovariectomizadas (GPER+; PRL+) mediante citometría de flujo (Fig. 39). Observamos que el porcentaje de células hipofisarias que expresaban GPER en hembras OVX era significativamente mayor que en hembras control en diestro (Fig. 39A), concordante con los datos obtenidos al evaluar la expresión de ARNm por RT-qPCR. Pero, interesantemente, este aumento observado en el porcentaje de células GPER+ resultó ser específico en lactotropos (Fig. 39B), dado que no encontramos diferencias significativas en el porcentaje de células no-lactotropas GPER-positivas (Fig. 39C) ni en el porcentaje de lactotropos al comparar ratas OVX vs. ratas control (Fig. 39D).

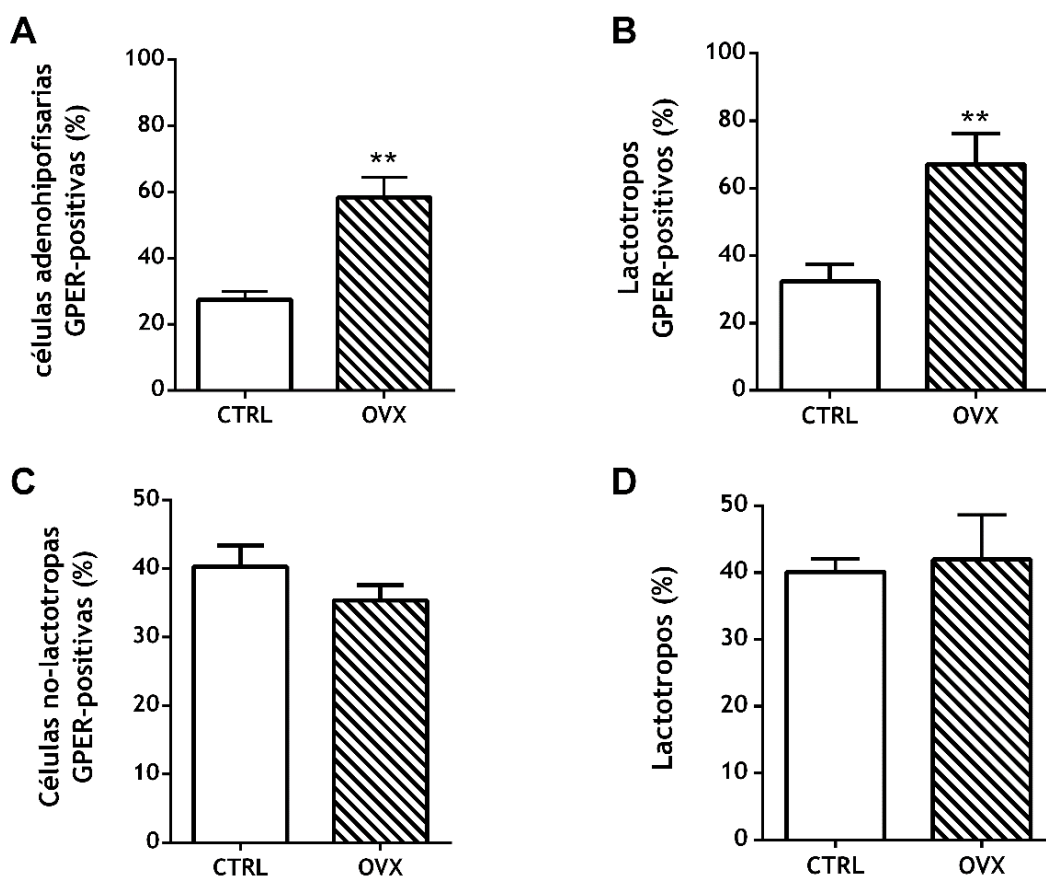


Figura 39 – Efecto de la OVX en la expresión de GPER en lactotropos. La inmunomarcación de GPER con PRL se realizó en células provenientes de adenohipófisis de ratas hembra SD en diestro y ratas OVX dispersadas en cultivo incubadas con los anticuerpos específicos correspondientes (anti-GPER, ab39742, Abcam, 1:100 y anti-PRL Dr. A Parlow 1:10000). A) Porcentaje de células GPER+ por citometría de flujo en hembras OVX vs. Hembras control. Prueba T de Student, **p=0.0022 B) Porcentaje de lactotropos GPER+. Prueba T de Student, **p=0.0063 C) Porcentaje de células no lactotropas GPER+. Prueba T de Student, p>0.05 D) Porcentaje de lactotropos en ambos grupos. Prueba T de Student, p>0.05. (N=6).

Localización subcelular de GPER en diferentes subtipos morfológicos de lactotropos

En la hipófisis de roedores, los lactotropos presentan cierta heterogeneidad morfológica y funcional (Christian, Chapman, & Morris, 2007; De Paul, Pons, Aoki, & Torres, 1997; Kukstas et al., 1990; Kunzmann et al., 2018). Por ejemplo, al microscopio electrónico, tres subtipos de lactotropos pueden distinguirse de acuerdo con la forma y

tamaño de sus gránulos secretorios. Con el objetivo de profundizar el estudio de la localización subcelular de GPER en los diferentes subtipos de lactotrofos, se realizaron estudios por microscopía electrónica.

Se realizó una inmunomarcación ultraestructural utilizando anticuerpos específicos para GPER y PRL y anticuerpos secundarios asociados a partículas de oro (de 15 nm y 5 nm respectivamente). Como puede verse en la Figura 40, las partículas coloidales de oro evidencian la expresión de GPER fundamentalmente en la cara interna de la membrana plasmática y en el retículo endoplasmático rugoso, con algunas partículas distribuidas en el citosol libre. En ratas hembra en diestro, GPER se encontró mayormente expresado en lactotrofos del subtipo I, identificados por sus gránulos secretorios grandes e irregulares (de un tamaño de entre 300 y 700 nm) inmunomarcados para PRL y distribuidos en el citoplasma. En las ratas OVX, en cambio, los tres subtipos de lactotrofos (I, II y III) resultaron ser GPER positivos. Los lactotrofos del subtipo II y III fueron identificados por sus gránulos típicamente esféricos de tamaño mediano (200-250 nm), y pequeño (100-200 nm) respectivamente.

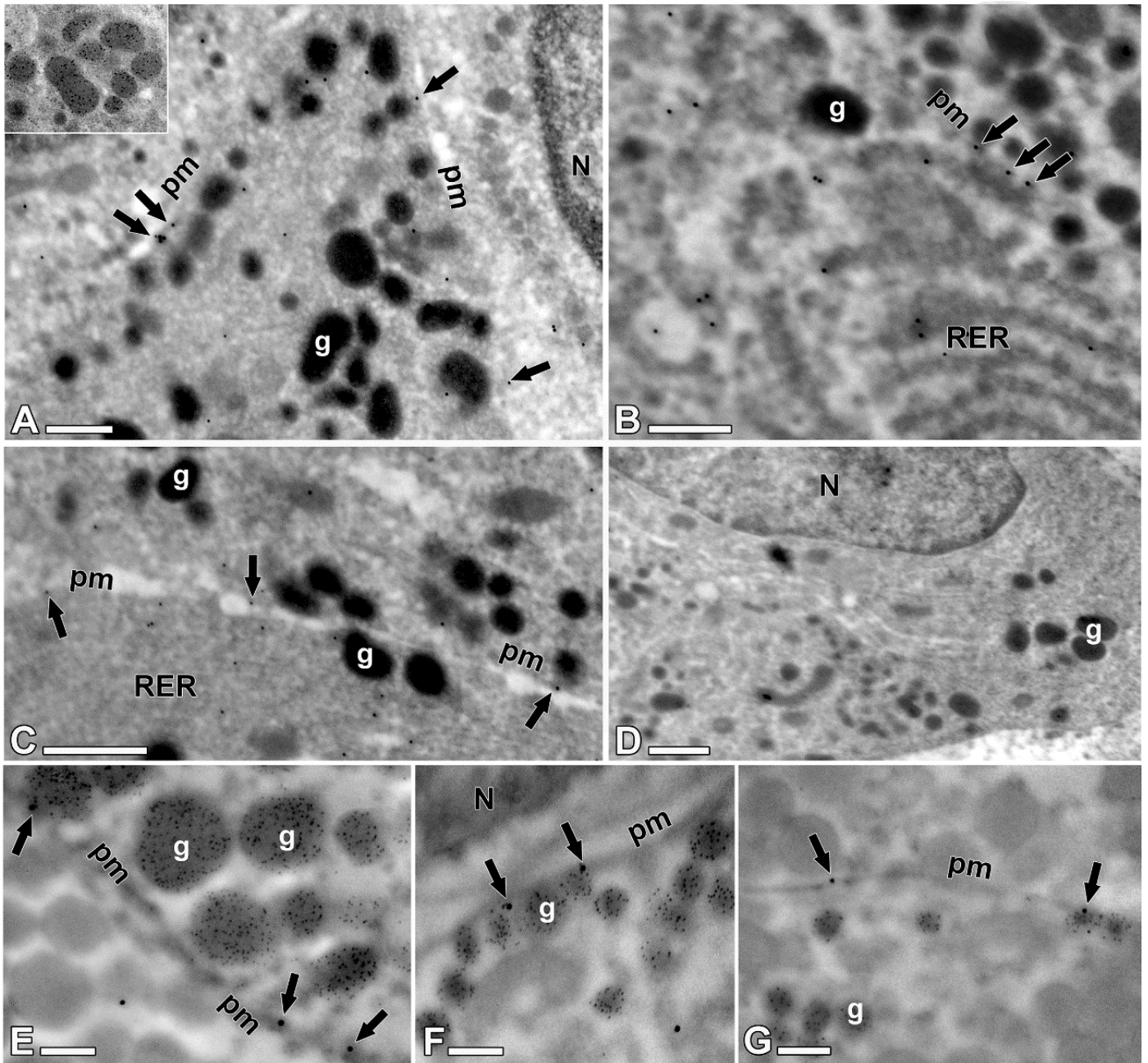


Figura 40– Localización subcelular de GPER por microscopía electrónica en lactotrofos de ratas control y OVX. A-C) Lactotrofos subtipo I de ratas hembra en diestro con partículas de oro de 15 nm asociadas a la membrana plasmática (flechas), el retículo endoplasmático rugoso (RER) y el citosol libre indican la presencia de GPER en dichas estructuras celulares. Inset: Gránulos grandes irregulares y polimórficos inmunomarcados para PRL (partículas de oro de 5 nm). D) Control negativo. Barra = 0.5 μ m. E-G) Lactotrofos de ratas hembra OVX inmunomarcadas para GPER asociado a partículas de oro de 15 nm en la membrana plasmática (flechas). Se identificaron los subtipos de lactotrofos inmunomarcados con partículas de 5 nm por sus gránulos secretorios grandes e irregulares (E: subtipo I), esféricos con un diámetro de entre 200-250 nm (F: Subtipo II) o esféricos más pequeños de entre 100-200 nm (G: Subtipo III). N: núcleo, pm: membrana plasmática, g: gránulos secretorios. Barra = 0.2 μ m.

