

## Revisiones

# Líneas celulares adenohipofisarias $\alpha$ T3-1, L $\beta$ T2, RC-4B/C y MtTW-10: regulación y fisiología celular

M.C. ALONSO-FUENTES, G. HERNÁNDEZ y R. ALONSO

## ANTERIOR PITUITARY CELL LINES $\alpha$ T3-1, L $\beta$ T2, RC-4B/C AND MtTW-10: REGULATION AND CELLULAR PHYSIOLOGY

The anterior pituitary is a well-structured organ with a clearly defined function, which offers the possibility of studying the mechanisms involved in organogenesis and the maintenance of specific cell functions. Due to the cellular diversity of this endocrine gland, obtaining highly purified primary cell cultures from this organ is difficult. Recently developed techniques based on targeted oncogenesis have enabled immortalized cell lines that maintain specific differentiated phenotypes to be obtained and constitute a valuable tool for studying their cell biology. These model systems have allowed detailed investigation into cellular and molecular mechanisms otherwise inaccessible *in vivo* or in complex primary pituitary cell cultures. Thus, gonadotroph cell lines such as  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 are representative of discrete stages of development that express differentiated functions of the gonadotroph lineage. In addition to these experimental systems, there are others that show a cellular population as diverse as those observed in adult anterior pituitary glands, such as the RC-4B/C and MtTW-10 cell lines. In the present article we provide a brief description of each of the above-mentioned cell lines and review several aspects of their regulation by various factors.

**Key words:** Cell lines. Oncogenesis. Pituitary gland. Gonadotrophs. Differentiation. GnRH. Luteinizing hormone. Follicle-stimulating hormone.

La adenohipófisis es un órgano bien estructurado y con una función claramente definida, que ofrece la posibilidad de estudiar los mecanismos que intervienen en la organogenia y el mantenimiento de funciones celulares específicas. Debido a la gran diversidad celular de esta glándula endocrina, la obtención de cultivos primarios altamente purificados de tipos celulares concretos a partir de este órgano es una tarea difícil. El desarrollo reciente de técnicas de oncogenia dirigida ha permitido la obtención de líneas celulares que mantienen fenotipos diferenciados específicos y que son una herramienta valiosa para el estudio de su biología celular. Estos sistemas permiten la investigación detallada de mecanismos celulares y moleculares que, de otra manera, resultarían difícilmente accesibles tanto *in vivo* como en cultivos primarios de células adenohipofisarias. De esta forma, líneas celulares, como  $\alpha$ T3-1 y L $\beta$ T2, representan estadios discretos del desarrollo y se caracterizan básicamente por la expresión de funciones diferenciadas del linaje de células gonadotropas. Junto con estos sistemas experimentales existen otros que muestran una población celular tan diversa como la observada en glándulas adenohipofisarias adultas, como ocurre en las líneas celulares RC-4B/C y MtTW-10. En este artículo presentamos una descripción resumida de cada una de las líneas mencionadas anteriormente, y revisamos varios aspectos acerca de su regulación por diferentes factores.

---

**Palabras clave:** Líneas celulares. Oncogenia. Adenohipófisis. Células gonadotropas. Diferenciación. GnRH. Hormona luteinizante. Hormona foliculoestimulante.

El desarrollo de la adenohipófisis ha representado un modelo en el estudio de los procesos de diferenciación celular y organogenia en mamíferos<sup>1</sup>. Esta glándula endocrina se localiza en la base del cerebro y descansa sobre una depresión en la superficie superior del hueso esfenoides, la silla turca<sup>2</sup>. Generalmente, se acepta que la adenohipófisis procede de una invaginación del ectodermo en la región del estomodeo en estadio embrionario, proceso que dará lugar a la formación de la bolsa de Rathke<sup>3</sup>.

En el primordio, la proliferación celular se produce según una secuencia particular, posiblemente en respuesta a estímulos procedentes de estructuras circundantes, el mesénquima y el diencéfalo, que inducen a la aparición de 3 regiones funcional y estructuralmente diferenciadas que conforman la adenohipófisis en el adulto:

---

Correspondencia: Dra. M.C. Alonso Fuentes.  
Laboratorio de Neurobiología Celular. Departamento de Fisiología.  
Facultad de Medicina. Universidad de La Laguna.  
38071 La Laguna. Santa Cruz de Tenerife. España.  
Correo electrónico: mcfuente@ull.es

Manuscrito recibido el 7-05-2003; aceptado para su publicación el 15-09-2003.

**TABLA 1. Expresión de genes que codifican hormonas adenohipofisarias durante el desarrollo fetal del ratón<sup>4,6</sup>**

Estadio del desarrollo	ARNm	Tipo celular
E11.5	$\alpha$ -GSU	
E13.5	POMC (LA)	
	POMC (LI)	Corticotropas
E14.5	TSH $\beta$	Tirotropas
E15.5	GH	Somatotropas
E16.5	PRL	Lactotropas
E17.5	LH $\beta$	Gonadotropas
	FSH $\beta$	

FSH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona foliculoestimulante; GH: somatotropina; GSU: subunidad  $\alpha$  de las hormonas glucoproteicas; LA: lóbulo anterior; LI: lóbulo intermedio; POMC: proopiomelanocortina; PRL: prolactina; TSH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la tirotropina.

la *pars tuberalis*, la *pars distalis* o lóbulo anterior, y la *pars intermedia* o lóbulo intermedio<sup>4</sup>. La gran heterogeneidad celular que caracteriza a la adenohipófisis, que se basa fundamentalmente en la existencia de diferentes poblaciones de células endocrinas, ha dificultado el análisis molecular y el estudio de su regulación<sup>1</sup>. Si se tienen en cuenta los componentes celulares endocrinos distintivos de la adenohipófisis, se observa que muestran un patrón ontogénico característico de expresión de hormonas, y cada tipo celular aparece según un patrón temporal y espacial definido<sup>4</sup>, que varía según las especies.

El trazador más temprano de la diferenciación de la adenohipófisis es la expresión del gen de la subunidad  $\alpha$  de las hormonas glucoproteicas heterodiméricas, que se detecta inicialmente en el E11.5 en el ratón, en una agrupación de células presentes en la región anteroventral de la bolsa de Rathke<sup>4,5</sup>. La progresión de la diferenciación celular continúa con la aparición del linaje de corticotropas marcada por la expresión del gen de la proopiomelanocortina (POMC). El gen de la POMC se activa en el estadio E12.5 en células corticotropas del lóbulo anterior en el ratón. Estas células se localizan en los márgenes anteriores de la *pars distalis* en este estadio, estando circunscritas dentro de un área estrechamente relacionada con el diencéfalo basal, región en la que los transcritos de POMC se expresan 2 días antes<sup>4</sup>.

Las células tirotropas, que se identifican por la expresión del gen de la subunidad  $\beta$  de la tirotropina (TSH), son el segundo linaje de células endocrinas dentro de la secuencia temporal de diferenciación, y se identifican en el estadio E14.5 en una distribución similar a la de la subunidad  $\alpha$ <sup>4</sup>.

Mediante hibridación *in situ* se ha descrito la expresión del ARNm de la somatotropina (GH) en el estadio E15.5 en el ratón, expresión que coincide con valores detectables de proteína del factor de transcripción-1 de pituitaria (Pit-1) en las mismas células, factor que se caracteriza básicamente por presentar una región de aproximadamente 60 aminoácidos similar al homeodomino clásico. Es posible, además, la existencia de una población común de células somatolactotropas que luego se diferencia a células somatotropas

y células lactotropas productoras de prolactina (PRL). También parece existir un segundo linaje de células lactotropas que surge independientemente de la expresión de GH, y coexisten poblaciones distintas de células lactotropas y somatotropas en diferentes localizaciones en estadios tempranos del desarrollo<sup>4</sup>. En cualquier caso, las células gonadotropas son el último tipo celular en diferenciarse, y se detecta la expresión de las subunidades  $\beta$  específicas de la hormona luteinizante (LH $\beta$ ) y de la hormona foliculoestimulante (FSH $\beta$ ) en los estadios E16.5 y E17.5 en ratón, respectivamente<sup>4,5</sup> (tabla 1).

Las líneas celulares que mantienen fenotipos específicos son una herramienta valiosa en el estudio de la biología celular y molecular de la adenohipófisis<sup>3</sup>. Un ejemplo es el avance sustancial logrado en el estudio de la GH, la PRL y la POMC, gracias al desarrollo de las líneas celulares somatolactotropas GH-3, y la corticotropa AtT-20. Sin embargo, conocer cómo se lleva a cabo la regulación y la síntesis de las hormonas glucoproteicas como la TSH, LH o FSH ha estado dificultado por la carencia de líneas celulares representativas, y el análisis molecular de su regulación depende casi exclusivamente del uso de cultivos primarios, con la consiguiente desventaja de una viabilidad limitada y pérdida progresiva de función, y por la heterogeneidad celular que caracteriza a la adenohipófisis<sup>1</sup>. Esta dificultad se ha solventado parcialmente por el empleo de técnicas de oncogenia dirigida en ratones transgénicos, herramienta poderosa en la producción de líneas representativas de tipos celulares específicos<sup>5,6</sup>. Esta aproximación ha permitido la inmortalización de células con transgenes oncogénicos híbridos codificando regiones reguladoras que se expresan en diferentes estadios del desarrollo<sup>1</sup>, lo que permite dirigir la inmortalización celular, tanto espacial como temporalmente<sup>5,6</sup>. Un ejemplo de la utilidad de tales técnicas lo representa la expresión dirigida llevada a cabo por Windle et al<sup>1</sup> y Alarid et al<sup>6</sup> de un transgén formado por secuencias de la región promotora del gen de la subunidad  $\alpha$  unidas a la región temprana del virus SV40 que codifica para el antígeno T, lo que permite el establecimiento de líneas celulares con características propias de células gonadotropas, tirotropas o de células precursoras dentro de estos linajes<sup>1</sup>. Estas líneas son, por tanto, herramientas útiles en el estudio de los mecanismos relacionados con la expresión del gen de la subunidad  $\alpha$ , su síntesis y su secreción, así como de la acción de segundos mensajeros y de las secuencias génicas que actúan en *cis* y que se relacionan con las respuestas a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH)<sup>7</sup>. Además, también son el primer sistema modelo en el estudio del receptor GnRH<sup>1,7</sup> y cuyos ejemplos más representativos son las líneas de origen gonadotrópico  $\alpha$ T3-1 y L $\beta$ T2<sup>5,7</sup>.

