



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO
INTEGRADO EM MEDICINA**

LILIANA RAFAELA TELES REIS

PROLACTINA - HORMONA PLEIOTRÓPICA

ARTIGO DE REVISÃO

ÁREA CIENTÍFICA DE ENDOCRINOLOGIA

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:
DR.^a MARIA LEONOR VIEGAS GOMES
PROFESSORA DOUTORA MANUELA REBELO CARVALHEIRO**

SETEMBRO/2011

PROLACTINA – HORMONA PLEIOTRÓPICA

Liliana Rafaela Teles Reis

Mestrado Integrado em Medicina - 6º ano

Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Morada: Rua de Novelhe, 86 Santiago, 4560-771 Penafiel

E-mail: liliana.teles@hotmail.com

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, quero agradecer à orientadora Dr.^a Maria Leonor Viegas Gomes e à co-orientadora Professora Doutora Manuela Rebelo Carvalheiro, por todo o apoio, orientação e incentivos recebidos, bem como pela total disponibilidade.

À minha família, em especial aos meus pais, irmã e avós, por toda a força e apoio, bem como pelo esforço que fizeram para me proporcionar esta oportunidade e por acreditarem sempre em mim.

Agradeço em especial ao João, pelo carinho, apoio e paciência que teve no decorrer da realização desta dissertação.

A todos os meus amigos, em especial à Inês, que me ajudaram ao longo deste trabalho e a todos que de alguma forma o tornaram possível.

ABREVIATURAS E ACRÓNIMOS

AP-1: *Activating protein 1*

AP-2: *Activating protein 2*

AR: Artrite reumatóide

b-FGF: *basic fibroblast growth factor*

Ca²⁺-caM: Cálcio-calmodulina

cAMP: *Cyclic adenosine monophosphate*

cGMP: *Cyclic guanosine monophosphate*

CCAAT, C/EBP: *Enhancer-binding protein*

C/ERBβ: *CCAAT/enhancer-binding protein*

CIS: *Cytokine-inducible SH2-containing protein*

CREB: *cAMP response binding protein*

CoA: coenzima A

D2R: *dopamine type 2 receptor*

DA: Dopamina

DNA: *Deoxyribonucleic acid*

E2: Estrogénio

EMT: *Epithelial-mesenchymal transformation*

eNOS: *endothelial nitric oxide synthetase*

ERE: *Estrogen response element*

ET-1: Endotelina-1

ET-3: Endotelina-3

FAS: *Fatty acid synthase*

GABA: *γ-aminobutyric acid*

GAS: *γ-interferon activated sequence*

GH: *Growth hormone*

HSL: *hormone-sensitive lipase*

IBMX: *3-isobutil-1-metilxantina*

IGF-1: *Insulin-like growth factor 1*

IGF2: *Insulin-like growth factor 2*

ILs: *Interleucinas*

INF- α : *Interferon-alpha*

iNOS: *Inductible nitric oxide synthase*

IP3: *Inositol 1,4,5- triphosphate*

IP4: *Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate*

IP6: *Inositol hexakisphosphate*

Jak2: *Janus kinase 2*

LES: *Lúpus eritematoso sistémico*

LH: *Luteinizing hormone*

LPL: *Lipoprotein lipase*

MAPK: *Mitogen-activated protein kinase*

MEC: *Mammary epithelial cells*

MMP: *Matrix metalloproteinases*

mRNA: *Messenger ribonucleic acid*

NO: *Nitric oxide*

NT: *Neurotensina*

OT: *Ocitocina*

P: *Phosphorylation*

P4: Progesterona

PACAP: *Pituitary adenylate cyclase activating peptide*

PAI-1: *Plasminogen activator inhibitor tipo I*

PI3K: *Phosphoinositide-3 kinase*

PIF: *Prolactin-inhibiting factor*

PKA: *Protein kinase A*

PKG: *cGMP-dependent protein kinase*

PL: *Placental lactogen*

PLC: *Phospholipase C*

PRAP: *Prolactin-R associated phosphoprotein*

PPAR: *Peroxisome proliferator-activated receptor*

PRF: *Prolactin-releasing factor*

PRL: Prolactina

PRL-R: Receptor da prolactina

PTHrP: *Parathyroid hormone-related protein*

SF-1: *Steroidogenic factor-1*

SH2: *Src homology 2*

SH3: *Src homology 3*

SOCS: *Supressores of cytokine signalling*

Sp1: *SV40-promoter-1*

ST: Somatotrofina

STAT: *Signal transducer and activator or transcription*

TGF- β : *Transforming growth factor beta*

TIDA: *Tuberoinfundibular dopamine*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha,*