La activación de Gper *in vitro* y *ex vivo* induce liberación de PRL

En base a que vimos que ~50% de células lactotropas expresaban GPER, a continuación comenzamos evaluando la implicancia de este receptor en la secreción de PRL mediante el uso de agonistas y antagonistas específicos de GPER *in vitro* (1) y *ex vivo* (2):

1. LÍNEA CELULAR GH3

Utilizamos la **línea celular GH3** previamente descrita. Para los ensayos, células GH3 fueron preincubadas con un antagonista específico de GPER (G36, 10^{-6} M) (Dennis et al., 2011) o con etanol (V) durante 30 min y luego incubadas en presencia de estradiol (E2, 10^{-6} M) o el agonista de GPER (G1, 10^{-6} M) durante 15 minutos. Como controles, células GH3 fueron incubadas únicamente con V o G36. Al cabo del tiempo de tratamiento, se recolectaron los medios y se midieron niveles de PRL por RIA (Fig. 41A) Luego de 15 minutos de estimulación, tanto E2 como el agonista de GPER G1 aumentaron significativamente los niveles de PRL respecto de las células control, efecto que fue parcialmente contrarrestado en presencia del antagonista G36

2. EXPLANTES HIPOFISARIOS

Habiendo observado que E2 y G1 eran capaces de estimular la secreción de PRL *in vitro*, estudiamos dicho efecto *ex vivo* en explantes hipofisarios de ratas hembra en diestro. Como se muestra en la figura 41B, E2 y G1 indujeron un fuerte aumento en los niveles de PRL respecto del grupo control, siendo este efecto prevenido en aquellas células previamente tratadas con el antagonista G36.

Por otro lado, se destaca que G36 no modificó la secreción de PRL per sé, en ninguno de los dos modelos utilizados.

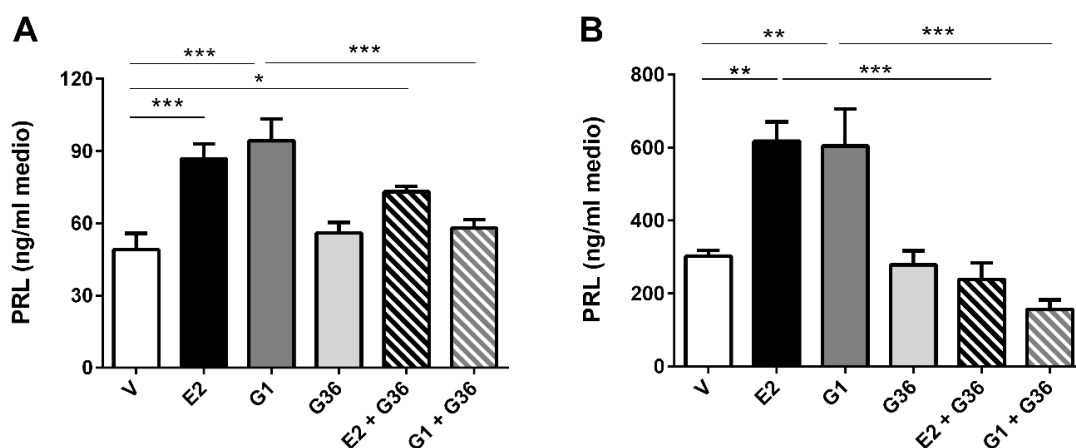


Figura 41 – Efecto de E2, G1 y/o G36 en los niveles de PRL *in vitro* y *ex vivo*. A) Las células GH3 fueron incubadas en DMEM con G36 (1 μ M) o vehículo (Etanol) durante 30 minutos y luego se agregaron los estímulos (estradiol o G1, 100 nM) solos o en combinación con G36 por 15 minutos a 37°C. Luego de los tratamientos, se colectaron los medios y se midieron los niveles de PRL por RIA. Se analizaron los datos por ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey. Se realizaron tres ensayos independientes con al menos tres réplicas por ensayo. *** $p < 0.001$ E2 vs V, * $p < 0.05$ E2+G36 vs V, *** $p < 0.001$ G1 vs V y *** $p < 0.001$ G1 vs G1+G36. B) Adenohipófisis provenientes de ratas hembra SD fueron incubadas *ex vivo* con G36 (1 μ M) o con vehículo (Etanol, 1 μ M) durante 30 minutos y con estradiol (100 nM) o G1 (100 nM) solos o en combinación con G36 durante 15 minutos adicionales a 37°C. Al cabo de ese tiempo, se colectaron los medios y se midieron los niveles de PRL por RIA. ANOVA de un factor seguido del Test de Tukey, ** $p < 0.01$ E2 vs V, ** $p < 0.01$ G1 vs V, *** $p < 0.001$ E2 vs E2+G36 and *** $p < 0.001$ G1 vs G1+G36, (N=5).

CONCLUSIONES CAPITULO 4

- La OVX altera al expresión hipofisaria de los receptores clásicos y no clásicos de estrógenos predisponiendo a la glándula a un entorno proliferativo.
- GPER se expresa en lactotrofos, se localiza principalmente en la membrana plasmática, pero también en el retículo endoplasmático rugoso y escasamente en el citosol.
- Su expresión hipofisaria se encuentra regulada por E2 y P4; motivo por el cual la misma varía durante las diferentes etapas del ciclo estral, y aumenta significativamente luego de la depleción de los esteroides ováricos posterior a una OVX

- El aumento significativo de GPER observado en hipófisis de hembras OVX es específico de la población lactotropa
- La activación específica de GPER induce una rápida secreción de PRL, tanto en la línea celular GH3 *in vitro* como en explantes hipofisarios *ex vivo*.
- El significativo incremento observado en la expresión hipofisaria de ER α y GPER luego de una OVX podrían explicar al menos en parte, el mayor desarrollo tumoral observado en hembras OVX respecto a hembras intactas frente a un tratamiento crónico con DES.

DISCUSION DEL CAPITULO 4

La correlación entre la incrementada expresión de ERs y el desarrollo tumoral hipofisario es tópico de investigación considerable. Ciertos autores han encontrado una elevada expresión de ER α en macroadenomas y tumores invasivos en comparación con microadenomas y tumores no invasivos (Manoranjan et al., 2010; Zhou et al., 2011). Sin embargo, bajos niveles de expresión de ER α en prolactinomas también se ha relacionado con mayor grado tumoral, resistencia al tratamiento y peor prognosis (Delgrange et al., 2015). Más aún, es importante destacar que la alteración del ratio entre ER α y ER β representa un paso crítico en la progresión tumoral dependiente de estrógenos en diferentes tejidos (Roger et al., 2001; Shaaban et al., 2003).

Como mencionamos anteriormente, las acciones contradictorias de los estrógenos encontradas en la bibliografía muy probablemente dependan de varios factores como: (i) la duración del estímulo, (ii) el tipo de receptor de estrógenos involucrado y (iii) la localización subcelular del receptor. Por lo tanto, cobra particular interés el estudio de los diferentes tipos de receptores de estrógenos en la glándula hipofisaria, y particularmente en la población lactotropa.

En mamíferos, GPER había sido identificado en cerebro e hipófisis de rata y ratón por inmunohistoquímica con anticuerpos específicos e hibridización *in situ* (Brailoiu et al., 2007; Hazell et al., 2009). Estos primeros estudios de GPER revelaron la localización tisular del receptor, pero no discriminaron su expresión entre los diferentes tipos

celulares hipofisarios. Un trabajo más reciente del 2013 en bovinos estudió la funcionalidad de GPER en gonadotropos. Los autores de este trabajo demuestran que el 50% de las células GPER positivas expresan LH, sugiriendo que el 50% restante correspondería a otros tipos celulares hipofisarios. Nuestros estudios histológicos concuerdan con estos antecedentes previos. Identificamos a GPER en gonadotropos, lactotropos y somatotropos por inmunocitoquímica y demostramos por citometría de flujo que alrededor del 40% de las células GPER positivas corresponden a lactotropos (PRL+).

Profundizando los estudios, logramos precisar la ubicación intracelular de GPER en lactotropos por microscopía electrónica. Mediante esta técnica localizamos a GPER principalmente en la membrana plasmática evidenciado por la presencia de partículas de oro asociadas a la cara interna del plasmalema, consistente con estudios previos que muestran al receptor en la membrana plasmática de otros tipos celulares. También observamos marca del receptor en el citoplasma de los lactotropos. De acuerdo con nuestros resultados, uno estudio en la revista *Science* del 2005 (Revankar et al., 2005) describe a GPER como un receptor con localización intracelular, asociado al Aparato de Golgi y el Retículo endoplasmático en varias líneas celulares tumorales. Esta localización intracelular de GPER tendría un rol específico en la movilización de los depósitos de calcio y en la síntesis de 3,4,5 fosfatidilinositol trifosfato en el núcleo estimulada por estradiol. Por tal motivo, GPER fue postulado a la vez como un receptor de membrana plasmática y un receptor intracelular de estrógenos.

La significancia biológica de los altos niveles de expresión de GPER en lactotropos sugería un rol para este receptor en esta población celular. Trabajos previos habían demostrado que GPER estaría involucrado en la secreción de prolactina: *i-* inducido por xenoestrógenos en la línea celular GH3, o *ii-* por un efecto indirecto a través de por la activación de GPER en el hipotálamo. Esto último resulta particularmente importante teniendo en cuenta que GPER se expresa en los núcleos hipotalámicos paraventricular y supraóptico en ratas (Brailoiu et al., 2007). En concordancia se ha descrito que el agonista de GPER (G1) administrado *in vivo* en el tercer ventrículo produce un pico de PRL similar en amplitud al observado en respuesta al E2 (Lebesgue, Reyna-Neyra, Huang, & Etgen, 2009). A luz de los antecedentes mencionados sería interesante profundizar el

estudio de la influencia hipotalámica de los efectos de E2 mediados por GPER en la regulación neuroendocrina del pico de PRL durante la tarde del proestro. Este mecanismo es complejo y pobremente comprendido; y parecería ser consecuencia de un efecto indirecto a nivel hipotalámico en lugar de un efecto rápido, directo del estradiol en la población lactotropa (Szawka, Rodovalho, Helena, Franci, & Anselmo-Franci, 2007).

El rol específico de GPER sobre los lactotrofos era desconocido. Nuestros presentes resultados demuestran que la activación de GPER induce un aumento rápido de los niveles de PRL tanto *in vitro* (en la línea celular GH3) como *ex vivo* (en explantes hipofisarios de ratas hembra). Este efecto logró ser contrarrestado cuando preincubamos las células y los explantes con el antagonista de GPER G36. En su conjunto, estos resultados proveen la primera evidencia de un rol específico para GPER en la población lactotropa.