Otros sistemas experimentales permiten una secreción alta y continuada de hormonas. Un ejemplo lo forman los tumores somatolactotrópicos trasplantables MtT-W10<sup>8</sup>, y la línea de células inmortales RC-4B/C,

TABLA 2. Características de la línea celular  $\alpha$ T3-1

<b>Procedencia</b>
Oncogenia dirigida en ratones. Transfección con un vector formado por el antígeno SV40 T + 1,8 kb de la región reguladora 5' de la subunidad $\alpha$ de la hormona glucoproteica humana <sup>1</sup>
Línea celular gonadotropa no diferenciada de ratón <sup>5</sup>
<b>Regulación</b>
Regulación homóloga de receptores GnRH <sup>6,7,10,14</sup>
Estimulación dependiente de la dosis de GnRH de la acumulación de IP y de los incrementos del $[Ca^{2+}]_i$ <sup>13,17,22,24</sup>
Acoplamiento de GnRH-R a las vías de transducción de MAPK <sup>7,25,28</sup>
Modulación de GnRH-R por esteroides <sup>19-22</sup>
Modulación de la producción de AMPc por PACAP <sup>15,17,18</sup>
<b>Expresan</b>
El gen de la subunidad $\alpha$ <sup>5,6</sup>
Receptores GnRH <sup>5,7</sup>
<b>No expresan</b>
Subunidad $\beta$ de LH, TSH y FSH <sup>1</sup>
Receptores ER $\alpha$ , ER $\beta$ y TERP-1 <sup>12</sup>
Receptores PVR1 y PVR3 <sup>18</sup>

ER $\alpha$ : receptor de estrógenos  $\alpha$ ; ER $\beta$ : receptor de estrógenos  $\beta$ ; FSH: hormona foliculoestimulante; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; IP: inositol fosfato; LH: hormona luteinizante; MAPK: proteincinasa activadas por mitógenos; PACAP: polipéptido activador de la adenilciclasa de hipofisis; PACAP/VIP tipo-1; PACAP/VIP tipo-3; PVR1: receptores PVR3: receptores TERP-1: producto truncado del ER $\alpha$ ; TSH: tirotropina.

procedente de un adenoma de rata macho, que tiene como característica más relevante que contiene todos los tipos de células endocrinas presentes en la adenohipófisis de la rata<sup>9</sup>. Dichos modelos proporcionan sistemas complementarios, junto con las líneas de células monoclonales y cultivos primarios, en el estudio de la inducción y el mantenimiento de la función adenohipofisaria.

## LÍNEA CELULAR $\alpha$ T3-1 (tabla 2)

Esta línea celular se generó por oncogenia dirigida, en ratones transgénicos, mediante transfección con un vector formado por aproximadamente 1,8 kb de la región reguladora 5' del gen de la subunidad  $\alpha$  humana, que se expresa normalmente en células gonadotropas y tirotropas, junto a secuencias que codifican para el antígeno T del virus SV40. De esta forma, Windle et al<sup>1</sup> logran establecer la línea clonal gonadotropa  $\alpha$ T3-1.

Las células  $\alpha$ T3-1 expresan el gen de la subunidad  $\alpha$ , pero carecen de la expresión de GH, PRL y POMC, así como del gen de la subunidad  $\beta$  específica de la TSH, la LH y la FSH<sup>1</sup>. Estas células también codifican el ARNm del receptor de GnRH (GnRH-R)<sup>5,7</sup>, expresión que es específica de células gonadotropas, lo que ha facilitado la secuenciación del ADNc que codifica para este receptor. Por tanto, el patrón de expresión específico en células  $\alpha$ T3-1 probablemente indica que la transformación de las células precursoras de las que se derivó la línea se produjo en un estadio temprano del desarrollo, en el que aún no se encontraban totalmente diferenciadas a células gonadotropas<sup>5</sup>.

### Regulación por GnRH en células $\alpha$ T3-1

La línea  $\alpha$ T3-1 es un modelo ampliamente utilizado en el estudio de las vías de transducción de la señal activadas por GnRH<sup>7</sup> (fig. 1). Esta neurohormona hipotalámica, regulador clave del sistema reproductor, interactúa con receptores específicos en la membrana

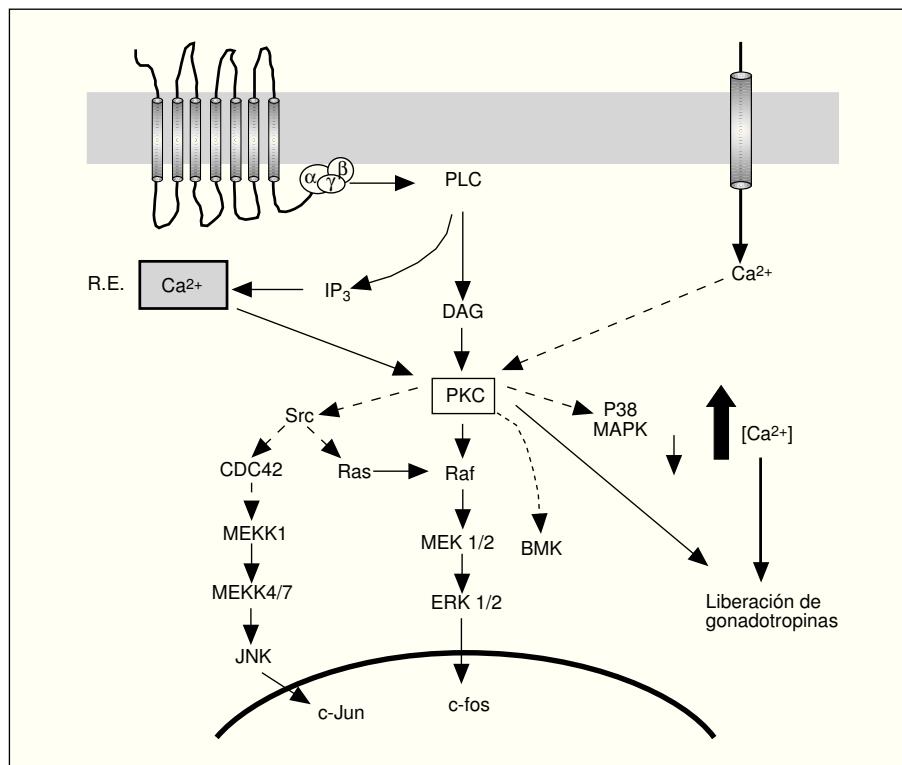


Fig. 1. Representación esquemática de algunas vías de regulación por GnRH en células  $\alpha$ T3-1. Las flechas discontinuas representan activación indirecta. BMK: big MAPK; ERK: cinasa regulada por señal extracelular; JNK: jun N-terminal cinasa; MAPK: proteincinasa activada por mitógenos; MEK: MAPK/ERK cinasa; MEKK: MEK cinasa; PKC: proteincinasa C; PLC: fosfolipasa C.

plasmática de células diana, regula la actividad transduccional y transcripcional, modula la producción de segundos mensajeros y, consecuentemente, regula la síntesis y la secreción de gonadotropinas<sup>6,7,10</sup>.

En células  $\alpha$ T3-1 los receptores GnRH están acoplados, a través de la interacción con proteínas G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub>, a la activación de la fosfolipasa C (PLC), probablemente el subtipo PLC $\beta$ 1, dando lugar a la formación de los segundos mensajeros inositol-1,4,5-trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), necesarios para la movilización de calcio intracelular y la activación de varias isoformas de proteincinasa C (PKC)<sup>11,12</sup> y de protein cinasas activadas por mitógeno (MAPK)<sup>7</sup> (fig. 1). Sin embargo, no se han observado incrementos en la concentración de AMPc en células  $\alpha$ T3-1 tras estimulación con GnRH, por lo que su activación se relaciona exclusivamente con la hidrólisis por PLC de fosfolípidos<sup>13</sup>. La cinética de activación de la PLC por GnRH sugiere, además, que el receptor GnRH no está sometido a desensibilización homóloga rápida<sup>14</sup>.

En esta línea celular, la desensibilización homóloga parece relacionarse con cambios en el número de receptores GnRH, en los acontecimientos de señalización por calcio y con la modificación de varias isoformas de PKC<sup>15,16</sup>. Se ha demostrado que en células gonadotropas coexisten varias formas de isoenzimas PKC. Ello incluye PKC convencionales tipo  $\alpha$ ,  $\beta$ II, que requieren de DAG y calcio para su activación, las nuevas isoformas de PKC  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\eta$ , que no son sensibles al calcio pero que responden al DAG, y las PKC atípicas, como la isoforma  $\zeta$ <sup>16</sup>. El GnRH modula a la PKC  $\epsilon$  y  $\delta$  y probablemente a las isoenzimas  $\zeta$ , mientras que los ésteres de forbol como el 12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato (TPA), afectan a las isoformas de PKC  $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ , y  $\beta$ II<sup>15,16</sup>. En células  $\alpha$ T3-1 se han identificado isoformas individuales de PKC tipo  $\alpha$ ,  $\epsilon$ , y  $\zeta$ , pero no las formas  $\eta$  ni  $\beta$ <sup>12,16</sup>, por lo que no pueden descartarse mecanismos de acción similares a los observados en células adenohipofisarias.

## Regulación hormonal

Las células  $\alpha$ T3-1 pueden modularse por un número de factores peptídicos y hormonales distintos del GnRH. Uno de estos factores es el polipeptido activador de la adenilciclasa (AC) de hipófisis o PACAP. Este péptido es capaz de estimular en células  $\alpha$ T3-1 la producción de AMPc<sup>17</sup>, la transcripción del gen de la subunidad  $\alpha$ <sup>17</sup>, la secreción de LH<sup>18</sup> y la síntesis de ADN determinado mediante la incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina<sup>18</sup>.

Estas células expresan receptores PACAP/VIP tipo-1 (PVR1) y, en menor proporción, receptores PACAP/VIP tipo-3 (PVR3)<sup>18</sup>. Las 2 formas endógenas de PACAP (PACAP27 y PACAP38) interactúan con PVR1 en células  $\alpha$ T3-1 con afinidad comparable, y activan a la AC y la enzima fosfolipasa C<sup>10</sup>, hecho que dará lugar a incrementos similares en los valores de AMPc y de inositol fosfato (IP)<sup>18</sup>. El polipeptido in-

testinal vasoactivo (VIP) también interactúa con receptores PVR1, pero con menor afinidad que el PACAP<sup>17</sup>, y se detectan incrementos en la producción de AMPc del orden de 100 a 1.000 veces menor que los alcanzados con PACAP y sin que se produzcan efectos cuantificables sobre la acumulación de IP<sup>18</sup>.