TRH: *Thyrotropin-releasing hormone*

uPA: *urokinase-type plasminogen activator*

UTR: *Untranslated region*

VEFG: *Vascular endotelial growth factor*

Vi: *Vasoinibinas*

VIP: *Vasoactive intestinal polypeptide*

α -MSH: *Alpha melanocyte stimulating hormone*

β -HCG: *Beta human chorionic gonadotropin*

17-HSD: *17 β -hidroxiesteróide desidrogenase/17-cetosteróide reductase*

RESUMO

A prolactina é uma hormona polipeptídica, sintetizada e segregada principalmente pelo lobo anterior da hipófise, por células especializadas designadas por lactotrofos. É também produzida em locais extra-hipofisários, como glândula mamária, placenta, útero, adipócitos e linfócitos T.

Este trabalho de revisão bibliográfica tem como finalidade rever o conhecimento sobre a prolactina e o seu receptor, bem como as diversas funções e mecanismos associados a esta.

O gene que codifica a proteína está localizado, em humanos, no cromossoma 6. A sua expressão é, sobretudo, inibida pela dopamina e estimulada pela hormona libertadora de tirotropina, ocitocina e polipeptídeo vasoactivo intestinal.

Esta hormona liga-se a um único receptor de membrana, membro da superfamília de receptores de citocinas, exercendo a sua acção através da interacção com várias vias de sinalização, sendo a principal a *Janus kinase 2-signal transducer and activator or transcription*.

Os receptores da prolactina são expressos em diversos tecidos e órgãos, como mama, hipófise, próstata, ovários, testículos, intestino, epiderme, ilhéus pancreáticos, cérebro e linfócitos.

A acção mais frequentemente associada a esta hormona, e a que se deve o seu nome, é a iniciação e manutenção da lactação. Contudo, devido a esta ampla distribuição de receptores são conhecidas mais de 300 acções da prolactina em vários vertebrados, não representadas por este nome.

Esta hormona tem um papel na reprodução, crescimento e desenvolvimento, osmorregulação, metabolismo, regulação imunitária, função cerebral, comportamento e

angiogénese. Além destas, a prolactina pode estar envolvida no desenvolvimento de algumas doenças, como nos carcinomas da mama e da próstata, assim como em doenças auto-imunes.

Palavras-chave: prolactina, receptor da prolactina, Jak2-STAT5, glândula mamária, reprodução, metabolismo, osmorregulação, regulação imunitária, angiogénese, tumorigénese.

ABSTRACT

Prolactin is a polypeptide hormone, synthesized and secreted mainly by the anterior pituitary lobe by specialized cells called lactotrophs. It is also produced in extra-pituitary sites, such as mammary gland, placenta, uterus, adipocytes and T lymphocytes.

This literature review aims to review the knowledge of prolactin and its receptor, as well as the various functions and mechanisms associated with this.

The gene encoding the protein it is located in humans on chromosome 6. Its expression is mainly inhibited by dopamine and stimulated by thyrotropin-releasing hormone, oxytocin and vasoactive intestinal polypeptide.

This hormone binds to a single membrane receptor, a member of the superfamily of cytokine receptors, exerting its action through interaction with various signaling pathways, and the main Janus kinase-signal transducer and activator of transcription.

Prolactin receptors are expressed in various tissues and organs such as breast, pituitary, prostate, ovaries, testes, intestine, skin, pancreatic islets, brain and lymphocytes.

The action most commonly associated with this hormone, and which owes its name, is the initiation and maintenance of lactation. However, due to this wide distribution of receptors are known more than 300 actions of prolactin in various vertebrates, not represented by this name.

This hormone plays a role in reproduction, growth and development, osmoregulation, metabolism, immune regulation, brain function, behavior and angiogenesis. Additionally, prolactin may be involved in the development of some diseases, such as breast and prostate cancers, as well as in autoimmune diseases.

Key-words (5 a 10): prolactin, prolactin receptor, Jak2-STAT5, mammary gland, reproduction, metabolism, osmoregulation, immune regulation, angiogenesis, tumorigenesis.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	14
2. OBJECTIVOS	16
3. DESENVOLVIMENTO	17
I. Gene da prolactina	17
a. Visão geral da família da PRL/GH/PL	17
b. Regulação da expressão do gene da PRL	18
II. Proteína prolactina	19
a. Características estruturais	19
III. Secreção de prolactina	21
a. Regulação da secreção da PRL hipofisária	21
b. Regulação da prolactina extra-hipofisária	26
IV. Receptor da prolactina e sinalização	31
a. Estrutura do receptor da PRL e isoformas	31
b. Vias de sinalização do receptor da PRL	32
V. Funções da prolactina	37
a. Função da PRL na glândula mamária	38
b. Função da PRL na reprodução	48
c. Função da PRL na regulação imunitária	54
d. PRL e doenças auto-imunes.....	56
e. Função da PRL no crescimento e metabolismo	56
f. Função da PRL na osmorregulação	63
g. Função da PRL na angiogénese.....	65
h. Função da PRL na tumorigénese humana	71