Demostramos también que la expresión hipofisaria de *Gper* se encontraba bajo una regulación negativa de estradiol y progesterona; y que, por ese motivo se modificaba durante el ciclo estral. Además, y como consecuencia de la regulación negativa ejercida por los esteroides ováricos, observamos que la expresión hipofisaria de GPER (ARNm y proteína) se veía significativamente incrementada luego de la OVX. De acuerdo a nuestros estudios de doble inmunomarcación (GPER, PRL) y posterior análisis por citometría flujo, el aumento de la expresión de GPER luego de la OVX se debía a un efecto específico sobre la población lactotropa. Tanto la proporción de células GPER positivas totales como la de lactotrofos GPER positivas incrementaron en ratas OVX (vs. Control), pero no se observó incremento en la proporción de células GPER positivas no-lactotropas, ni tampoco una variación en la proporción de lactotrofos entre ambos grupos experimentales.

En la glándula hipofisaria de roedores existen tres subtipos de lactotrofos definidos morfológicamente por microscopía electrónica (De Paul et al., 1997; Torres & Aoki, 1985). Nuestros resultados muestran que GPER se expresa fundamentalmente en lactotrofos del subtipo I en la hipófisis de ratas hembra cicladas en diestro al momento

del sacrificio. Esto es razonable considerando que en la rata hembra adulta, el subtipo I representa alrededor de un 90% del total de los lactotropos, y los subtipos I y II menos de un 10% (Kurosumi, Tanaka, & Tosaka, 1987). Sin embargo, la situación cambia al evaluar por microscopía electrónica hipófisis de ratas OVX, ya que en este modelo, el 35% de los lactotropos son del subtipo I, un 30% son del subtipo II y un 36% corresponden al subtipo III (De Paul et al., 1997). De hecho, identificamos a GPER en la membrana plasmática de los tres subtipos de lactotropos en ratas OVX. Estos resultados podrían explicar el aumento específico de GPER en lactotropos en las ratas OVX, y más aún, demuestran que los tres subtipos de lactotropos podrían ser potenciales blancos de la activación de GPER por sus ligandos estimulando la secreción de PRL en las ratas OVX.

Teniendo en cuenta que el estradiol es capaz de inducir tanto *in vitro* como *ex vivo* un efecto rápido estimulador en la secreción de PRL mediado por GPER, y que la expresión de este receptor aumenta muy significativamente en los lactotropos luego de una OVX, estos resultados deberían ser considerados en cuanto a:

- ✓ El uso de OVX como un modelo experimental ampliamente utilizado para estudios endocrinos
- ✓ En la respuesta de la glándula ante una eventual terapia de reemplazo estrogénico luego de una OVX.

La terapia de reemplazo estrogénico es comúnmente sugerida en mujeres luego de una ooforectomía profiláctica en pos de prevenir los posibles efectos negativos de la pérdida de producción hormonal (Erekson, Martin, & Ratner, 2013; Shoupe et al., 2007; Watson et al., 2008). Dado que en estos pacientes la mayor preocupación tiene que ver con el riesgo de desarrollar cáncer, el impacto de la ooforectomía, con o sin terapia de reemplazo hormonal, en la función hipofisaria es usualmente ignorado.

Si bien no hemos incluido en nuestro trabajo la participación de GPER en la proliferación de los lactotropos, otros estudios realizados en diversas líneas celulares de cáncer y tumores de mama, endometrio, ovario, tiroides y próstata entre otros sugieren

que los altos niveles de expresión de GPER correlacionan con el crecimiento tumoral y una peor supervivencia. Además ha sido reportado que la estimulación de GPER con compuestos estrogénicos tales como atrazina, bisfenol A o tamoxifeno activan la proliferación celular (Barton et al., 2018).

En vista de estos antecedentes y a luz de nuestros resultados, sería interesante investigar el rol de GPER en los efectos proliferativos de los estrógenos en la población lactotropa en condiciones fisiológicas y patológicas; como así también la significancia de los altos niveles de expresión de GPER encontrados en lactotropos luego de una ovariectomía.

DISCUSIÓN GENERAL

DISCUSION GENERAL

El rol de la progesterona en la función normal y patológica del lactotrofo es controversial, encontrándose en la literatura resultados de los más diversos que avalan desde efectos protectores a participativos en la formación del tumor. Esta controversia, está íntimamente relacionada a los entornos hormonales que acompañan el microambiente tumoral en los diferentes modelos animales y al tipo de receptor de progesterona involucrado en las acciones de la misma. Es así como la respuesta a progesterona quedará determinada por un balance entre los efectos biológicos mediados por los receptores clásicos, nucleares de PR (nPR) y los efectos rápidos, no genómicos, mediados por los receptores de progesterona de membrana (mPRs).

En el presente trabajo, describimos la expresión de los mPRs y de Pgrmc1 (componente que facilitaría la acción de P4 a través del mPR α), en las células adenohipofisarias. Demostramos que mPR α es el subtipo más abundante en hipófisis de rata y ratón. En particular, hemos identificado a mPR α en tres tipos celulares hipofisarios bien diferenciados: gonadotropos, somatotropos y lactotropos.

La expresión de mPR α en gonadotropos podría estar relacionada a los efectos inhibitorios de la progesterona en la secreción y liberación de LH previamente reportados incluso en ratones PRKO (Sleiter et al., 2009). Por otro lado, su localización en somatotropos resulta de gran interés, dado que se desconoce aún la función de los mismos en dichas células. Asimismo, la alta expresión de mPR α en lactotropos (alrededor de un 60% de las células mPR α + son también PRL+) sugiere la participación de este receptor en la función de la población lactotropa.

Durante muchos años se creyó, a partir de los primeros trabajos reportados en el tema que la progesterona regulaba indirectamente la secreción de PRL actuando a nivel hipotalámico, (L A Arbogast & Voogt, 1993; Lydia A. Arbogast & Voogt, 1994; Gerardo G. Piroli et al., 1996) ya que en hipófisis de rata solo los gonadotropos (y no así

los lactotropos), expresan nPRs (Fox et al., 1990). Sin embargo, casi una década después, otros autores describen la expresión de ambas isoformas del nPR en lactotropos de ratón (Turgeon & Waring, 2000).

Los presentes hallazgos, demuestran que los mPRs se expresan en lactotropos de rata y de ratón, quedando en evidencia que la progesterona puede ejercer efectos directos sobre el lactotrofo sumados a los efectos indirectos (hipotalámicos) complejizando aún más la red regulatoria.

Mediante una batería de ensayos funcionales demostramos que la activación selectiva de los mPRs inhibe la secreción de PRL por inhibición directa sobre el lactotrofo, y también por acción indirecta actuando sobre el hipotálamo, tejido con una muy alta proporción de mPRs, induciendo liberación de dopamina.

Específicamente comprobamos mediante ensayos *in vitro* (células GH3), *ex vivo* (explantes hipofisarios de rata y ratón), y tratamiento *in vivo* en ratones con prolactinoma con que un tratamiento con progesterona o con el agonista específico de mPR Org OD 02-0, induce un claro efecto inhibitorio directo en la secreción de PRL.

Describimos por primera vez una alta proporción de mPRs en hipotálamo (80%). La activación selectiva de mPRs hipotalámicos provocó un incremento en los niveles de DA liberados, evidenciando de esta forma un mecanismo indirecto adicional que contribuye a la inhibición de PRL.

Como mencionamos anteriormente, la función de la progesterona en el desarrollo de un prolactinoma es controversial en la bibliografía, habiéndose asignado tanto efectos permisivos como protectores de la progesterona en tumores experimentales en ratas tratadas crónicamente con estrógenos. Nuestros resultados demuestran que un tratamiento con progesterona solo es capaz de contrarrestar los

efectos estrogénicos, (disminuyendo peso hipofisario y prolactinemia elevada) en ratas previamente ovariectomizadas y no así en ratas enteras. Proponemos que esto es debido a que, como demostramos en el presente trabajo, la ovariectomía altera la proporción de *mPRs* en hipófisis, incrementando no sólo la expresión de *mPRs*, sino la proporción de los mismos respecto al total de receptores de progesterona hipofisarios. Esta mayor expresión de *mPRs* en hipófisis de hembras OVX, podría contribuir a un mayor efecto inhibitorio de la progesterona sobre los lactotropos, explicando la diferente respuesta (a P4) observada entre ratas estrogenizadas enteras (DES-P4) y ratas estrogenizadas, previamente OVX (OVX-DES-P4). Nuestros resultados contribuyen a clarificar las contradicciones de la bibliografía acerca del rol de la progesterona en la función de la población lactotropa y destacan la importancia del modelo experimental utilizado.

Continuamos la caracterización de los *mPRs* en un modelo *in vitro* (células GH3) y en tres modelos animales de prolactinoma (ratas DES, ratones transgénicos hCG β + y ratones *Drd2KO*). Un hallazgo significativo fue que la expresión de todos los tipos de receptores de progesterona se encontró disminuida en los tres modelos experimentales. Sin embargo, la disminución más pronunciada se observó en los *nPRs*, por lo cual la abundancia relativa de los *mPRs* (*mPRs/PRs* totales) se encontró significativamente aumentada en hipófisis ratones *Drd2KO*. De hecho, un tratamiento con Org OD 02-0 logró reducir los elevados niveles de secreción de PRL en explantes hipofisarios incubados *ex vivo* de ratones WT y *Drd2KO*, y en un tratamiento *in vivo* realizado en hembras *Drd2KO* (prolactinoma). Estos resultados nos alientan a seguir investigando la potencialidad de Org OD 02-0 como un tratamiento novel para pacientes con prolactinomas resistentes a las terapias convencionales con agonistas dopaminérgicos.

Cabe destacar aquí la diferencia sexual encontrada en el modelo de ratones *Drd2KO*. Como describimos anteriormente, si bien ambos sexos carecen de receptores dopaminérgicos tipo 2, es decir, carecen de inhibición dopaminérgica sobre el lactotrofo, sólo las hembras desarrollan prolactinoma a lo largo de su vida. La mayor incidencia de prolactinomas en hembras ha sido observada no sólo en diversos modelos

animales, sino también en el humano durante la edad fértil (ver revisión en (M.V. Recouvreux et al., 2018))

En el presente trabajo demostramos que la expresión de *mPRs* es significativamente mayor en hipófisis de machos respecto a hembras.

Es sabido que, además la síntesis en ovarios y placenta en las hembras, la progesterona también es sintetizada por las glándulas suprarrenales y por el sistema nervioso en ambos sexos. Como hemos demostrado que la activación de *mPR α / β* conduce a la inhibición de la secreción de prolactina, la mayor expresión de *mPRs*, representando cerca del 80% del total de receptores de progesterona hipofisarios en machos, podría estar protegiendo a este sexo del desarrollo de prolactinoma, hecho que merece un estudio más profundo en un futuro próximo.

Finalmente, otro de los resultados destacados del presente trabajo es aquel relacionado con la descripción de un mecanismo novel de señalización utilizado por los *mPRs* en la inhibición de PRL: la activación de TGF β 1 hipofisario, siendo TGF β 1, un inhibidor potente de la función del lactotrofo. Ambos, P4 y Org OD 02-0 incrementaron significativamente los niveles de la citoquina activa *in vitro* (células GH3) y *ex vivo* (explantes de prolactinomas de ratón) a tiempos cortos de tratamiento, con una concomitante reducción de los niveles de PRL secretados.