La observación de que el PACAP estimula la acumulación de AMPc en células  $\alpha$ T3-1 proporcionó la primera demostración de efectos directos del péptido en células de origen gonadotrópico, lo que sugiere, además, que la respuesta en gonadotropas primarias puede deberse a la activación de receptores PVR1<sup>18</sup>. Cabe señalar, además, que los resultados obtenidos por McArdle y Forrest-Owen<sup>15</sup> indican que es posible la activación de mecanismos de desensibilización homóloga del receptor PVR1 tras la exposición crónica al PACAP<sup>27</sup>. La acción del PACAP induce cambios en la [Ca<sup>2+</sup>] en las células  $\alpha$ T3-1 a través de mecanismos dependientes de IP<sub>3</sub> y de cAMP/PKA, principalmente a través de receptores PVR1<sup>17</sup>. La estimulación por el péptido PACAP de la actividad PLC es responsable, al menos en parte, del incremento que se observa en la [Ca<sup>2+</sup>]<sup>18</sup>.

Otro tipo de regulación importante en células clonales  $\alpha$ T3-1 es la que se produce por esteroides como el estradiol, que modula, entre otros procesos, la respuesta a GnRH en estas células<sup>19</sup>. La exposición crónica al estradiol puede afectar a la liberación de gonadotropinas estimulada por GnRH, así como al número de GnRH-R<sup>19</sup>. El estradiol también es un potente regulador del crecimiento y la proliferación en células clonales  $\alpha$ T3-1<sup>19,21</sup>, efecto que viene determinado por el incremento en la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina<sup>19,21</sup>. El estradiol ejerce una acción específica y dependiente de la dosis a través del receptor de estrógenos  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) en la incorporación de (<sup>3</sup>H)-timidina, que puede inhibirse competitivamente por el raloxifeno, un modulador selectivo del receptor de estrógenos (SERM), y que se asocia con una alteración en la distribución del ciclo celular<sup>19,21</sup>.

Las células  $\alpha$ T3-1 expresan ER funcionales, y se describe la expresión de ARNm para ER $\alpha$ , ER $\beta$  y la isoforma específica de hipófisis TERP-1<sup>21</sup>. El estradiol también actúa directamente en estas células y reduce el número de GnRH-R y la eficiencia con la que los GnRH-R residuales se acoplan a la producción de segundos mensajeros<sup>19,22,23</sup>, particularmente a los IP<sup>19</sup>.

Las poblaciones celulares adenohipofisarias dificultan la detección de la acumulación de IP<sub>3</sub> por GnRH en un tipo celular concreto. Por tanto, la línea  $\alpha$ T3-1 ha permitido un análisis detallado del metabolismo de los IP en células de origen gonadotrópico. Los trabajos de Williams et al<sup>20</sup> y Ortmann et al<sup>22</sup> han demostrado que tanto el estradiol como la progesterona modulan la producción de mono, bis y trifosfatos en células  $\alpha$ T3-1 de manera similar a como se observa en poblaciones mixtas adenohipofisarias. El estradiol también incrementa la actividad PLC inducida por activación del GnRH-R. Sin embargo, la amplitud de las señales

de IP<sub>3</sub> no conduce necesariamente a cambios consistentes en las señales de Ca<sup>2+</sup> y de las respuestas secretoras de LH en estas células<sup>20,22</sup>. La acción de la progesterona, en cambio, altera la fase inicial Ca<sup>2+</sup> independiente de las señales de Ca<sup>2+</sup> estimuladas por GnRH<sup>22</sup>.

El estradiol modifica la liberación de gonadotropinas en respuesta a estímulos independientes del GnRH-R y que incluyen la activación de la PKC por ésteres de forbol<sup>23</sup> y la movilización de Ca<sup>2+</sup> por ionóforos<sup>21</sup>. Por tanto, los esteroides pueden actuar sobre *loci* posreceptores, para modular sistemas de señalización mediados por Ca<sup>2+</sup> y PKC<sup>19</sup>.

### Regulación por segundos mensajeros

Un segundo mensajero intracelular importante que regula la acción de las hormonas liberadoras como la GnRH es el calcio. La activación por GnRH induce la movilización inmediata del calcio intracelular y la posterior entrada del calcio extracelular en células gonadotropas, procesos clave en la señal GnRH-R (fig. 1). La entrada de Ca<sup>2+</sup> en células  $\alpha$ T3-1 se produce principalmente a través de canales de calcio sensibles al voltaje (CCSV) en la membrana plasmática, mientras que el IP<sub>3</sub> libera Ca<sup>2+</sup> desde reservorios intracelulares. Ambos procesos están relacionados con la secreción de LH en células  $\alpha$ T3-1<sup>24</sup>. Además, el IP<sub>3</sub> resulta ser un elemento clave en la señal GnRH-R hacia las proteínas MAPK<sup>11</sup>.

La activación del receptor GnRH en la línea  $\alpha$ T3-1 da lugar a incrementos bifásicos espiga-meseta en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que se relacionan con distintas poblaciones de calcio intra y extracelulares<sup>13,24</sup>, similares a los observados en células gonadotropas adenohipofisarias. Estos cambios en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se producen en forma de espiga inicial rápida que se deriva de la movilización de Ca<sup>2+</sup> desde el retículo endoplásmático, seguida por una fase de meseta prolongada que depende de la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales sensibles a dihidropiridinas (DHP-sensibles)<sup>13,24</sup>. Ambas fases de espiga y meseta exhiben distinta sensibilidad frente a concentraciones crecientes de GnRH y se observa un incremento en la amplitud y una disminución en la señal de calcio intracelular, respectivamente. También, como ocurre en células gonadotropas adenohipofisarias, la corriente de Ca<sup>2+</sup> de membrana en células  $\alpha$ T3-1 tiene un componente transitorio (T) y uno sostenido (L) (DHP-sensible). Parece que los CCSV en estas células se encuentran espontáneamente activos, como reflejan los resultados obtenidos con el agonista de canales de calcio Bay K 8644, que actúa sólo sobre CCSV en estado abierto<sup>13,24</sup>. En resumen, del análisis de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> se deduce que el sistema de acoplamiento a GnRH es similar al de las células adenohipofisarias.

Los cambios en la concentración de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> pueden ser modulados por el sistema AMPc/PKA en células  $\alpha$ T3-1. Un incremento en los valores de AMPc citosólico conduce a la activación de la PKA y la posterior

entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de canales DHP-sensibles<sup>17</sup>. Además, es posible que la activación del sistema AMPc/PKA también module la actividad de las gonadotropas sola o juntamente con el sistema IP<sub>3</sub>/DAG<sup>17</sup>. Parece existir diferencias esenciales en el sistema AMPc/PKA entre gonadotropas y células clonales  $\alpha$ T3-1, puesto que su activación no tiene efectos aparentes sobre los cambios de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> en gonadotropas adenohipofisarias, pero favorece la entrada de Ca<sup>2+</sup> en las células  $\alpha$ T3-1<sup>17</sup>. Finalmente, esta línea celular carece de las oscilaciones características de gonadotropas primarias en la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducidas por GnRH, posiblemente por la atenuación del sistema de señalización Ca<sup>2+</sup>/IP<sub>3</sub><sup>25</sup>.

### Regulación por MAPK

Las MAPK son una familia de serina/treonina cinasas, que se activan rápidamente en respuesta a una amplia variedad de estímulos, y su función se relaciona con la transmisión de señales extracelulares hacia el núcleo<sup>7</sup>. La descripción de la activación de las MAPK a través de receptores acoplados a la proteína G por rutas Ras-dependientes e independientes<sup>7,26</sup>, permite incluir la posibilidad de acoplamiento de GnRH-R a las vías de transducción de MAPK (fig. 1).

En células  $\alpha$ T3-1, GnRH activa a varias subfamilias de MAPK: las cinasas reguladas por la señal extracelular (ERK), las jun N-terminal cinasas (JNK), las p38 MAPK y las big MAPK (BMK)<sup>11,27</sup>. En células  $\alpha$ T3-1 se ha descrito la activación rápida y sostenida de las formas de ERK1/2 por GnRH<sup>7</sup>. Alteraciones en el patrón de pulsos de GnRH también afectan a la respuesta de ERK. La exposición continua de las células  $\alpha$ T3-1 a GnRH favorece la actividad de ERK a corto plazo (2 h), mientras que la exposición pulsátil es necesaria para mantener y prolongar la activación de ERK. Además, la entrada de Ca<sup>2+</sup> a través de CCSV parece ser necesaria para la activación de ERK por GnRH en esta línea celular<sup>26,28</sup>.

La cascada ERK no es la única ruta por la que GnRH se comunica con el núcleo. La ruta JNK se activa, en respuesta a GnRH-a, en una extensión mayor que la cascada ERK<sup>26</sup>. En células  $\alpha$ T3-1 la activación de ERK es totalmente dependiente de PKC y se mantiene por una vía que se relaciona con c-Src, dinamina y Ras. Por otra parte, la cascada JNK es activada por una vía parcialmente dependiente de PKC que se relaciona con c-Src, CDC42/Rac1 y, probablemente, MEKK1, lo que conduce a la activación de JNK y a la inducción de c-jun en respuesta a GnRH<sup>11,27,28</sup>. El punto de divergencia entre las cascadas JNK y ERK parece ser la activación de proteína tirosincinasa (PTK) por PKC. La exposición de las células  $\alpha$ T3-1 a toxina pertussis bloquea la activación de MAPK por GnRH, lo que sugiere la existencia de una vía adicional de transducción de la señal a través de proteínas G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>, que coexiste con la transducción de la señal a través de G<sub>q</sub>/G<sub>11</sub><sup>7</sup>.

**TABLA 3. Características de la línea celular L $\beta$ T2**

<b>Procedencia</b>
Hipófisis procedentes de ratones transgénicos, transfectados con el oncogén antígeno T de SV40 + región reguladora de LH $\beta$ de rata (LH $\beta$ -Tag) <sup>5,6</sup>
Línea de gonadotropas diferenciadas de ratón <sup>5,6</sup>
<b>Regulación</b>
El patrón de pulsos de GnRH regula la secreción <sup>16,29,36</sup>
Concentraciones crecientes de GnRH potencian la producción de NO de manera dependiente de la dosis <sup>38</sup>
Activación por GnRH de cascadas MAPK <sup>34,35</sup>
Variaciones en la [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> , cualitativamente similares a gonadotropas y células $\alpha$ T3-1 <sup>36</sup>
<b>Expresan</b>
ARNm de GnRH-R <sup>5</sup>
LH biológicamente activa <sup>5,29</sup>
Receptores de estrógenos (ER $\alpha$ , ER $\beta$ , TERP-1) y receptores de progesterona (PR) <sup>7,30</sup>
Receptores PACAP <sup>37</sup>
ARNm de FSH $\beta$ <sup>31,39</sup>
Receptores de andrógenos (AR) funcional <sup>33</sup>

ER $\alpha$ : receptor de estrógenos  $\alpha$ ; ER $\beta$ : receptor de estrógenos  $\beta$ ; FSH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona foliculoestimulante; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; LH: hormona luteinizante; LH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona luteinizante; MAPK: proteincinásas activadas por mitógenos; NO: óxido nítrico; PACAP: polipeptido activador de la adenilciclasa de hipófisis; TERP-1: producto truncado del ER $\alpha$ .

## LÍNEA CELULAR L $\beta$ T2 (tabla 3)

La línea celular L $\beta$ T2 se obtuvo mediante expresión dirigida del antígeno SV40 T acoplado al promotor de la subunidad LH $\beta$  de rata, de manera análoga a la generación de la línea  $\alpha$ T3-1<sup>1,5,7</sup>; las células L $\beta$ T2 son una línea más diferenciada que sucede a las células  $\alpha$ T3-1 en el linaje de gonadotropas<sup>5,6</sup>. Expresan las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de LH, así como el GnRH-R<sup>5</sup>. Asimismo, secretan LH biológicamente activa en respuesta a GnRH, efecto que es incrementado tras exposición a esteroides<sup>5,29</sup>. La línea L $\beta$ T2 expresa receptores de estrógenos y receptores de progesterona inducibles por estrógenos<sup>7,30</sup>, activina<sup>31,32</sup> y el factor esteroidogénico-1 específico de células gonadotropas SF-1<sup>6</sup>, que regula, entre otras acciones, la expresión del receptor GnRH y de la subunidad LH $\beta$ <sup>5</sup>.

Aunque los resultados de estudios de caracterización previos en células L $\beta$ T2 parecían apoyar la hipótesis de que esta línea carece de la expresión del gen FSH $\beta$ <sup>5,6</sup>, recientemente se ha detectado la expresión inducible de ARNm de la subunidad  $\beta$  y la secreción de FSH<sup>31</sup>. No obstante, no se ha detectado la expresión de los genes de la subunidad  $\beta$  de TSH, razón por la que esta línea representa un modelo celular que se asemeja a gonadotropas totalmente diferenciadas procedentes de adenohipófisis de ratón adulto<sup>5,6</sup>.

## Regulación en células L $\beta$ T2

La línea L $\beta$ T2 es capaz de mantener respuestas similares a las observadas en células gonadotropas diferenciadas. Turgeon et al.<sup>29</sup> han caracterizado las respuestas secretoras a GnRH en la línea L $\beta$ T2 y han encontrado que responden a un pulso de GnRH (1-100 nM, 15 min) con un incremento dependiente de la do-

sis de la secreción de LH<sup>7,29</sup>. La respuesta secretora también se determinó frente a un régimen de pulsos diarios de 10 nM de GnRH (pulsos de 15 min, cada 90 min) durante 4 días, y se observó un incremento de la secreción de LH en respuesta al pulso inicial de GnRH, independiente del número de células en cultivo<sup>7,29</sup>. La respuesta secretora de LH frente al pulso inicial de GnRH era significativamente mayor cada día consecutivo de exposición a GnRH, que además se potenciaba por esteroides<sup>7,29</sup>. No obstante, las células L $\beta$ T2 no fueron capaces de mantener los valores en la respuesta secretora tras exposición a pulsos sucesivos de GnRH<sup>29</sup>. Los resultados obtenidos con altas concentraciones de K<sup>+</sup>, que despolariza directamente la membrana, han permitido comprobar que el régimen de pulsos de GnRH probablemente afecte a la ruta de síntesis/liberación de LH independientemente de los cambios en la respuesta del GnRH-R, alterando el paso limitante de la velocidad en la síntesis regulada y de la ruta de almacenamiento de LH en estas células, lo que no excluye que exista una lesión o lesiones adicionales en la maquinaria exocitótica<sup>29</sup>.

Las células L $\beta$ T2 responden a la administración pulsátil de GnRH y tras la exposición a estradiol y dexametasona, con un incremento de los valores de ARNm de GnRH-R. También se incrementan los valores de ARNm de LH $\beta$  tras pulsos de GnRH, sin que la exposición a esteroides tenga un efecto aparente<sup>7,29</sup>. Se han identificado receptores de andrógenos (AR) funcionales en la línea L $\beta$ T2<sup>33</sup>, característica que puede facilitar el análisis de su acción sobre las células adenohipofisarias y la disección de los mecanismos moleculares relacionados con la regulación por andrógenos de la producción y secreción de gonadotropinas<sup>33</sup>. En células L $\beta$ T2 también se han identificado receptores de estrógenos del tipo ER $\alpha$ , ER $\beta$  y TERP-1 y se ha descrito la modulación de la expresión del ARNm correspondiente por varios esteroides y por PACAP<sup>30</sup>.

## Regulación por segundos mensajeros

La unión de GnRH a su receptor activa muchas cascadas de señalización similares a otros receptores transmembrana que se acoplan a proteínas G heterotriméricas (GPCR)<sup>13</sup> (fig. 2). En células L $\beta$ T2 una de estas rutas lleva a la activación de varios miembros de la familia MAPK<sup>34</sup>.

La activación de ERK por GnRH se atenua tras exposición de las células L $\beta$ T2 al quelante de calcio EGTA (3 mM; 1 min) o al antagonista de canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo L nifedipino (1  $\mu$ M; 10 min), por lo que se sugiere que la activación de ERK es dependiente de calcio extra e intracelular<sup>34</sup>. Esta activación también parece implicar a varias isoformas de PKC, y es parcialmente bloqueada por la inhibición de la señalización y por la desensibilización de la PKC tras exposición crónica a forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)<sup>34</sup>.

Liu et al.<sup>34</sup> han descrito un nuevo mecanismo de translocación al núcleo de ERK activada, depen-

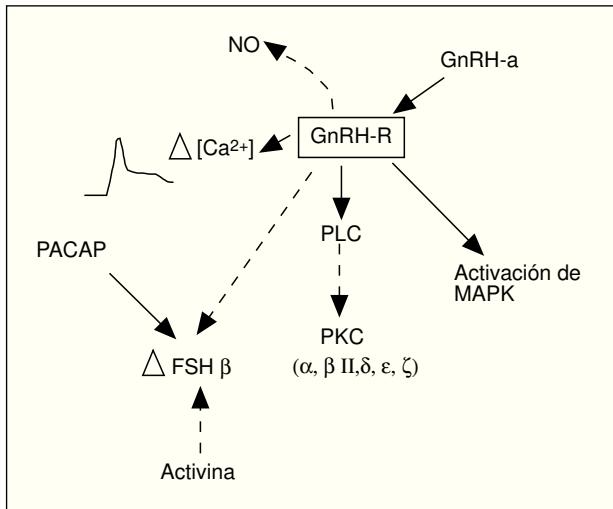


Fig. 2. Resumen de algunas vías de regulación en células L $\beta$ T2. GnRH-a: análogo de la hormona liberadora de gonadotropinas; FSH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona foliculoestimulante; MAPK: proteíncinasa activada por mitógenos; NO: óxido nítrico; PKC: proteíncinasa C.

diente de PKC en células L $\beta$ T2, y han encontrado que la expresión de las proteínas c-fos y de LH $\beta$  se regula de manera coordinada por GnRH a través de vías dependientes de Ca $^{2+}$  y MEK (cinasa de MAPK o MAPKK). Por otra parte, Yokoi et al<sup>35</sup> han evidenciado una cascada JNK que inicia la activación del promotor de LH $\beta$  por un mecanismo dependiente de c-jun. Parece que es la cascada JNK, pero no la ERK, la que se implica en la activación del promotor de la subunidad  $\beta$  de LH por GnRH. La PKC y el Ca $^{2+}$  no participan en la activación inducida por GnRH de JNK en células L $\beta$ T2. Probablemente la regulación de esta activación es diferente de la activación de ERK y parece que no está relacionada con la secreción de gonadotropinas<sup>35</sup>.

Otra diferencia entre la regulación de ambas cascadas de cinasas se relaciona con la respuesta a la toxina *pertussis*, cuya exposición origina una disminución en la activación de ERK por GnRH, pero que no evidencia efecto detectable sobre la activación de JNK en células L $\beta$ T2, lo que indica que las proteínas G sensibles a la toxina *pertussis* no están relacionadas con el efecto de GnRH sobre la actividad JNK<sup>35</sup>.

Las células L $\beta$ T2 responden a la administración pulsátil de GnRH con incrementos de los valores de ARNm de LH $\beta$  y de segundos mensajeros<sup>16,29</sup>. Así, pulsos de GnRH (10 $^{-7}$  M, 30 min) estimulan la producción de IP, efecto que puede suprimirse por el antagonista Dp-Glu1, D-Phe2, D-Try3, 6GnRH<sup>16</sup>. Sin embargo, la exposición previa a GnRH (10 $^{-7}$  M, 1 h) atenua significativamente la formación de IP<sup>16</sup>.

De la misma forma que en las células  $\alpha$ T3-1, el receptor GnRH en la línea L $\beta$ T2 está acoplado a la actividad de la PLC, PLA<sub>2</sub> y PLD; esto genera segundos mensajeros, que son esenciales para la activación de

isoformas específicas de PKC. Junoy et al<sup>16</sup> han identificado las isoenzimas PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ II,  $\delta$ ,  $\epsilon$  y  $\zeta$ . Sin embargo, no se ha descrito la expresión de las formas PKC  $\eta$ ,  $\gamma$  ni  $\theta$ . Este estudio también revela que los perfiles de desensibilización de la enzima PKC en estas células son similares a los observados en células clonales  $\alpha$ T3-1.