En forma conjunta, nuestros hallazgos demuestran claramente que la activación de *mPR α / β* inhibe la secreción de prolactina por acción directa sobre la población de lactotrofos y por acción indirecta aumentando la secreción de dopamina en el hipotálamo.

Teniendo en cuenta que alrededor del 20% de los pacientes con prolactinomas son resistentes a los tratamientos actuales con fármacos dopaminérgicos, y hasta el día de hoy no existen tratamientos alternativos, nuestros resultados actuales posicionan el Org OD 02-0, como una herramienta farmacológica putativa para el tratamiento del prolactinomas resistentes.

Otro hallazgo interesante de esta tesis es la descripción de una función novel en un efecto rápido en la secreción de prolactina mediado por el receptor de estrógenos acoplado a proteína G, GPER, en lactotrofos. Describimos la localización subcelular del receptor en membrana plasmática y retículo endoplasmático de las células lactotropas de rata. Encontramos una regulación negativa de la expresión de GPER por estradiol y también progesterona, y una alteración durante los estadios fisiológicos del ciclo estral. Acorde a estos resultados la expresión de GPER se vio alterada frente a una ovariectomía en hipófisis, específicamente en los lactotrofos.

En la actualidad, miles de mujeres con riesgo de padecer cáncer de útero u ovario son sometidas a cirugías profilácticas tales como la ooforectomía o histerectomía. Para evitar los efectos no deseados de la deprivación hormonal, la terapia de reemplazo hormonal es normalmente sugerida. En estas pacientes, los efectos de extirpación de ovarios en la función hipofisaria son usualmente ignorados. Si bien nuestros resultados son preliminares, creemos que es importante resaltar el impacto de la OVX en la función de la población lactotropa. Asimismo, cabe preguntarse si la elección del modelo animal OVX es realmente un buen control para estudios endocrinos con el fin de reducir los niveles endógenos de esteroides ováricos, dadas las alteraciones halladas en dicho modelo, en la expresión de receptores clásicos y no clásicos de estrógenos y progesterona, dos hormonas fundamentales en la fisiología y patología reproductiva.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Ahtiainen, P., Sharp, V., Rulli, S. B., Rivero-Muller, A., Mamaeva, V., Roytta, M., & Huhtaniemi, I. (2010). Enhanced LH action in transgenic female mice expressing hCGbeta-subunit induces pituitary prolactinomas; the role of high progesterone levels. *Endocrine-Related Cancer*, *17*(3), 611–621. <https://doi.org/10.1677/ERC-10-0016>
- Aizen, J., Pang, Y., Harris, C., Converse, A., Zhu, Y., Aguirre, M. A., & Thomas, P. (2018). Roles of progesterone receptor membrane component 1 and membrane progesterin receptor alpha in regulation of zebrafish oocyte maturation. *General and Comparative Endocrinology*, *263*, 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2018.04.009>
- Akmayev, I. G., & Popov, A. P. (1977). Morphological aspects of the hypothalamic-hypophyseal system. VII. The tanycytes: Their relation to the hypophyseal adrenocorticotrophic function. An ultrastructural study. *Cell and Tissue Research*, *180*(2), 263–282.
- Albiero, C., Juarez-Allen, L., Longobardi, V., Danilowicz, K., Manavela, M. P., & Bruno, O. D. (2010). [Analysis of a pituitary adenoma registry]. *Medicina*, *70*(5), 415–420.
- Annes, J. P., Munger, J. S., & Rifkin, D. B. (2003). Making sense of latent TGFbeta activation. *Journal of Cell Science*, *116*(Pt 2), 217–224.
- Arafah, B. M., & Nasrallah, M. P. (2001). Pituitary tumors: pathophysiology, clinical manifestations and management. *Endocrine-Related Cancer*, *8*(4), 287–305.
- Arbogast, L. A., & Ben-Jonathan, N. (1990). The preovulatory prolactin surge is prolonged by a progesterone-dependent dopaminergic mechanism. *Endocrinology*, *126*(1), 246–252. <https://doi.org/10.1210/endo-126-1-246>
- Arbogast, L. A., & Hyde, J. F. (2000). Estradiol attenuates the forskolin-induced increase in hypothalamic tyrosine hydroxylase activity. *Neuroendocrinology*, *71*(4), 219–227. <https://doi.org/10.1159/000054539>
- Arbogast, L. A., & Voogt, J. L. (1993). Progesterone reverses the estradiol-induced decrease in tyrosine hydroxylase mRNA levels in the arcuate nucleus. *Neuroendocrinology*, *58*(5), 501–510. <https://doi.org/10.1159/000126583>
- Arbogast, L. A., & Voogt, J. L. (1994). Progesterone suppresses tyrosine hydroxylase messenger ribonucleic acid levels in the arcuate nucleus on proestrus. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/endo.135.1.7912184>
- Arbogast, L. A., & Voogt, J. L. (2002). Progesterone induces dephosphorylation and inactivation of tyrosine hydroxylase in rat hypothalamic dopaminergic neurons. *Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1159/000057336>
- Areia, A., Vale-Pereira, S., Alves, V., Rodrigues-Santos, P., Santos-Rosa, M., Moura, P., & Mota-Pinto, A. (2016). Can membrane progesterone receptor alpha on T regulatory cells explain the ensuing human labour? *Journal of Reproductive Immunology*, *113*, 22–26. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2015.10.002>
- Asa, S. L., Kelly, M. A., Grandy, D. K., & Low, M. J. (1999). Pituitary lactotroph adenomas develop after prolonged lactotroph hyperplasia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Endocrinology*, *140*(11), 5348–5355. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7118>
- Ashley, R. L., Arreguin-Arevalo, J. A., & Nett, T. M. (2009). Binding characteristics of the ovine membrane progesterone receptor alpha and expression of the receptor during the estrous cycle. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, *7*, 42. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-7-42>
- Bancroft, F. C., & Tashjian, A. H. J. (1970). Control of the production of two protein hormones by rat pituitary cells in culture. *In Vitro*, *6*(3), 180–189.

- Banerjee, S. K., De, A., & Sarkar, D. K. (1994). Colocalization of prolactin and proliferating cell nuclear antigen in the anterior pituitary during estrogen-induced pituitary tumors. *Cancer Letters*, *87*(2), 139–144.
- Banerjee, S. K., Sarkar, D. K., Weston, A. P., De, A., & Campbell, D. R. (1997). Over expression of vascular endothelial growth factor and its receptor during the development of estrogen-induced rat pituitary tumors may mediate estrogen-initiated tumor angiogenesis. *Carcinogenesis*, *18*(6), 1155–1161.
- Barton, M., Filardo, E. J., Lolait, S. J., Thomas, P., Maggiolini, M., & Prossnitz, E. R. (2018). Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.03.021>
- Becker, K. A., Lu, S., Dickinson, E. S., Dunphy, K. A., Mathews, L., Schneider, S. S., & Jerry, D. J. (2005). Estrogen and progesterone regulate radiation-induced p53 activity in mammary epithelium through TGF-beta-dependent pathways. *Oncogene*, *24*(42), 6345–6353. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208787>
- Bedaiwy, M. A., Dahoud, W., Skomorovska-Prokvolit, Y., Yi, L., Liu, J. H., Falcone, T., ... Mesiano, S. (2015). Abundance and Localization of Progesterone Receptor Isoforms in Endometrium in Women With and Without Endometriosis and in Peritoneal and Ovarian Endometriotic Implants. *Reproductive Sciences (Thousand Oaks, Calif.)*, *22*(9), 1153–1161. <https://doi.org/10.1177/1933719115585145>
- Ben-Jonathan, N., & Hnasko, R. (2001). Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocrine Reviews*. <https://doi.org/10.1210/edrv.22.6.0451>
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., & LaPensee, E. W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocrine Reviews*, *29*(1), 1–41. <https://doi.org/10.1210/er.2007-0017>
- Berg, M. N., Dharmarajan, A. M., & Waddell, B. J. (2002). Glucocorticoids and progesterone prevent apoptosis in the lactating rat mammary gland. *Endocrinology*, *143*(1), 222–227. <https://doi.org/10.1210/endo.143.1.8584>
- Blum, M., McEwen, B. S., & Roberts, J. L. (1987). Transcriptional analysis of tyrosine hydroxylase gene expression in the tuberoinfundibular dopaminergic neurons of the rat arcuate nucleus after estrogen treatment. *The Journal of Biological Chemistry*, *262*(2), 817–821.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N., & Kelly, P. A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, *19*(3), 225–268. <https://doi.org/10.1210/edrv.19.3.0334>
- Bologa, C. G., Revankar, C. M., Young, S. M., Edwards, B. S., Arterburn, J. B., Kiselyov, A. S., ... Prossnitz, E. R. (2006). Virtual and biomolecular screening converge on a selective agonist for GPR30. *Nature Chemical Biology*, *2*(4), 207–212. <https://doi.org/10.1038/nchembio775>
- Borrelli, E., Sawchenko, P. E., & Evans, R. M. (1992). Pituitary hyperplasia induced by ectopic expression of nerve growth factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *89*(7), 2764–2768.
- Brailoiu, E., Dun, S. L., Brailoiu, G. C., Mizuo, K., Sklar, L. A., Oprea, T. I., ... Dun, N. J. (2007). Distribution and characterization of estrogen receptor G protein-coupled receptor 30 in the rat central nervous system. *The Journal of Endocrinology*, *193*(2), 311–321. <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0017>
- Brann, D. W., Rao, I. M., & Mahesh, V. B. (1988). Antagonism of estrogen-induced prolactin release by progesterone. *Biology of Reproduction*, *39*(5), 1067–1073.
- Brown, R. S. E., Piet, R., Herbison, A. E., & Grattan, D. R. (2012). Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology*, *153*(5), 2375–2384. <https://doi.org/10.1210/en.2011-2005>
- Byrns, M. C. (2014). Regulation of progesterone signaling during pregnancy: implications for the use of progestins for the prevention of preterm birth. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *139*, 173–181. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.01.015>