La línea L $\beta$ T2 se ha utilizado como modelo para estudios de secreción en células endocrinas. La caracterización de la variación en la [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> y de la exocitosis en células L $\beta$ T2 tras la exposición a GnRH y la despolarización de membrana indican que estas células responden a GnRH con cambios en la [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> y en la secreción de manera dependiente de la concentración<sup>36</sup>. Cuando las células son expuestas a GnRH (1 mM) se origina un incremento monofásico de pequeña amplitud en la [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub>, mientras que GnRH (10 nM) induce una respuesta bifásica de amplitud algo mayor. Debe señalarse que las variaciones en la [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> en células L $\beta$ T2 son cualitativamente similares a las que se observan en células clonales  $\alpha$ T3-1 y en células gonadotropas adenohipofisarias<sup>36</sup>. No obstante, carecen de las oscilaciones de gran amplitud características en la [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> que se observan en gonadotropas a concentraciones de GnRH inferiores a 1 nM<sup>36</sup>.

Tanto la exocitosis como la amplitud de los cambios en la [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> pueden ser moduladas por exposición de células L $\beta$ T2 a hormonas esteroideas, y tanto el estradiol como la dexametasona originan la movilización de [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub> y el incremento en la fase de espiga y en la sensibilidad del aparato secretor al Ca $^{2+}$ . Este incremento no fue evidente tras la despolarización directa de la membrana<sup>36</sup>.

Varios subtipos de receptores PVR-1 se expresan en células L $\beta$ T2. Parece que el PACAP es capaz de incrementar los valores de la subunidad FSH $\beta$  en estas células, que son deficientes en folistatina, efecto que puede mimetizarse por la forscolina<sup>37</sup>. La administración continua de GnRH también parece incrementar los valores de FSH $\beta$  en esta línea celular, respuesta que es similar en magnitud a la que se obtiene con PACAP<sup>37</sup> (fig. 2).

Otro segundo mensajero que es sintetizado y liberado por células L $\beta$ T2 es el óxido nítrico (NO) (fig. 2). Esta función parece estar regulada positivamente por GnRH. En estas células, además, se ha detectado la expresión de la isoenzima neuronal óxido nítrico sintasa (nNOS), pero no la endotelial (eNOS)<sup>38</sup>. La formación de NO requiere de calcio intracelular y calmodulina. La acción del ionóforo de calcio A23187 incrementa la producción de NO de manera dependiente de la dosis en estas células, lo que indica que la enzima nNOS se activa por incrementos en los valores en la [Ca $^{2+}$ ]<sub>i</sub>. Tras la exposición a GnRH también se incrementan los valores de NO de manera dependiente de la dosis, efecto que puede ser suprimido por pretratamiento con N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster (L-NAME)<sup>38</sup>.

## Regulación por péptidos

El estudio de la regulación de la FSH se ha dificultado por la carencia de cultivos altamente purificados de células gonadotropas y de líneas celulares de gonadotropas altamente diferenciadas con capacidad para expresar el gen de la subunidad FSH $\beta$  y secretar la forma activa de la hormona<sup>31</sup>. No obstante, la demostración de expresión inducible por activina del ARNm de la subunidad FSH $\beta$  y de la secreción de FSH en la línea clonal L $\beta$ T2 permite caracterizar las posibles acciones de la activina sobre estas células, así como otros aspectos dependientes de estradiol<sup>31,32</sup>. Las células L $\beta$ T2 expresan componentes del sistema activina, folistatina y la subunidad  $\alpha$  de la inhibina<sup>39</sup>. Graham et al<sup>31</sup> han señalado que, en condiciones basales, la secreción de FSH en células L $\beta$ T2 es mínima y no cambia tras 72 h en cultivo, y que un pulso único de GnRH (10 nM) no tiene efectos significativos sobre la secreción de FSH. Sin embargo, la exposición de las células a activina A induce incrementos en la secreción de FSH, y esta respuesta se potencia si se somete a las células simultáneamente a un pulso diario de GnRH. Parece que la activina es necesaria en la expresión de la subunidad FSH $\beta$  y para la secreción de FSH. Estos efectos son dependientes de la dosis, y parecen existir acciones sinérgicas entre la activina y GnRH<sup>31</sup> (fig. 2). Pernasetti et al<sup>39</sup> han demostrado que las células L $\beta$ T2 expresan ARNm de la subunidad FSH $\beta$ , y utilizan el ensayo altamente sensible RT-PCR sobre poly(A)<sup>+</sup> ARNm. De esta manera logran la detección de valores basales de FSH en células L $\beta$ T2 no detectados por Graham et al<sup>31</sup>. No obstante, concuerdan en la inducción de subunidad FSH $\beta$  por activina, expresión que es reprimida por acción de la folistatina en estas células<sup>39</sup>.

Las células L $\beta$ T2 sintetizan ARNm para los 4 tipos de receptores de activina. La capacidad para responder apropiadamente a la señal de activina, junto con la expresión de la subunidad  $\beta_B$  y de las 4 formas del ARN del receptor del péptido, parecen indicar que las células L $\beta$ T2 regulan la expresión del gen de la subunidad FSH $\beta$  de forma semejante a las células gonadotropas adenohipofisarias<sup>39</sup>.

La acción de GnRH estimula la transcripción de la subunidad FSH $\beta$  y la subunidad LH $\beta$ , y puede inhibirse por folistatina. La respuesta a GnRH probablemente dependa de la activina endógena<sup>39</sup>. Pernasetti et al han puesto de manifiesto la condición de un bucle autocrino de activina endógena, en la regulación por GnRH de los genes de las subunidades  $\beta$  de gonadotropinas, y han señalado la interacción entre GnRH y el sistema activina/folistatina en células L $\beta$ T2<sup>39</sup>. Las respuestas al péptido activina parecen ser no sólo específicas de la célula sino también del promotor. Un ejemplo es el promotor del GnRH-R, que se induce fuertemente por activina en estas células. También el promotor de la subunidad LH $\beta$  se induce por activina exógena en clones L $\beta$ T2<sup>39</sup>.

**TABLA 4. Características de la línea celular RC-4B/C**

<b>Procedencia</b>	Establecida a partir de adenomas hipofisarios obtenidos de ratas macho (ACI/Mai X F344/Mai)F1, de 3 años (Jackson Laboratory) <sup>9,40</sup>
<b>Regulación</b>	<p>Ultraestructuralmente, son células bien diferenciadas de adenohipófisis<sup>9,40</sup></p> <p>Porcentaje de células FSH<math>\beta</math>, PRL, ACTH y TSH<math>\beta</math> similar al de células hipofisarias en cultivo<sup>9,40</sup></p> <p>Porcentaje de células LH<math>\beta</math> superior y de células GH inferior al de células hipofisarias en cultivos primarios<sup>9,40</sup></p> <p>Células bihormonales</p> <p>Un 78% FSH<math>\beta</math> + LH<math>\beta</math></p> <p>Un 69% FSH<math>\beta</math> + PRL</p> <p>Un 27% LH<math>\beta</math> + PRL</p> <p>Un 5% GH + PRL</p> <p>Carece de células folículo-estrelladas que modulan la secreción hormonal de varios tipos celulares en la adenohipófisis<sup>9,40</sup></p> <p>Crecimiento lento: pases cada 2 semanas<sup>9,40</sup></p> <p>Expresión de gen retroviral de tipo C endógeno de rata<sup>9,40</sup></p> <p>GnRH-R: afinidad (Ka) del mismo orden que en células hipofisarias<sup>9</sup></p>
<b>Expresión</b>	<p>Receptores de estrógenos (ER<math>\alpha</math>, ER<math>\beta</math>, TERP-1)<sup>30</sup></p> <p>Útil en el estudio de la expresión, procesamiento y secreción del péptido galanina<sup>9,41</sup></p>

ACTH: adrenocorticotropina; ER $\alpha$ : receptor de estrógenos  $\alpha$ ; ER $\beta$ : receptor de estrógenos  $\beta$ ; FSH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona foliculoestimulante; GH: somatotropina; GnRH-R: receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas; LH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona luteinizante; PRL: prolactina; TERP-1: producto truncado del ER $\alpha$ ; TSH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la tirotropina.

## LÍNEA CELULAR RC-4B/C (tabla 4)

La línea de células epiteliales permanentes RC-4B/C se estableció a partir de un adenoma de hipófisis desarrollado espontáneamente, procedente de una rata macho CAI/Fmai x F344/Fmai (F1) de 3 años de edad<sup>9,40</sup>. La caracterización parcial de la línea RC-4B/C muestra que contiene todos los tipos de células secretoras de la adenohipófisis, e incluye las células gonadotropas, pero que carece de células folículo-estrelladas<sup>9,40</sup>. La proporción entre los tipos celulares en la línea RC-4B/C es distinta de la que se encuentra en dispersiones primarias de adenohipófisis<sup>9,40</sup>. Probablemente, esta proporción está en función de la presencia de esteroides en el suplemento sérico semisintético Nu-Serum, que reemplazó progresivamente el suero bovino fetal (FBS) en el medio de cultivo, ya que con su uso se obtuvo un mejor crecimiento celular y el mantenimiento del fenotipo de gonadotropas. Nu-Serum contiene, entre otros componentes, un 25% de suero bovino, 3,40 ng/ml de 17- $\beta$  estradiol, 4,25 ng/ml de progesterona y 3,86 ng/ml de testosterona<sup>40</sup>.

Los análisis cuantitativos realizados en la línea celular RC-4B/C han mostrado que el porcentaje entre los distintos tipos celulares presentes ha sufrido una alteración en la línea. Polkowska et al<sup>40</sup> determinaron variaciones cuantitativas en el porcentaje de tipos celulares al compararlos con los datos establecidos por Hurbain-Kosmath et al<sup>9</sup>. Posiblemente el drástico tratamiento con antibióticos al que se sometieron estas células para eliminar la contaminación por *Mycoplas-*

ma arginini haya determinado que tipos celulares concretos no sobreviviesen<sup>9</sup>.

Las células RC-4B/C expresan receptores TERP-1, ER $\alpha$  y ER $\beta$  y receptores GnRH con una afinidad (Ka) del mismo orden que en células adenohipofisarias, pero con una capacidad de unión dos veces menor<sup>30</sup>. Esta característica garantiza su uso como modelo adicional en el estudio de la acción de GnRH-R y de la regulación a largo plazo de la función gonadotropa<sup>40</sup>. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que sólo una pequeña fracción de estas células expresa los genes de las subunidades  $\beta$  de las gonadotropinas. Tampoco se ha demostrado que las gonadotropinas sean sintetizadas y secretadas de forma análoga a como se produce *in vivo*<sup>40</sup>.