- Cai, A., Hayes, J. D., Patel, N., & Hyde, J. F. (1999). Targeted overexpression of galanin in lactotrophs of transgenic mice induces hyperprolactinemia and pituitary hyperplasia. *Endocrinology*, *140*(11), 4955–4964. <https://doi.org/10.1210/endo.140.11.7120>
- Camilletti, M. A., Ferraris, J., Abeledo-Machado, A., Converse, A., Faraoni, E. Y., Pisera, D., ... Díaz-Torga, G. (2018). Participation of membrane progesterone receptor α in the inhibitory effect of progesterone on prolactin secretion. *Journal of Neuroendocrinology*, *30*(9). <https://doi.org/10.1111/jne.12614>
- Candolfi, M., Jaita, G., Zaldivar, V., Zarate, S., Ferrari, L., Pisera, D., ... Seilicovich, A. (2005). Progesterone antagonizes the permissive action of estradiol on tumor necrosis factor-alpha-induced apoptosis of anterior pituitary cells. *Endocrinology*, *146*(2), 736–743. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1276>
- Castelnovo, L. F., Magnaghi, V., & Thomas, P. (2017). Expression of membrane progesterone receptors (mPRs) in rat peripheral glial cell membranes and their potential role in the modulation of cell migration and protein expression. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.09.009>
- Catalano, P. N., Di Giorgio, N., Bonaventura, M. M., Bettler, B., Libertun, C., & Lux-Lantos, V. A. (2010). Lack of functional GABA(B) receptors alters GnRH physiology and sexual dimorphic expression of GnRH and GAD-67 in the brain. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *298*(3), E683-96. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00532.2009>
- Charles, N. J., Thomas, P., & Lange, C. A. (2010). Expression of membrane progesterone receptors (mPR/PAQR) in ovarian cancer cells: implications for progesterone-induced signaling events. *Hormones & Cancer*, *1*(4), 167–176. <https://doi.org/10.1007/s12672-010-0023-9>
- Christian, H. C., Chapman, L. P., & Morris, J. F. (2007). Thyrotrophin-releasing hormone, vasoactive intestinal peptide, prolactin-releasing peptide and dopamine regulation of prolactin secretion by different lactotroph morphological subtypes in the rat. *Journal of Neuroendocrinology*, *19*(8), 605–613. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01567.x>
- Colao, A., Sarno, A. Di, Cappabianca, P., Briganti, F., Pivonello, R., Somma, C. Di, ... Lombardi, G. (2003). Gender differences in the prevalence, clinical features and response to cabergoline in hyperprolactinemia. *European Journal of Endocrinology*, *148*(3), 325–331.
- Cramer, O. M., Parker, C. R. J., & Porter, J. C. (1979a). Estrogen inhibition of dopamine release into hypophysial portal blood. *Endocrinology*, *104*(2), 419–422. <https://doi.org/10.1210/endo-104-2-419>
- Cramer, O. M., Parker, C. R. J., & Porter, J. C. (1979b). Stimulation of dopamine release into hypophysial portal blood by administration of progesterone. *Endocrinology*, *105*(4), 929–933. <https://doi.org/10.1210/endo-105-4-929>
- De Francesco, E. M., Rocca, C., Scavello, F., Amelio, D., Pasqua, T., Rigracciolo, D. C., ... Angelone, T. (2017). Protective Role of GPER Agonist G-1 on Cardiotoxicity Induced by Doxorubicin. *Journal of Cellular Physiology*, *232*(7), 1640–1649. <https://doi.org/10.1002/jcp.25585>
- De Lean, A., & Labrie, F. (1977). Sensitizing effect of treatment with estrogens on TSH response to TRH in male rats. *The American Journal of Physiology*, *233*(3), E235-9. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.1977.233.3.E235>
- De Nicola, A. F., Coronel, F., Garay, L. I., Gargiulo-Monachelli, G., Gonzalez Deniselle, M. C., Gonzalez, S. L., ... Schumacher, M. (2013). Therapeutic effects of progesterone in animal models of neurological disorders. *CNS & Neurological Disorders Drug Targets*, *12*(8), 1205–1218.
- De Paul, A. L., Pons, P., Aoki, A., & Torres, A. I. (1997). Heterogeneity of pituitary lactotrophs: immunocytochemical identification of functional subtypes. *Acta Histochemica*, *99*(3), 277–289. [https://doi.org/10.1016/S0065-1281\(97\)80022-0](https://doi.org/10.1016/S0065-1281(97)80022-0)
- Delgrange, E., Vasiljevic, A., Wierinckx, A., Francois, P., Jouanneau, E., Raverot, G., & Trouillas, J. (2015). Expression of estrogen receptor alpha is associated with prolactin pituitary tumor prognosis and supports the sex-related difference in tumor growth. *European Journal of Endocrinology*, *172*(6), 791–801. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0990>

- DeMaria, J. E., Lerant, A. A., & Freeman, M. E. (1999). Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. *Brain Research*, 837(1–2), 236–241.
- DeMaria, J. E., Livingstone, J. D., & Freeman, M. E. (2000). Ovarian steroids influence the activity of neuroendocrine dopaminergic neurons. *Brain Research*, 879(1–2), 139–147.
- Denef, C. (2008). Paracrinicity: the story of 30 years of cellular pituitary crosstalk. *Journal of Neuroendocrinology*, 20(1), 1–70. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2007.01616.x>
- Dennis, M. K., Field, A. S., Burai, R., Ramesh, C., Petrie, W. K., Bologna, C. G., ... Prossnitz, E. R. (2011). Identification of a GPER/GPR30 antagonist with improved estrogen receptor counterselectivity. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(3–5), 358–366. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2011.07.002>
- Díaz-Torga, G., Feierstein, C., Libertun, C., Gelman, D., Kelly, M. A., Low, M. J., ... Becu-Villalobos, D. (2002). Disruption of the D2 dopamine receptor alters GH and IGF-I secretion and causes dwarfism in male mice. *Endocrinology*, 143(4), 1270–1279. <https://doi.org/10.1210/endo.143.4.8750>
- Díaz-Torga, G., Gonzalez Iglesias, A., Achaval-Zaia, R., Libertun, C., & Becu-Villalobos, D. (1998). Angiotensin II-induced Ca²⁺ mobilization and prolactin release in normal and hyperplastic pituitary cells. *The American Journal of Physiology*, 274(3 Pt 1), E534-40.
- Dressing, G. E., Alyea, R., Pang, Y., & Thomas, P. (2012). Membrane progesterone receptors (mPRs) mediate progestin induced antimorbidity in breast cancer cells and are expressed in human breast tumors. *Hormones and Cancer*. <https://doi.org/10.1007/s12672-012-0106-x>
- Dressing, G. E., Goldberg, J. E., Charles, N. J., Schwertfeger, K. L., & Lange, C. A. (2011). Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids*, 76(1–2), 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.09.006>
- Erekson, E. A., Martin, D. K., & Ratner, E. S. (2013). Oophorectomy: the debate between ovarian conservation and elective oophorectomy. *Menopause (New York, N.Y.)*, 20(1), 110–114. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31825a27ab>
- Ezzat, S., Wang, R., Pintilie, M., & Asa, S. L. (2017). FGFR4 polymorphic alleles modulate mitochondrial respiration: A novel target for somatostatin analog action in pituitary tumors. *Oncotarget*, 8(2), 3481–3494. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13843>
- Faraoni, E. Y., Camilletti, M. A., Abeledo-Machado, A., Ratner, L. D., de Fino, F., Ipo Huhtaniemi, I., ... Díaz-Torga, G. (2017). Sex differences in the development of prolactinoma in mice overexpressing hCGB: Role of TGFβ1. *Journal of Endocrinology*, 232(3). <https://doi.org/10.1530/JOE-16-0371>
- Ferland, L., Labrie, F., Euvrard, C., & Raynaud, J. P. (1979). Antidopaminergic activity of estrogens on prolactin release at the pituitary level in vivo. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 14(3), 199–204.
- Ferraris, J., Zarate, S., Jaita, G., Boutillon, F., Bernadet, M., Auffret, J., ... Pisera, D. (2014). Prolactin induces apoptosis of lactotropes in female rodents. *PLoS One*, 9(5), e97383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097383>
- Filardo, E. J. (2002). Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 80(2), 231–238.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Bland, K. I., & Frackelton, A. R. J. (2000). 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. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 14(10), 1649–1660. <https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0532>
- Fox, S. R., Harlan, R. E., Shivers, B. D., & Pfaff, D. W. (1990). Chemical characterization of neuroendocrine targets for progesterone in the female rat brain and pituitary. *Neuroendocrinology*, 51(3), 276–283. <https://doi.org/10.1159/000125350>
- Fredette, N. C., Meyer, M. R., & Prossnitz, E. R. (2018). Role of GPER in estrogen-dependent nitric oxide

- formation and vasodilation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 176, 65–72. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2017.05.006>
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., & Nagy, G. (2000). Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiological Reviews*, 80(4), 1523–1631. <https://doi.org/10.1152/physrev.2000.80.4.1523>
- Furigo, I. C., Kim, K. W., Nagaishi, V. S., Ramos-Lobo, A. M., de Alencar, A., Pedroso, J. A. B., ... Donato, J. J. (2014). Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor-alpha and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. *Brain Research*, 1566, 47–59. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2014.04.018>
- Gillam, M. P., Molitch, M. E., Lombardi, G., & Colao, A. (2006). Advances in the treatment of prolactinomas. *Endocrine Reviews*, 27(5), 485–534. <https://doi.org/10.1210/er.2005-9998>
- Goffin, V., Binart, N., Clement-Lacroix, P., Bouchard, B., Bole-Feysot, C., Edery, M., ... Kelly, P. A. (1999). From the molecular biology of prolactin and its receptor to the lessons learned from knockout mice models. *Genetic Analysis : Biomolecular Engineering*, 15(3–5), 189–201.
- Goyeneche, A. A., Deis, R. P., Gibori, G., & Telleria, C. M. (2003). Progesterone promotes survival of the rat corpus luteum in the absence of cognate receptors. *Biology of Reproduction*, 68(1), 151–158.
- Graham, J. D., & Clarke, C. L. (1997). Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 18(4), 502–519. <https://doi.org/10.1210/edrv.18.4.0308>
- Grattan, D. R. (2015). 60 YEARS OF NEUROENDOCRINOLOGY: The hypothalamo-prolactin axis. *The Journal of Endocrinology*, 226(2), T101-22. <https://doi.org/10.1530/JOE-15-0213>
- Gutierrez, S., De Paul, A. L., Petiti, J. P., del Valle Sosa, L., Palmeri, C. M., Soaje, M., ... Torres, A. I. (2008). Estradiol interacts with insulin through membrane receptors to induce an antimitogenic effect on lactotroph cells. *Steroids*, 73(5), 515–527. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2008.01.002>
- Gutierrez, S., Petiti, J. P., Sosa, L. d V, Fozzatti, L., De Paul, A. L., Masini-Repiso, A. M., & Torres, A. I. (2010). 17beta-oestradiol acts as a negative modulator of insulin-induced lactotroph cell proliferation through oestrogen receptor alpha, via nitric oxide/guanylyl cyclase/cGMP. *Cell Proliferation*, 43(5), 505–514. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2184.2010.00700.x>
- Gutierrez, S., Sosa, L. d V, Petiti, J. P., Mukdsi, J. H., Mascanfroni, I. D., Pellizas, C. G., ... Torres, A. I. (2012). 17beta-Estradiol stimulates the translocation of endogenous estrogen receptor alpha at the plasma membrane of normal anterior pituitary cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 355(1), 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2012.02.008>
- Haas, D. M., Hathaway, T. J., & Ramsey, P. S. (2018). Progesterone for preventing miscarriage in women with recurrent miscarriage of unclear etiology. *The Cochrane Database of Systematic Reviews*, 10, CD003511. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD003511.pub4>
- Hanna, R. N., & Zhu, Y. (2009). Expression of membrane progesterin receptors in zebrafish (*Danio rerio*) oocytes, testis and pituitary. *General and Comparative Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2008.10.006>
- Haug, E., & Gautvik, K. M. (1976). Effects of sex steroids on prolactin secreting rat pituitary cells in culture. *Endocrinology*, 99(6), 1482–1489. <https://doi.org/10.1210/endo-99-6-1482>
- Hazell, G. G. J., Yao, S. T., Roper, J. A., Prossnitz, E. R., O'Carroll, A.-M., & Lolait, S. J. (2009). Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. *The Journal of Endocrinology*, 202(2), 223–236. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0066>
- Heinzlmann, A., & Kovacs, K. (2008). The characteristic change in the distribution of S-100 immunoreactive folliculostellate cells in rat anterior pituitary upon long-term estrogen treatment is prevented by concomitant progesterone treatment. *Endocrine*, 33(3), 342–348. <https://doi.org/10.1007/s12020-008-9096-4>
- Heinzlmann, A., Kovacs, K., Kovacs, M., & Csernus, V. (2011). Sexual dimorphism in the effect of concomitant progesterone administration on changes caused by long-term estrogen treatment in

- pituitary hormone immunoreactivities of rats. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 17(3), BR62-73.
- Heinzlmann, A., Koves, K., & Nagy, G. M. (2010). Effect of concomitant progesterone administration or the effect of removal of estrogen capsule on changes caused by long-term estrogen treatment in pituitary VIP immunoreactivities. *Endocrine*, 37(3), 396–402. <https://doi.org/10.1007/s12020-010-9320-x>
- Hentges, S. T., & Low, M. J. (2002). Ovarian dependence for pituitary tumorigenesis in D2 dopamine receptor-deficient mice. *Endocrinology*, 143(12), 4536–4543. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220421>
- Hoffman, G. E., Merchenthaler, I., & Zup, S. L. (2006). Neuroprotection by ovarian hormones in animal models of neurological disease. *Endocrine*, 29(2), 217–231. <https://doi.org/10.1385/ENDO:29:2:217>
- Horvath, E., & Kovacs, K. (2002). Folliculo-stellate cells of the human pituitary: a type of adult stem cell? *Ultrastructural Pathology*, 26(4), 219–228. <https://doi.org/10.1080/01913120290104476>
- Huang, S. W., Tsai, S. C., Tung, Y. F., & Wang, P. S. (1995). Role of progesterone in regulating the effect of estradiol on the secretion of thyrotropin-releasing hormone and dopamine into hypophysial portal blood in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 61(5), 536–541. <https://doi.org/10.1159/000126877>
- Inoue, K., Couch, E. F., Takano, K., & Ogawa, S. (1999). The structure and function of folliculo-stellate cells in the anterior pituitary gland. *Archives of Histology and Cytology*, 62(3), 205–218.
- Intlekofer, K. A., & Petersen, S. L. (2011). Distribution of mRNAs encoding classical progesterin receptor, progesterone membrane components 1 and 2, serpine mRNA binding protein 1, and progesterin and ADIPOQ receptor family members 7 and 8 in rat forebrain. *Neuroscience*. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.10.051>
- Itoh, F., Watabe, T., & Miyazono, K. (2014). Roles of TGF-beta family signals in the fate determination of pluripotent stem cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 32, 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.05.017>
- Jensik, P. J., & Arbogast, L. A. (2011). Differential and Interactive Effects of Ligand-Bound Progesterone Receptor A and B Isoforms on Tyrosine Hydroxylase Promoter Activity. *Journal of Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2011.02197.x>
- Kansra, S., Yamagata, S., Sneade, L., Foster, L., & Ben-Jonathan, N. (2005). Differential effects of estrogen receptor antagonists on pituitary lactotroph proliferation and prolactin release. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 239(1–2), 27–36. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2005.04.008>
- Kaprara, A., & Huhtaniemi, I. T. (2018). The hypothalamus-pituitary-gonad axis: Tales of mice and men. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 86, 3–17. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.11.018>
- Karteris, E., Zervou, S., Pang, Y., Dong, J., Hillhouse, E. W., Randevara, H. S., & Thomas, P. (2006). Progesterone signaling in human myometrium through two novel membrane G protein-coupled receptors: potential role in functional progesterone withdrawal at term. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, 20(7), 1519–1534. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0243>
- Kawashima, K., Yamakawa, K., Takahashi, W., Takizawa, S., Yin, P., Sugiyama, N., ... Arita, J. (2002). 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(7), 2750–2758. <https://doi.org/10.1210/endo.143.7.8915>
- Kazeto, Y., Goto-Kazeto, R., & Trant, J. M. (2005). Membrane-bound progesterin receptors in channel catfish and zebrafish ovary: changes in gene expression associated with the reproductive cycles and hormonal reagents. *General and Comparative Endocrinology*, 142(1–2), 204–211. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.01.017>
- Kelder, J., Azevedo, R., Pang, Y., de Vlieg, J., Dong, J., & Thomas, P. (2010). Comparison between steroid

- binding to membrane progesterone receptor α (mPR α) and to nuclear progesterone receptor: Correlation with physicochemical properties assessed by comparative molecular field analysis and identification of mPR α -specific agonists. *Steroids*. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2010.01.010>
- Kelly, M. A., Rubinstein, M., Asa, S. L., Zhang, G., Saez, C., Bunzow, J. R., ... Low, M. J. (1997). Pituitary lactotroph hyperplasia and chronic hyperprolactinemia in dopamine D2 receptor-deficient mice. *Neuron*, *19*(1), 103–113.
- Kelly, M. J., & Levin, E. R. (2001). Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, *12*(4), 152–156.
- Kim, J. J., Kurita, T., & Bulun, S. E. (2013). Progesterone action in endometrial cancer, endometriosis, uterine fibroids, and breast cancer. *Endocrine Reviews*, *34*(1), 130–162. <https://doi.org/10.1210/er.2012-1043>
- Kim, M. R., Park, D. W., Lee, J. H., Choi, D. S., Hwang, K. J., Ryu, H. S., & Min, C. K. (2005). Progesterone-dependent release of transforming growth factor- β 1 from epithelial cells enhances the endometrial decidualization by turning on the Smad signalling in stromal cells. *Molecular Human Reproduction*, *11*(11), 801–808. <https://doi.org/10.1093/molehr/gah240>
- Kontogeorgos, G. (2005). Classification and pathology of pituitary tumors. *Endocrine*, *28*(1), 27–35. <https://doi.org/10.1385/ENDO:28:1:027>
- Kovacs, K., Horvath, E., & Vidal, S. (2001). Classification of pituitary adenomas. *Journal of Neuro-Oncology*, *54*(2), 121–127.
- Kukstas, L. A., Verrier, D., Zhang, J., Chen, C., Israel, J. M., & Vincent, J. D. (1990). Evidence for a relationship between lactotroph heterogeneity and physiological context. *Neuroscience Letters*, *120*(1), 84–86.
- Kunzmann, S., Ottensmeier, B., Speer, C. P., & Fehrholz, M. (2018). Effect of progesterone on Smad signaling and TGF- β /Smad-regulated genes in lung epithelial cells. *PLoS One*, *13*(7), e0200661. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0200661>
- Kurosumi, K., Tanaka, S., & Tosaka, H. (1987). Changing ultrastructures in the estrous cycle and postnatal development of prolactin cells in the rat anterior pituitary as studied by immunogold electron microscopy. *Archivum Histologicum Japonicum = Nihon Soshikigaku Kiroku*, *50*(4), 455–478.
- Lamb, C. A., Fabris, V. T., Jacobsen, B., Molinolo, A. A., & Lanari, C. (2018). Biological and clinical impact of imbalanced progesterone receptor isoform ratios in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer*. <https://doi.org/10.1530/ERC-18-0179>
- Lebesgue, D., Reyna-Neyra, A., Huang, X., & Etgen, A. M. (2009). GPR30 differentially regulates short latency responses of luteinising hormone and prolactin secretion to oestradiol. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(9), 743–752. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01893.x>
- Lerant, A., & Freeman, M. E. (1998). Ovarian steroids differentially regulate the expression of PRL-R in neuroendocrine dopaminergic neuron populations: a double label confocal microscopic study. *Brain Research*, *802*(1–2), 141–154.
- Levin, E. R., & Hammes, S. R. (2016). Nuclear receptors outside the nucleus: extranuclear signalling by steroid receptors. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *17*(12), 783–797. <https://doi.org/10.1038/nrm.2016.122>
- Li, H., Venkatraman, L., Narmada, B. C., White, J. K., Yu, H., & Tucker-Kellogg, L. (2017). Computational analysis reveals the coupling between bistability and the sign of a feedback loop in a TGF- β 1 activation model. *BMC Systems Biology*, *11*(Suppl 7), 136. <https://doi.org/10.1186/s12918-017-0508-z>
- Lieberman, M. E., Maurer, R. A., Claude, P., Wiklund, J., Wertz, N., & Gorski, J. (1981). Regulation of pituitary growth and prolactin gene expression by estrogen. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, *138*, 151–163.
- Liu, B., & Arbogast, L. A. (2010). Progesterone decreases tyrosine hydroxylase phosphorylation state and increases protein phosphatase 2A activity in the stalk-median eminence on proestrous afternoon.