La línea RC-4B/C contiene células con varias combinaciones de hormonas, y las células bihormonales coexisten con células productoras de hormonas individuales o monohormonales. El fenotipo de la célula bihormonal es más frecuente que el de las células monohormonales; el primero predomina en las gonadotropas<sup>40</sup>. Se ha sugerido que las células monohormonales podrían constituir en realidad células multipotenciales, lo que indica la posible existencia de una célula madre común en esta línea. Una de las razones para apoyar esta hipótesis ha sido la imposibilidad de clonar células gonadotropas procedentes de células RC-4B/C. Cada clon individual se desarrolla en una línea celular con aproximadamente la misma composición que la población celular de partida<sup>40</sup>.

Análisis adicionales indican que las células RC-4B/C expresan ARNm de galanina, idéntico que el tránscribo de galanina procedente de células adenohipofisarias, pero parece que sólo una subpoblación de células en la línea RC-4B/C produce el ARNm y el péptido de galanina; se desconoce el tipo celular de esta subpoblación<sup>9,41</sup>.

Una característica distintiva de las células RC-4B/C es la expresión del gen retroviral de rata de tipo C. La aparición de las partículas retrovirales se asocia a la adquisición de la capacidad para sobrevivir al almacenamiento criogénico en la línea celular RC-4B/C, una propiedad de la que carecía antes del cambio morfológico en la superficie celular, por lo que la aparición ultraestructural del retrovirus representa una transformación asociada a la desrepresión de un genoma tipo C endógeno<sup>9</sup>.

## LÍNEA CELULAR MtTW-10 (tabla 5)

Los tumores trasplantables de rata MtTW derivan de tumores espontáneos procedentes de la adenohipófisis de ratas hembras de la cepa Wistar-Furth, de 2 años de edad. Estos tumores se propagaron por trasplantes seriados bajo la cápsula renal de ratas de la misma cepa y se asemejan a adenomas procedentes de hipófisis humanas<sup>42</sup>. Las células MtTW se caracterizan por una rápida velocidad inicial de crecimiento, y

**TABLA 5. Características de la línea celular MtT-W10**

*Procedencia*

Tumor trasplantable de rata. Derivan de ratas hembras Wistar-Furth de 2 años de edad. Este tumor puede dividirse para inyectarlo subcutáneamente en la región supraescapular. Son recuperados a las 5-11 semanas del desarrollo tumoral<sup>8</sup>

*Regulación*

Los tumores MtTW secretan GH y PRL cuando son trasplantados a hospedadores isólogos<sup>8,43</sup>  
Inducen cambios en la morfología celular en células de adenohipófisis en los animales receptores<sup>43</sup>  
Se inducen por largos períodos de exposición a hormonas estrogénicas<sup>44,45</sup>

Útiles para el estudio *in vitro* de factores que regulen la actividad del promotor del gen de la galanina<sup>44,45</sup>

GH: somatotropina; PRL: prolactina.

posteriormente se estabiliza el tamaño del tumor. Los cambios en la concentración de hormonas que se observan en la sangre de los animales receptores pueden correlacionarse con el crecimiento del trasplante tumoral, lo que refleja que las hormonas liberadas por tumores MtTW son biológicamente activas<sup>8,42</sup>.

Los tumores de adenohipófisis MtTW-10 secretan grandes cantidades de hormonas y ofrecen un excelente sistema experimental para mantener una secreción alta y continua de hormonas. Secretan preferentemente GH y, en menor grado, PRL, pero carecen de actividad corticotropa apreciable<sup>8</sup>. No se ha detectado inmunorreactividad a LH y TSH en el medio de cultivo de las células MtTW-10, incluso tras exposición a GnRH, CRH o TRH. La PRL inmunorreactiva y la GH fueron detectadas tanto en la misma célula como en tipos celulares aislados<sup>42</sup>.

Los tumores MtTW pueden ser útiles en el estudio de los factores causantes de la alteración en la proliferación y el crecimiento de células lactotropas y somatotropas procedentes de la hipófisis de animales receptores<sup>42</sup>. El contenido de GH y PRL exógena reduce la cantidad de hormonas endógenas en animales receptores del injerto, pero se incrementan los valores del factor inhibidor de PRL en el hipotálamo de estos animales<sup>8</sup>. El tumor MtTW-10 también es efectivo en la reducción del peso de la adenohipófisis del animal trasplantado. Puede que esta reducción sea consecuencia de cambios celulares producidos en la adenohipófisis y probablemente este efecto se relacione directamente con los cambios observados en células somatotropas, ya que este tipo celular constituye la población más numerosa en esta glándula, aunque también son significativos los cambios en células lactotropas. La variación en el peso de la adenohipófisis es improbable que se produzca por valores crecientes en el flujo sanguíneo de corticosteroides<sup>8</sup>.

Morfológicamente, la supresión de células somatotropas y lactotropas se manifiesta por una reducción en el diámetro de los gránulos secretores en lactotropas, sin que se produzca un cambio significativo en la cantidad de gránulos totales por célula y una disminución en el tamaño celular y el número de gránulos en

TABLA 6. Breve descripción de algunas respuestas fisiológicas en células y líneas celulares gonadotropas

Variables biológicas manipulables experimentalmente (receptores, agonistas, señales intracelulares, etc.)	Respuesta fisiológica	Cultivo primario o célula aislada; línea celular
GnRH-R	<p><i>Regulación</i><sup>7,14,19,22,23,46,47</sup></p> <p>Homóloga GnRH ↑↓</p> <p><i>Heteróloga</i></p> <p>Estradiol ↑↓ Progesterona ↑ Activina ↑ Folistatina ↓</p> <p>Liberación de GnRH y gonadotropinas tras activación de GnRH-R<sup>7,11,48</sup></p> <p>Produce incrementos bifásicos de la <math>[Ca^{2+}]</math> citosólico. Su acción parece estar acoplada a la elevación oscilatoria en la <math>[Ca^{2+}]_i</math>, a bajas dosis de agonista<sup>7,13,36,49</sup></p> <p>Autoestimulación o <i>self-priming</i>: aumento de la sensibilidad de la célula gonadotropa a los efectos estimuladores de un segundo pulso de GnRH, mantenido por la producción local de GnRH. Mecanismos potenciales incluyen: cambio en el número de GnRH-R, la expresión génica y la reorganización del citosqueleto<sup>46,48</sup>. No se observa en las líneas clonales<sup>28</sup></p> <p>Producción local en glándula adenohipófisis. Se sugieren acciones autocrinas y paracrinas (señalización celular, secreción).</p> <p>Demostración de cosecreción con LH<sup>46,48</sup></p> <p>Regulación del ciclo celular<sup>10,48</sup> y de la producción <i>de novo</i> de gonadotropinas<sup>10,11</sup></p> <p>Secreción modulada y diferencial, según régimen de pulsos, de LH y FSH e incremento en la expresión de GnRH-R tras exposición pulsátil a agonista y E<sub>2</sub><sup>29</sup></p> <p>Regulación de la expresión de LH<math>\beta</math> y FSH<math>\beta</math><sup>7,29,36,39</sup></p>	Cultivos primarios; $\alpha$ T3-1; L $\beta$ T2
GnRH	<p>Oscilaciones espontáneas, típicas de células endocrinas excitables (gonadotropas, lactotropas, corticotropas, somatotropas), en gran parte como resultado de las propiedades de inactivación lenta de CCSV.</p> <p>La liberación basal de LH y FSH es independiente del Ca<sup>2+</sup>, consistente con el control hipotalámico positivo <i>in vivo</i> (excepto células PRL)<sup>49</sup></p> <p>La respuesta bifásica se asocia con la liberación de LH<sup>25</sup></p> <p>La progestерona altera la magnitud de las señales, estimuladas por GnRH<sup>46</sup>.</p> <p>La acción de GnRH da lugar a una respuesta bifásica espiga-meseta de la respuesta de calcio intracelular. Se supone que además, que interviene un componente de membrana en la producción de la fase en espiga, independiente de calcio extracelular<sup>13,24,36,49</sup></p> <p>Se infiere que otros segundos mensajeros, además del calcio, regulan la exocitosis en gonadotropas y que estas vías son moduladas por hormonas esteroideas<sup>36,38</sup></p> <p>Expresión de receptores de IP<sub>3</sub><sup>19,22,46</sup></p> <p>Incremento de IP<sub>3</sub> total tras la estimulación con GnRH<sup>19,22,46</sup></p> <p>Producción de DAG por la ruta de la PLD, que mantiene una actividad prolongada de PLC<sup>46</sup></p>	<p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1</p> <p>Cultivos primarios; células gonadotropas aisladas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p><i>In vivo</i>; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; L<math>\beta</math>T2</p> <p><i>In vivo</i>; cultivos primarios; células gonadotropas aisladas</p>
Ca <sup>2+</sup>	<p>Inhibición de la acumulación de IPs por E<sub>2</sub><sup>7</sup></p> <p>Modulación de las vías de transducción de la señal en las que actúan el calcio y PKC<sup>19,21</sup></p> <p>Incremento del número de GnRH-R por exposición crónica a E<sub>2</sub> y disminución por exposición aguda<sup>19</sup></p> <p>Regulación, junto a GnRH, del ciclo celular<sup>20,51</sup></p> <p>Modulador de la señal de GnRH<sup>20,22,23</sup></p> <p>Regulación de la secreción y expresión de LH y FSH<sup>22,29</sup></p> <p>Regulación de la expresión de ER<math>\alpha</math>, ER<math>\beta</math> y TERP-I<sup>30</sup></p>	<p>Células gonadotropas; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas normales</p> <p>Cultivos primarios; <math>\alpha</math>T3-1</p> <p>Células gonadotropas, <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas, L<math>\beta</math>T2</p> <p><i>In vivo</i>; cultivos primarios adenohipofisarios; células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p><math>\alpha</math>T3-1</p> <p>Células gonadotropas; L<math>\beta</math>T2</p>
DAG/IP		
Estradiol/ER		
PACAP	<p>Incrementos en la concentración de <math>[Ca^{2+}]_i</math><sup>18</sup></p> <p>Estimula la secreción de gonadotropinas<sup>37</sup></p> <p>Los ésteres de forbol inhiben la acumulación de AMPc estimulada por PACAP, probablemente por inhibición de la adenilciclasi<sup>13,15</sup></p> <p>Estimulación de la liberación de calcio a través de receptores de IP<sub>3</sub><sup>17</sup></p> <p>Modulación de la transcripción del gen de folistatina y reducción del nivel de ARNm de FSH<math>\beta</math><sup>37</sup></p> <p>Regulación de la expresión de la subunidad <math>\alpha</math><sup>17</sup></p>	<p>Cultivos primarios; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p> <p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2</p>
AMPc/PKA	<p>Incrementos de AMPc citosólico promueven la activación de la PKA y la entrada de calcio a través de canales sensibles a DPH<sup>17</sup></p>	<p>Células gonadotropas; <math>\alpha</math>T3-1; L<math>\beta</math>T2, <math>\alpha</math>T3-1</p> <p>Células gonadotropas</p>