- Journal of Endocrinology*. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0335>
- Lu, J., Reese, J., Zhou, Y., & Hirsch, E. (2015). Progesterone-induced activation of membrane-bound progesterone receptors in murine macrophage cells. *The Journal of Endocrinology*, *224*(2), 183–194. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0470>
- Luo, X.-H., Liao, E.-Y., & Su, X. (2002). Progesterone upregulates TGF- β isoforms (β 1, β 2, and β 3) expression in normal human osteoblast-like cells. *Calcified Tissue International*, *71*(4), 329–334. <https://doi.org/10.1007/s00223-001-2129-0>
- Lyons, D. J., Hellysaz, A., & Broberger, C. (2012). Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, *32*(23), 8074–8083. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0129-12.2012>
- Maggiolini, M., & Picard, D. (2010). The unfolding stories of GPR30, a new membrane-bound estrogen receptor. *The Journal of Endocrinology*, *204*(2), 105–114. <https://doi.org/10.1677/JOE-09-0242>
- Manoranjan, B., Salehi, F., Scheithauer, B. W., Rotondo, F., Kovacs, K., & Cusimano, M. D. (2010). Estrogen receptors alpha and beta immunohistochemical expression: clinicopathological correlations in pituitary adenomas. *Anticancer Research*, *30*(7), 2897–2904.
- McAndrew, J., Paterson, A. J., Asa, S. L., McCarthy, K. J., & Kudlow, J. E. (1995). Targeting of transforming growth factor- α expression to pituitary lactotrophs in transgenic mice results in selective lactotroph proliferation and adenomas. *Endocrinology*, *136*(10), 4479–4488. <https://doi.org/10.1210/endo.136.10.7664668>
- McGowan, E. M., Russell, A. J., Boonyaratankornkit, V., Saunders, D. N., Lehrbach, G. M., Sergio, C. M., ... Sutherland, R. L. (2007). Progestins reinitiate cell cycle progression in antiestrogen-arrested breast cancer cells through the B-isoform of progesterone receptor. *Cancer Research*, *67*(18), 8942–8951. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1255>
- Meffre, D., Labombarda, F., Delespierre, B., Chastre, A., De Nicola, A. F., Stein, D. G., ... Guennoun, R. (2013). Distribution of membrane progesterone receptor alpha in the male mouse and rat brain and its regulation after traumatic brain injury. *Neuroscience*, *231*, 111–124. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2012.11.039>
- Mirkin, S., Amadio, J. M., Bernick, B. A., Pickar, J. H., & Archer, D. F. (2015). 17 β -Estradiol and natural progesterone for menopausal hormone therapy: REPLENISH phase 3 study design of a combination capsule and evidence review. *Maturitas*, *81*(1), 28–35. <https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2015.02.266>
- Mitchner, N. A., Garlick, C., & Ben-Jonathan, N. (1998). Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology*, *139*(9), 3976–3983. <https://doi.org/10.1210/endo.139.9.6181>
- Molitch, M. E. (2015). Endocrinology in pregnancy: management of the pregnant patient with a prolactinoma. *European Journal of Endocrinology*, *172*(5), R205-13. <https://doi.org/10.1530/EJE-14-0848>
- Mulac-Jericevic, B., & Conneely, O. M. (2004). Reproductive tissue selective actions of progesterone receptors. *Reproduction (Cambridge, England)*, *128*(2), 139–146. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00189>
- Nolan, L. A., & Levy, A. (2009a). Prolonged oestrogen treatment does not correlate with a sustained increase in anterior pituitary mitotic index in ovariectomized Wistar rats. *The Journal of Endocrinology*, *200*(3), 301–309. <https://doi.org/10.1677/JOE-08-0474>
- Nolan, L. A., & Levy, A. (2009b). The trophic effects of oestrogen on male rat anterior pituitary lactotrophs. *Journal of Neuroendocrinology*, *21*(5), 457–464. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2009.01864.x>
- Nutu, M., Weijdegard, B., Thomas, P., Bergh, C., Thurin-Kjellberg, A., Pang, Y., ... Larsson, D. G. J. (2007). Membrane progesterone receptor gamma: tissue distribution and expression in ciliated cells in the

- fallopian tube. *Molecular Reproduction and Development*, 74(7), 843–850.
<https://doi.org/10.1002/mrd.20685>
- Pang, Y., Dong, J., & Thomas, P. (2013). Characterization, neurosteroid binding and brain distribution of human membrane progesterone receptors delta and {epsilon} (mPRdelta and mPR{epsilon}) and mPRdelta involvement in neurosteroid inhibition of apoptosis. *Endocrinology*, 154(1), 283–295.
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1772>
- Pang, Y., Dong, J., & Thomas, P. (2015). Progesterone increases nitric oxide synthesis in human vascular endothelial cells through activation of membrane progesterone receptor-alpha. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, 308(10), E899-911.
<https://doi.org/10.1152/ajpendo.00527.2014>
- Pasqualini, C., Guibert, B., & Leviel, V. (1993). Short-term inhibitory effect of estradiol on tyrosine hydroxylase activity in tuberoinfundibular dopaminergic neurons in vitro. *Journal of Neurochemistry*, 60(5), 1707–1713.
- Pastorcic, M., De, A., Boyadjieva, N., Vale, W., & Sarkar, D. K. (1995). Reduction in the expression and action of transforming growth factor beta 1 on lactotropes during estrogen-induced tumorigenesis in the anterior pituitary. *Cancer Research*, 55(21), 4892–4898.
- Pastorcic, M., & Sarkar, D. K. (1997). Downregulation of TGF-beta 1 gene expression in anterior pituitary cells treated with forskolin. *Cytokine*, 9(2), 106–111. <https://doi.org/10.1006/cyto.1996.0143>
- Perez, P. A., Petiti, J. P., Picech, F., Guido, C. B., dV Sosa, L., Grondona, E., ... Gutierrez, S. (2018). Estrogen receptor beta regulates the tumoral suppressor PTEN to modulate pituitary cell growth. *Journal of Cellular Physiology*, 233(2), 1402–1413. <https://doi.org/10.1002/jcp.26025>
- Perez, P. A., Petiti, J. P., Wagner, I. A., Sabatino, M. E., Sasso, C. V., De Paul, A. L., ... Gutierrez, S. (2015). Inhibitory role of ERbeta on anterior pituitary cell proliferation by controlling the expression of proteins related to cell cycle progression. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 415, 100–113.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.009>
- Piroli, G. G., Cassataro, J., Pietranera, L., Grillo, C. A., Ferrini, M., Lux-Lantos, V., & De Nicola, A. F. (2001). Progesterin regulation of galanin and prolactin gene expression in oestrogen-induced pituitary tumours. *Journal of Neuroendocrinology*, 13(3), 302–309.
- Piroli, G. G., Grillo, C. A., Ferrini, M. G., Lux-Lantos, V., & De Nicola, A. F. (1996). Antagonism by Progesterone of Diethylstilbestrol-Induced Pituitary Tumorigenesis in Fischer 344 Rats: Effects on Sex Steroid Receptors and Tyrosine Hydroxylase mRNA. *Neuroendocrinology*.
<https://doi.org/10.1159/000127082>
- Piroli, G., Lima, A. E., Diaz-Torga, G., & De Nicola, A. F. (1994). Biochemical parameters in the anterior pituitary during the course of tumorigenesis induced by diethylstilbestrol treatment. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 51(3–4), 183–189.
- Piroli, G., Torres, A., Grillo, C., Lux-Lantos, V., Aoki, A., & De Nicola, A. F. (1998). Mechanisms in progestin antagonism of pituitary tumorigenesis. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.
[https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(97\)00139-8](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(97)00139-8)
- Ratner, L. D., Gonzalez, B., Ahtiainen, P., Di Giorgio, N. P., Poutanen, M., Calandra, R. S., ... Rulli, S. B. (2012). Short-term pharmacological suppression of the hyperprolactinemia of infertile hCG-overproducing female mice persistently restores their fertility. *Endocrinology*, 153(12), 5980–5992. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1393>
- Raymond, V., Beaulieu, M., Labrie, F., & Boissier, J. (1978). Potent antidopaminergic activity of estradiol at the pituitary level on prolactin release. *Science (New York, N.Y.)*, 200(4346), 1173–1175.
- Recouvreux, M. V., Camilletti, M. A., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Díaz-Torga, G. (2012). Thrombospondin-1 (TSP-1) analogs ABT-510 and ABT-898 inhibit prolactinoma growth and recover active pituitary transforming growth factor-β1 (TGF-β1). *Endocrinology*, 153(8).
<https://doi.org/10.1210/en.2012-1007>
- Recouvreux, M. V., Camilletti, M. A., Rifkin, D. B., & Díaz-Torga, G. (2016). The pituitary TGFβ1 system as

- a novel target for the treatment of resistant prolactinomas. *Journal of Endocrinology*, 228(3).
<https://doi.org/10.1530/JOE-15-0451>
- Recouvreux, M. V., Faraoni, E. Y., Camilletti, M. A., Ratner, L., Abeledo-Machado, A., Rulli, S. B., & Díaz-Torga, G. (2018). Sex differences in the pituitary TGFβ1 system: The role of TGFβ1 in prolactinoma development. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 50. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2017.10.003>
- Recouvreux, M. V., Guida, M. C., Rifkin, D. B., Becu-Villalobos, D., & Diaz-Torga, G. (2011). Active and total transforming growth factor-beta1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology*, 152(7), 2722–2730. <https://doi.org/10.1210/en.2010-1464>
- Recouvreux, M. V., Lapyckyj, L., Camilletti, M. A., Guida, M. C., Ornstein, A., Rifkin, D. B., ... Díaz-Torga, G. (2013). Sex differences in the pituitary transforming growth factor-β1 system: Studies in a model of resistant prolactinomas. *Endocrinology*, 154(11). <https://doi.org/10.1210/en.2013-1433>
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., & Prossnitz, E. R. (2005). A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science (New York, N.Y.)*, 307(5715), 1625–1630. <https://doi.org/10.1126/science.1106943>
- Rifkin, D. B. (2005). Latent transforming growth factor-beta (TGF-beta) binding proteins: orchestrators of TGF-beta availability. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(9), 7409–7412.
<https://doi.org/10.1074/jbc.R400029200>
- Roger, P., Sahla, M. E., Makela, S., Gustafsson, J. A., Baldet, P., & Rochefort, H. (2001). Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. *Cancer Research*, 61(6), 2537–2541.
- Rojas, P. A., May, M., Sequeira, G. R., Elia, A., Alvarez, M., Martinez, P., ... Lanari, C. (2017). Progesterone Receptor Isoform Ratio: A Breast Cancer Prognostic and Predictive Factor for Antiprogesterin Responsiveness. *Journal of the National Cancer Institute*, 109(7).
<https://doi.org/10.1093/jnci/djw317>
- Romano, N., Yip, S. H., Hodson, D. J., Guillou, A., Parnaudeau, S., Kirk, S., ... Martin, A. O. (2013). Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 33(10), 4424–4433. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4415-12.2013>
- Rosini, S., Pugh, N., Bonna, A. M., Hulmes, D. J. S., Farndale, R. W., & Adams, J. C. (2018). Thrombospondin-1 promotes matrix homeostasis by interacting with collagen and lysyl oxidase precursors and collagen cross-linking sites. *Science Signaling*, 11(532).
<https://doi.org/10.1126/scisignal.aar2566>
- Rudolf, F. O., & Kadokawa, H. (2013). Expression of estradiol receptor, GPR30, in bovine anterior pituitary and effects of GPR30 agonist on GnRH-induced LH secretion. *Animal Reproduction Science*, 139(1–4), 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2013.04.003>
- Rulli, S. B., Kuorelahti, A., Karaer, O., Pelliniemi, L. J., Poutanen, M., & Huhtaniemi, I. (2002). Reproductive disturbances, pituitary lactotrope adenomas, and mammary gland tumors in transgenic female mice producing high levels of human chorionic gonadotropin. *Endocrinology*, 143(10), 4084–4095. <https://doi.org/10.1210/en.2002-220490>
- Ryu, C. S., Klein, K., & Zanger, U. M. (2017). Membrane Associated Progesterone Receptors: Promiscuous Proteins with Pleiotropic Functions - Focus on Interactions with Cytochromes P450. *Frontiers in Pharmacology*, 8, 159. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00159>
- Sahlin, L., Masironi, B., Akerberg, S., & Eriksson, H. (2006). Tissue- and hormone-dependent progesterone receptor distribution in the rat uterus. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 4, 47. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-4-47>
- Salazar, M., Lerma-Ortiz, A., Hooks, G. M., Ashley, A. K., & Ashley, R. L. (2016). Progesterin-mediated activation of MAPK and AKT in nuclear progesterone receptor negative breast epithelial cells: The role of membrane progesterone receptors. *Gene*, 591(1), 6–13.
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2016.06.044>

- Sarkar, D. K., Chaturvedi, K., Oomizu, S., Boyadjieva, N. I., & Chen, C. P. (2005). Dopamine, dopamine D2 receptor short isoform, transforming growth factor (TGF)-beta1, and TGF-beta type II receptor interact to inhibit the growth of pituitary lactotropes. *Endocrinology*, *146*(10), 4179–4188. <https://doi.org/10.1210/en.2005-0430>
- Sarkar, D. K., Kim, K. H., & Minami, S. (1992). Transforming growth factor-beta 1 messenger RNA and protein expression in the pituitary gland: its action on prolactin secretion and lactotropic growth. *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)*, *6*(11), 1825–1833. <https://doi.org/10.1210/mend.6.11.1480172>
- Sarkar, D. K., Pastorcic, M., De, A., Engel, M., Moses, H., & Ghasemzadeh, M. B. (1998). Role of transforming growth factor (TGF)-beta Type I and TGF-beta type II receptors in the TGF-beta1-regulated gene expression in pituitary prolactin-secreting lactotropes. *Endocrinology*, *139*(8), 3620–3628. <https://doi.org/10.1210/endo.139.8.6135>
- Schuff, K. G., Hentges, S. T., Kelly, M. A., Binart, N., Kelly, P. A., Iuvone, P. M., ... Low, M. J. (2002). Lack of prolactin receptor signaling in mice results in lactotroph proliferation and prolactinomas by dopamine-dependent and -independent mechanisms. *The Journal of Clinical Investigation*, *110*(7), 973–981. <https://doi.org/10.1172/JCI15912>
- Selicovich, A. (2010). Cell life and death in the anterior pituitary gland: role of oestrogens. *Journal of Neuroendocrinology*, *22*(7), 758–764. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2010.02010.x>
- Selicovich, A., Pisera, D., Sciascia, S. A., Candolfi, M., Puntel, M., Xiong, W., ... Castro, M. G. (2005). Gene therapy for pituitary tumors. *Current Gene Therapy*, *5*(6), 559–572.
- Shaaban, A. M., O'Neill, P. A., Davies, M. P. A., Sibson, R., West, C. R., Smith, P. H., & Foster, C. S. (2003). Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. *The American Journal of Surgical Pathology*, *27*(12), 1502–1512.
- Sharma, G., & Prossnitz, E. R. (2016). GPER/GPR30 Knockout Mice: Effects of GPER on Metabolism. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, *1366*, 489–502. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-3127-9_38
- Shoupe, D., Parker, W. H., Broder, M. S., Liu, Z., Farquhar, C., & Berek, J. S. (2007). Elective oophorectomy for benign gynecological disorders. *Menopause (New York, N.Y.)*, *14*(3 Pt 2), 580–585. <https://doi.org/10.1097/gme.0b013e31803c56a4>
- Sinreih, M., Knific, T., Thomas, P., Frkovic Grazio, S., & Rizner, T. L. (2018). Membrane progesterone receptors beta and gamma have potential as prognostic biomarkers of endometrial cancer. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, *178*, 303–311. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2018.01.011>
- Sleiter, N., Pang, Y., Park, C., Horton, T. H., Dong, J., Thomas, P., & Levine, J. E. (2009). Progesterone receptor A (PRA) and PRB-independent effects of progesterone on gonadotropin-releasing hormone release. *Endocrinology*, *150*(8), 3833–3844. <https://doi.org/10.1210/en.2008-0774>
- Suarez, C., Diaz-Torga, G., Gonzalez-Iglesias, A., Vela, J., Mladovan, A., Baldi, A., & Becu-Villalobos, D. (2003). Angiotensin II phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases in rat anterior pituitary cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism*, *285*(3), E645–53. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00015.2003>
- Szawka, R. E., Rodovalho, G. V., Helena, C. V. V., Franci, C. R., & Anselmo-Franci, J. A. (2007). Prolactin secretory surge during estrus coincides with increased dopamine activity in the hypothalamus and preoptic area and is not altered by ovariectomy on proestrus. *Brain Research Bulletin*, *73*(1–3), 127–134. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2007.03.001>
- Takeuchi, Y., Liu, J.-Q., Matsumoto, Y., Miki, T., Ohta, K., Warita, K., ... Tamai, M. (2013). Secretion-related structures of hypothalamo-hypophysial terminals in the rat posterior pituitary. *Okajimas Folia Anatomica Japonica*, *90*(3), 69–76.
- Tashjian, A. H. J., Bancroft, F. C., & Levine, L. (1970). Production of both prolactin and growth hormone by clonal strains of rat pituitary tumor cells. Differential effects of hydrocortisone and tissue extracts. *The Journal of Cell Biology*, *47*(1), 61–70.

- Thomas, P. (2008). Characteristics of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) and progesterone membrane receptor component 1 (PGRMC1) and their roles in mediating rapid progesterin actions. *Frontiers in Neuroendocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2008.01.001>
- Thomas, P., Pang, Y., & Dong, J. (2014). Enhancement of cell surface expression and receptor functions of membrane progesterin receptor alpha (mPR α) by progesterone receptor membrane component 1 (PGRMC1): evidence for a role of PGRMC1 as an adaptor protein for steroid receptors. *Endocrinology*, *155*(3), 1107–1119. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1991>
- Thomas, P., Pang, Y., Dong, J., Groenen, P., Kelder, J., De Vlieg, J., ... Tubbs, C. (2007). Steroid and G protein binding characteristics of the seatrout and human progesterin membrane receptor α subtypes and their evolutionary origins. *Endocrinology*. <https://doi.org/10.1210/en.2006-0974>
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., & Dong, J. (2005). Identity of an estrogen membrane receptor coupled to a G protein in human breast cancer cells. *Endocrinology*, *146*(2), 624–632. <https://doi.org/10.1210/en.2004-1064>
- Todorovic, V., Jurukovski, V., Chen, Y., Fontana, L., Dabovic, B., & Rifkin, D. B. (2005). Latent TGF-beta binding proteins. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *37*(1), 38–41. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.03.011>
- Torres, A. I., & Aoki, A. (1985). Subcellular compartmentation of prolactin in rat lactotrophs. *The Journal of Endocrinology*, *105*(2), 219–225.
- Turgeon, J. L., & Waring, D. W. (2000). Progesterone regulation of the progesterone receptor in rat gonadotropes. *Endocrinology*, *141*(9), 3422–3429. <https://doi.org/10.1210/endo.141.9.7688>
- Wargon, V., Riggio, M., Giulianelli, S., Sequeira, G. R., Rojas, P., May, M., ... Lanari, C. (2015). Progesterin and antiprogesterin responsiveness in breast cancer is driven by the PRA/PRB ratio via AIB1 or SMRT recruitment to the CCND1 and MYC promoters. *International Journal of Cancer*, *136*(11), 2680–2692. <https://doi.org/10.1002/ijc.29304>
- Watabe, T., & Miyazono, K. (2009). Roles of TGF-beta family signaling in stem cell renewal and differentiation. *Cell Research*, *19*(1), 103–115. <https://doi.org/10.1038/cr.2008.323>
- Watson, P., Vasen, H. F. A., Mecklin, J.-P., Bernstein, I., Aarnio, M., Jarvinen, H. J., ... Lynch, H. T. (2008). The risk of extra-colonic, extra-endometrial cancer in the Lynch syndrome. *International Journal of Cancer*, *123*(2), 444–449. <https://doi.org/10.1002/ijc.23508>
- West, B., & Dannies, P. S. (1980). Effects of estradiol on prolactin production and dihydroergocryptine-induced inhibition of prolactin production in primary cultures of rat pituitary cells. *Endocrinology*, *106*(4), 1108–1113. <https://doi.org/10.1210/endo-106-4-1108>
- Witek, P., & Zielinski, G. (2013). Management of prolactinomas during pregnancy. *Minerva Endocrinologica*, *38*(4), 351–363.
- Wu, S.-P., & DeMayo, F. J. (2017). Progesterone Receptor Signaling in Uterine Myometrial Physiology and Preterm Birth. *Current Topics in Developmental Biology*, *125*, 171–190. <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2017.03.001>
- Xin, Y., Xu, D., Yang, X., Liu, A., Zhou, X., & Guo, B. (2015). Review: Effect study of sex hormone in the multiple sclerosis of common neurological disorders. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, *28*(4 Suppl), 1563–1566.
- Yen, S. H., & Pan, J. T. (1998). Progesterone advances the diurnal rhythm of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity and the prolactin surge in ovariectomized, estrogen-primed rats and in intact proestrous rats. *Endocrinology*, *139*(4), 1602–1609. <https://doi.org/10.1210/endo.139.4.5901>
- Zarate, S., Jaita, G., Ferraris, J., Eijo, G., Magri, M. L., Pisera, D., & Seilicovich, A. (2012). Estrogens induce expression of membrane-associated estrogen receptor alpha isoforms in lactotrophs. *PLoS One*, *7*(7), e41299. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0041299>
- Zarate, S., Jaita, G., Zaldivar, V., Radl, D. B., Eijo, G., Ferraris, J., ... Seilicovich, A. (2009). Estrogens exert a rapid apoptotic action in anterior pituitary cells. *American Journal of Physiology. Endocrinology*

- and Metabolism*, 296(4), E664-71. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.90785.2008>
- Zarate, S., & Seilicovich, A. (2010). Estrogen receptors and signaling pathways in lactotropes and somatotropes. *Neuroendocrinology*, 92(4), 215–223. <https://doi.org/10.1159/000321683>
- Zhang, S. (2018). The role of transforming growth factor beta in T helper 17 differentiation. *Immunology*, 155(1), 24–35. <https://doi.org/10.1111/imm.12938>
- Zhou, W., Song, Y., Xu, H., Zhou, K., Zhang, W., Chen, J., ... Fan, X. (2011). In nonfunctional pituitary adenomas, estrogen receptors and slug contribute to development of invasiveness. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 96(8), E1237-45. <https://doi.org/10.1210/jc.2010-3040>
- Zhu, Y., Bond, J., & Thomas, P. (2003). Identification, classification, and partial characterization of genes in humans and other vertebrates homologous to a fish membrane progesterin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1073/pnas.0436133100>
- Zhu, Y., Hanna, R. N., Schaaf, M. J. M., Spink, H. P., & Thomas, P. (2008). Candidates for membrane progesterin receptors—Past approaches and future challenges. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2008.05.019>
- Zimmerman, M. A., Budish, R. A., Kashyap, S., & Lindsey, S. H. (2016). GPER—novel membrane oestrogen receptor. *Clinical Science (London, England : 1979)*, 130(12), 1005–1016. <https://doi.org/10.1042/CS20160114>
- Zuloaga, D. G., Yahn, S. L., Pang, Y., Quihuis, A. M., Oyola, M. G., Reyna, A., ... Mani, S. K. (2012). Distribution and estrogen regulation of membrane progesterone receptor-beta in the female rat brain. *Endocrinology*, 153(9), 4432–4443. <https://doi.org/10.1210/en.2012-1469>