(Continúa en página siguiente)

TABLA 6. (Continuación)

Variables biológicas manipulables experimentalmente (receptores, agonistas, señales intracelulares, etc.)	Respuesta fisiológica	Cultivo primario o célula aislada; línea celular
PKC	PKC $\alpha$ , $\beta$ pero no $\epsilon$ son necesarias en la exocitosis regulada <sup>46</sup> Implicada en el mecanismo de <i>self-priming</i> <sup>46</sup> La activación de la PKC ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la entrada de calcio <sup>7,13</sup> La activación de la PKC activa transitoriamente la entrada de calcio, seguida por una fase de inactivación <sup>7,9</sup>	Células gonadotropas Células gonadotropas; $\alpha$ T3-1 $\alpha$ T3-1
LH/FSH	Sensible a la administración de E <sub>2</sub> <sup>23</sup> Expresión inducible de la subunidad FSH $\beta$ por activina y reprimible por follistatina <sup>31,32</sup>	Células gonadotropas Cultivos primarios adenohipofisarios; células gonadotropas; L $\beta$ T2

\*Algunas de las acciones fisiológicas descritas en células hipofisarias (cultivo primario) y en las líneas clonales  $\alpha$ T3-1 y L $\beta$ T2. Se especifica el factor y la respuesta biológica. Los superíndices indican la referencia bibliográfica correspondiente.

↑: regulación positiva; ↓: desensibilización; CCSV: canales de calcio sensibles al voltaje; DAG: diacilglicerol; E<sub>2</sub>: estradiol; ER: receptor de estrógenos; FSH: hormona foliculoestimulante; FSH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona foliculoestimulante; GnRH: hormona liberadora de gonadotropinas; IP: inositol fosfato; IP<sub>3</sub>: inositol-1,4,5-trifosfato; LH: hormona luteinizante; LH $\beta$ : subunidad  $\beta$  de la hormona luteinizante; PACAP: polipeptido activador de la adenilciclasa de hipófisis; PKA: proteincinasa A; PKC: proteincinasa C; PLC: fosfolipasa C; PLD: fosfolipasa D; TERP-1: producto truncado del ER $\alpha$ .

las células somatotropas; esta supresión es paralela al crecimiento del tumor. No obstante, las células gonadotropas procedentes de la adenohipófisis de animales receptores aumentaron su tamaño y acumularon gránulos secretores, de manera similar a las células procedentes de la adenohipófisis de ratas tratadas con andrógenos<sup>8</sup>.

Un péptido que es sintetizado y secretado por células MtTW-10, tanto *in vivo* como *in vitro*, es la galanina<sup>43</sup>, por lo que estas células tumorales podrían ser útiles en el estudio de la regulación del gen de galanina y servir como sistema *in vitro* en el estudio de los factores que regulan la actividad del promotor del gen<sup>44</sup>. Se ha detectado en tumores MtTW-10 un solo tipo de transcrito de galanina, de 0,9 kb, idéntico en tamaño que el caracterizado en la adenohipófisis<sup>43</sup>. Los mecanismos del procesamiento postransduccional que convierten la preprogalanina en el péptido galanina parecen conservarse en las células MtTW-10. Sin embargo, la regulación de la secreción del péptido galanina *in vitro* parece ser diferente de la que se observa en cultivos de células de adenohipófisis<sup>43</sup>.

La secreción de galanina puede inhibirse por somatostatina en células MtTW-10 de manera dependiente de la dosis. La dopamina, la GHRH, la GnRH, la CRH y la TRH no tienen efecto en la liberación de galanina. No obstante, a concentraciones farmacológicas de dopamina (1  $\mu$ M), la secreción de galanina se inhibe en un 15% en células MtTW-10. En estas células sólo la somatostatina y las concentraciones farmacológicas de dopamina afectan a la secreción de galanina<sup>43</sup>.

El estradiol incrementa la expresión y la secreción de la galanina en tumores MtTW-10<sup>43,44</sup>. No se conoce si el estradiol actúa directamente en las células galanina inmunorreactivas, o si otros tipos celulares median los efectos del estradiol a través de una acción paracrína. Tampoco se descarta que estas células posean receptores de estrógenos funcionales<sup>43</sup>. Un indicio de que el

receptor de estrógenos puede ser necesario para mantener valores elevados de galanina en células MtTW-10 lo forman los resultados obtenidos *in vitro* en células de adenohipófisis por el antagonista ICI 164,384, que disminuye la secreción de galanina unas 6 veces<sup>44</sup>. Aunque se desconoce el tipo o los tipos celulares productores de galanina en el tumor MtTW-10, los resultados en las hipófisis estrogenizadas parecen indicar que la galanina es sintetizada por células lactotropas<sup>45</sup>.

## CONCLUSIONES

La evidente utilidad de las líneas celulares en la investigación de los procesos que intervienen y caracterizan las funciones propias de la glándula adenohipofisaria justifica este trabajo, en el que no se ha pretendido una revisión pormenorizada de las características de las líneas celulares anteriormente descritas, sino un comentario respecto a ciertos aspectos relevantes de su biología celular y las vías de señalización identificadas (tabla 6).

Tradicionalmente, el estudio de la regulación de la función adenohipofisaria ha utilizado la metodología *in vivo* o bien un sistema complejo *in vitro*, como la glándula hipofisaria aislada<sup>4,23</sup>. Esta aproximación, aunque resulta válida y necesaria, dificulta enormemente la descripción y la interpretación de procesos a escala celular y molecular, debido, en gran parte, a las características intrínsecas de esta glándula endocrina<sup>2,3</sup>. A este respecto, los cultivos primarios de células adenohipofisarias son un modelo útil en la descripción de los mecanismos que controlan los procesos fisiológicos y tienen como ventajas que permiten un control preciso de las variables del medio y representan, además, una alternativa a los estudios *in vivo*<sup>45,48-50</sup>. Un logro importante en esta dirección, ya mencionado anteriormente, es la obtención de líneas inmortales representativas de tipos celulares adenohipofisarios, mo-

noclonales<sup>1,5,6,29</sup> o policlonales<sup>8,9</sup>, que mantienen una función diferenciada. Estos sistemas facilitan en gran medida el análisis detallado de los mecanismos que regulan la función adenohipofisaria, afirmación que es especialmente cierta en el caso de las células gonadotropas<sup>49</sup>. Sin embargo, los sistemas de cultivo celular representan modelos *in vitro*, por lo que la interpretación de los resultados debe tener siempre en cuenta que carecen de los componentes sistémicos de regulación nerviosa y endocrina de la adenohipófisis. Tampoco resultan adecuados como modelos de cambios fisiológicos en respuesta a las variaciones en el ciclo reproductivo en mamíferos, para cuyo estudio resulta indispensable la metodología *in vivo*<sup>28</sup>. Otras desventajas son la pérdida de la organización espacial tridimensional propia del tejido y de las interacciones paracrinas entre los distintos tipos celulares en cultivos primarios adenohipofisarios<sup>45,52</sup>, con la consiguiente modificación de la comunicación celular, por lo que la actividad observada en cultivo no refleja necesariamente el comportamiento de las células *in situ*<sup>23</sup>. Además, las diferencias específicas de especie, así como de sexo, observadas entre los modos de transducción y respuestas de los distintos tipos celulares en algunos casos, son un factor importante que muchas veces dificulta la comprensión del fenómeno observado<sup>13</sup>.

Entre los inconvenientes importantes de las líneas clonales, está la aparición de respuestas fisiológicas nuevas relacionadas con su origen tumoral<sup>7</sup>, como la pérdida de la actividad oscilatoria espontánea en la  $[Ca^{2+}]_i$  en las líneas  $\alpha$ T3-1 y L $\beta$ T2, quizás relacionada con la carencia de regulación directa por el hipotálamo<sup>47,49,51</sup>, actividad que está presente en células gonadotropas procedentes de cultivos primarios<sup>49</sup>; también puede modificarse el porcentaje y la composición celular respecto a los fenotipos de la adenohipófisis<sup>9,40</sup>, resultado de la tasa de crecimiento diferencial de algunos tipos celulares y de la modificación de procesos reguladores clave y/o de la expresión génica, característica propia de líneas policlonales, como la MtTW-10 y la RC4B/C. Otra desventaja es la obtención de subclones diferentes como consecuencia del número de pases y las condiciones de cultivo particulares de cada laboratorio. A pesar de los inconvenientes anteriormente citados, las líneas celulares representan sistemas útiles que permiten logros sustanciales en la diseción de mecanismos celulares inaccesibles a las condiciones *in vivo*<sup>10</sup>; de esta manera se facilita la comprensión de los procesos fisiológicos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Windle JJ, Weiner RI, Mellon PL. Cell lines of the pituitary gonadotrope lineage derived by targeted oncogenesis in transgenic mice. Mol Endocrinol 1990;4:597-603.
2. Dubois PM, El Amraoui A, Héritier AG. Development and differentiation of pituitary cells. Microsc Res Tech 1997;39: 98-113.
3. Scully KM, Rosenfeld MG. Pituitary development: regulatory codes in mammalian organogenesis. Science 2002;295:2231-5.
4. Japón MA, Rubinstein M, Low MJ. In situ hybridization analysis of anterior pituitary hormone gene expression during fetal mouse development. J Histochem Cytochem 1994;42:1117-25.
5. Alarid ET, Holley S, Hayakawa M, Mellon PL. Discrete stages of anterior pituitary differentiation recapitulated in immortalized cell lines. Mol Cel Endocrinol 1998;140:25-30.
6. Alarid ET, Windle JJ, Whyte DB, Mellon PL. Immortalization of pituitary cells at discrete stages of development by directed oncogenesis in transgenic mice. Development 1996;122:3319-29.
7. Kaiser UB, Conn PM, Chin WW. Studies of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) action using GnRH receptor-expressing pituitary cell lines. Endocr Rev 1997;18:46-70.
8. Nakayama I, Nickerson PA. Suppression of anterior pituitary in rats bearing a transplantable growth hormone and prolactin-secreting tumor (MtT-W10). Endocrinology 1973;92:516-24.
9. Hurbain-Kosmath I, Berault A, Noel N, Polkowska J, Bohin A, Jutisz M, et al. Gonadotropes in a novel rat pituitary tumor cell line, RC-4B/C. Establishment and partial characterization of the cell line. In Vitro Cell Dev Biol 1990;26:431-40.
10. Sosnowski R, Mellon PL, Lawson MA. Activation of translation in pituitary gonadotrope cells by gonadotropin-releasing hormone. Mol Endocrinol 2000;14:1811-9.
11. Kraus S, Naor Z, Seger R. Intracellular signaling pathways mediated by the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) receptor. Arch Med Res 2001;32:499-509.
12. Johnson MS, MacEwan DJ, Simpson J, Mitchell R. Characterization of protein kinase C isoforms and enzymatic activity from the  $\alpha$ T3-1 gonadotroph-derived cell line. FEBS 1993; 333:67-72.
13. Merelli F, Stojilković SS, Iida T, Krsmanovic LZ, Zheng L, Mellon PL, et al. Gonadotropin-releasing hormone-induced calcium signaling in clonal pituitary gonadotrophs. Endocrinology 1992;131:925-32.
14. McArdle CA, Forrest-Owen W, Willars G, Davidson J, Poch A, Kratzmeier M. Desensitization of gonadotropin-releasing hormone action in the gonadotrope-derived  $\alpha$ T3-1 cell line. Endocrinology 1995;136:4864-71.
15. McArdle CA, Forrest-Owen W. Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) actions on  $\alpha$ T3-1 gonadotrophs show desensitization. J Neuroendocrinol 1997;9:893-901.
16. Junoy B, Maccario H, Mas J, Enjalbert A, Drouva SV. Proteasome implication in phorbol ester- and GnRH-induced selective down-regulation of PKC ( $\alpha$ ,  $\epsilon$ ,  $\zeta$ ) in  $\alpha$ T3-1 and L $\beta$ T2 gonadotropes cell lines. Endocrinology 2002;143:1386-403.
17. Hezareh M, Schlegel W, Rawlings SR. Stimulation of  $Ca^{2+}$  influx in  $\alpha$ T3-1 gonadotrophs via the cAMP/PKA signaling system. Am J Physiol 1997;273:E850-E8.
18. Schomerus E, Poch A, Bunting R, Mason WT, McArdle CA. Effects of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide in the pituitary: activation of two signal transduction pathways in the gonadotrope-derived  $\alpha$ T3-1 cell line. Endocrinology 1994;134:315-23.
19. McArdle CA, Schomerus E, Gröner I, Poch A. Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone receptor number, growth and inositol phosphate production in  $\alpha$ T3-1 cells. Mol Cell Endocrinol 1992;87:95-103.
20. Williams B, Brooks AN, Aldridge TC, Pennie WD, Stephenson R, McArdle CA. Oestradiol is a potent mitogen and modulator of GnRH signalling in  $\alpha$ T3-1 cells: are these effects causally related? J Endocrinol 2000;164:31-43.
21. Shreihof DA, Resnick EM, Lin V, Shupnick MA. Ligand-independent activation of pituitary ER: Dependence on PKA-stimulated pathways. Endocrinology 2001;142:3361-8.
22. Ortmann O, Bakhit M, Bloh P, Schulz K-D, Emons G. Ovarian steroids modulate gonadotropin-releasing hormone-induced biphasic luteinizing hormone secretory responses and inositol

- phosphate accumulation in rat anterior pituitary cells and  $\alpha$ T3-1 gonadotrophs. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995;54:101-9.
23. Drouva SV, Gorenne I, Laplante E, Rérat E, Enjalbert A, Kordon C. Estradiol modulates Protein Kinase C activity in the rat pituitary in vivo and in vitro. *Endocrinology* 1990;126:536-44.
24. McArdle CA, Forrest-Owen W, Davidson JS, Fowkes R, Bunting R, Mason WT, et al. Ca<sup>2+</sup> entry in gonadotrophs and  $\alpha$ T3-1 cells: does store-dependent Ca<sup>2+</sup> influx mediate gonadotropin-releasing hormone action? *J Endocrinol* 1996;149:155-69.
25. Bosma MM, Hille B. Electrophysiological properties of a cell line of the gonadotrope lineage. *Endocrinology* 1992;130:3411-20.
26. Levi NL, Hanoch T, Benard O, Rozenblat M, Harris D, Reiss N, et al. Stimulation of Jun N-terminal Kinase (JNK) by gonadotropin-releasing hormone in pituitary  $\alpha$ T3-1 cell line is mediated by protein kinase C, c-Src, and CDC42. *Mol Endocrinol* 1998;12:815-24.
27. Naor Z, Bernard O, Seger R. Activation of MAPK cascades by G-protein-coupled receptors: the case of gonadotropin-releasing hormone receptor. *TEM* 2000;11:91-9.
28. Johnson MS, Lutz EM, MacKenzie CJ, Wolbers WB, Robertson DN, Holland PJ, et al. Gonadotropin-releasing hormone receptor activation of extracellular signal-regulated kinase and tyrosine kinases in transfected GH3 cells and in  $\alpha$ T3-1 cells. *Endocrinology* 2000;141:3087-97.
29. Turgeon JL, Kimura Y, Waring DW, Mellon PL. Steroid and pulsatile gonadotropin releasing hormone (GnH) regulation of luteinizing hormone and GnRH receptor in a novel gonadotrope cell line. *Mol Endocrinol* 1996;10:439-50.
30. Schreihofner DA, Stoler MH, Shupnik MA. Differential expression and regulation of Estrogen Receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: Estrogen decreases ER $\alpha$  protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* 2000;141:2174-83.
31. Graham KE, Nusser KD, Low MJ. L $\beta$ T2 gonadotroph cells secrete follicle stimulating hormone (FSH) in response to activin A *J Endocrinol* 1999;162:R1-5.
32. Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, Bailey JS, Huang H, Miller WL, et al. Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone- $\beta$  by activin and gonadotropin-releasing hormone in the L $\beta$ T2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 2001;142:2284-94.
33. Lawson MA, Li D, Glidewell-Kenney CA, López FJ. Androgen responsiveness of the pituitary gonadotrope cell line L $\beta$ T2. *J Endocrinol* 2001;170:601-7.
34. Liu F, Austin DA, Mellon PL, Olefsky JM, Webster NJG. GnRH activates ERK1/2 leading to the induction of c-fos and LH $\beta$  protein expression in L $\beta$ T2 *Mol Cell Endocrinol* 2002;16:419-34.
35. Yokoi T, Ohmichi M, Tasaka K, Kimura A, Kanda Y, Hayakawa J, et al. Activation of the luteinizing hormone  $\beta$  promoter by gonadotropin-releasing hormone requires c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal protein kinase. *J Biol Chem* 2000;275:21639-47.
36. Thomas P, Mellon PL, Turgeon JL, Waring DW. The L $\beta$ T2 clonal gonadotrope: a model for single cell studies of endocrine cell secretion. *Endocrinology* 1996;137:2979-89.
37. Fujii Y, Okada Y, Moore JP, Dalkin AC, Winters SJ. Evidence that PACAP and GnRH down-regulates follicle-stimulating hormone- $\beta$  mRNA levels by stimulating follistatin gene expression: effects on folliculostellate cells, gonadotrophs and L $\beta$ T2 gonadotroph cells. *Mol Cell Endocrinol* 2002;192:55-64.
38. Chen L, Sakai T, Sakamoto S, Kato M, Inoue K. Direct evidence of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-stimulated nitric oxide production in the L $\beta$ T2 clonal gonadotropes. *Pituitary* 1999;2:191-6.
39. Pernasetti F, Vasilyev VV, Rosenberg SB, et al. Cell-specific transcriptional regulation of follicle-stimulating hormone- $\beta$  by activin and gonadotropin-releasing hormone in the L $\beta$ T2 pituitary gonadotrope cell model. *Endocrinology* 2001;142:2284-95.
40. Polkowska J, Béral A, Hurbain-Kosmath I, Jolly G, Jutisz M. Bihormonal cells producing gonadotropins and prolactin in a rat pituitary tumor cell line (RC-4B/C). *Neuroendocrinology* 1991;54:267-73.
41. Hyde JF, Cai A, Moore JP. Characterization of a pituitary cell line producing the peptide galanin. *Soc Neurosci* 1996;22:1591.
42. Trouillas J, Chevalier P, Remy C, Rajas F, Cohen R, Calle A, et al. Differential actions of the dopamine agonist bromocriptine on growth of SM $\beta$ TW tumors exhibiting a prolactin and/or a somatotroph cell phenotype: relation to dopamine D<sub>2</sub> receptor expression. *Endocrinology* 1999;140:13-21.
43. Hyde JF, Morrison DG, Moore JP, Howard G. MtTW-10 pituitary tumor cells: galanin gene expression and peptide secretion. *Endocrinology* 1993;133:2588-93.
44. Howard G, Peng L, Hyde JF. An estrogen receptor binding site within the human galanin gene. *Endocrinology* 1997;138:4649-56.
45. Evans JJ. Modulation of gonadotropin levels by peptides acting at the anterior pituitary gland. *Endoc Rev* 1999;20:46-67.
46. Anderson L. Intracellular mechanisms triggering gonadotropin secretion. *Rev Reprod* 1996;1:193-202.
47. Ortmann O, Diedrich K. Pituitary and extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *Hum Reprod* 1999;14(Suppl 1):194-206.
48. Krsmanovic LZ, Martínez-Fuentes AJ, Arora KK, Mores N, Tomic M, Stojilkovic SS, et al. Local regulation of gonadotroph function by pituitary gonadotropin-releasing hormone. *Endocrinology* 2000;141:1187-95.
49. Stojilkovic SS, Catt KJ. Calcium oscillations in anterior pituitary cells. *Endocr Rev* 1992;13:256-80.
50. Lewy H, Ashkenazi IE, Naor Z. Gonadotropin releasing hormone (GnRH) and estradiol (E2) regulation of cell cycle in gonadotrophs. *Mol Cell Endocrinol* 2003;203:25-32.
51. Trueta C, Díaz M, Vaca LA, Clapp C, Martínez de la Escalera G. Functional uncoupling between intracellular calcium dynamics and secretion in the  $\alpha$ T3-1 gonadotropic cell line. *J Cell Physiol* 1999;179:347-57.
52. Schwartz J. Intercellular communication in the anterior pituitary. *Endocr Rev* 2000;21:488-513.