4. CONCLUSÕES	75
5. REFERÊNCIAS/ BIBLIOGRAFIA	77

1. INTRODUÇÃO

A prolactina (PRL) é uma hormona polipeptídica de 23 kDa, sintetizada e segregada principalmente pelo lobo anterior da hipófise, por células especializadas designadas por lactotrofos. É também produzida em locais extra-hipofisários, como glândula mamária, decídua, miométrio, adipócitos e linfócitos T (Bachelot & Binart, 2007).

O gene que codifica a proteína está localizado, em humanos, no cromossoma 6 (T. Brandebourg et al., 2007). A sua expressão é, sobretudo, inibida pela dopamina (DA) e estimulada pela hormona libertadora de tirotropina (TRH-*thyrotropin-releasing hormone*), ocitocina (OT) e pelo polipeptídeo vasoactivo intestinal (VIP-*vasoactive intestinal polypeptide*) (Freeman et al., 2000).

Esta hormona actua através de um receptor do tipo citocina, que se localiza na superfície da célula, sendo composto por três domínios: extracelular, transmembranar e intracitoplasmático. Uma molécula de PRL liga-se a duas do seu receptor provocando a dimerização do mesmo. Isso activa a Jak2 (*Janus kinase 2*) que fosforila o receptor e autofosforila-se em várias tirosinas. As tirosinas fosforiladas no complexo receptor-Jak2 formam pontos de ligação para diversas proteínas sinalizadoras, destacando-se as STATs (*signal transducers and activators of transcription*) (García-Martínez et al., 2009). Os receptores da PRL são expressos em diversos tecidos e órgãos, como mama, hipófise, rins, próstata, ovários, testículos, intestino, epiderme, ilhéus pancreáticos, cérebro e linfócitos (Freeman et al., 2000).

A acção mais comumente associada a esta hormona, e a que se deve o seu nome, é a iniciação e manutenção da lactação. Contudo, a PRL é uma hormona altamente versátil,

apresentando funções relacionadas com a reprodução, crescimento e desenvolvimento, osmorregulação, metabolismo, regulação imunitária, função cerebral e comportamento.

A natureza heterogénea da produção da PRL, juntamente com a expressão dos seus receptores em diversos tecidos e órgãos suporta o papel dual desta, como hormona e citocina, estando na base das suas funções pleiotrópicas (Brandebourg et al., 2007).

2. OBJECTIVOS

A PRL é uma hormona polipeptídica cuja função mais conhecida é a lactação. No entanto, esta hormona é muito versátil desempenhando acções diversas na homeostasia do organismo.

Deste modo, esta dissertação/revisão de artigo bibliográfica tem como finalidade rever o conhecimento sobre:

- ✓ PRL e o seu receptor;
- ✓ Funções diversas e respectivos mecanismos associados à PRL.

3. DESENVOLVIMENTO

I. Gene da prolactina

a. Visão geral da família da PRL/GH/PL

A PRL é sintetizada e segregada principalmente pelos lactotrofos da glândula hipofisária, sendo também produzida em locais extra-hipofisários como glândula mamária, placenta, útero e linfócitos T (Bachelot & Binart, 2007).

Esta hormona foi descoberta há cerca de 80 anos, como uma hormona hipofisária distinta que estimulava a produção de leite em vários animais (Bernichtein et al., 2010).

A PRL deriva por duplicação de gene, de um ancestral comum com a hormona do crescimento (*GH-growth hormone*) e com a hormona lactogénio placentar (*PL-placental lactogen*) (Bachelot & Binart, 2007). Por tal motivo, a sequência de aminoácidos desta hormona é semelhante à mesma das duas hormonas supracitadas, apresentando 40% de homologia. A divergência da linhagem PRL, GH e PL ocorreu há cerca de 400 milhões de anos (Ben-Jonathan et al., 1996).

Com base nas características genéticas, estruturais e biológicas, estas três hormonas pertencem à mesma família proteica. Inicialmente, a família era apenas constituída pela PRL, GH e PL. No entanto, foi expandida e na actualidade esta família proteica inclui proteínas *PRL-like*, proteínas relacionadas com a PRL, proliferinas e proteínas relacionadas com as proliferinas (Ben-Jonathan et al., 2008).

A PRL é actualmente considerada também uma citocina, baseada nas suas propriedades moleculares e funcionais (Bachelot & Binart, 2007).

b. Regulação da expressão do gene da PRL

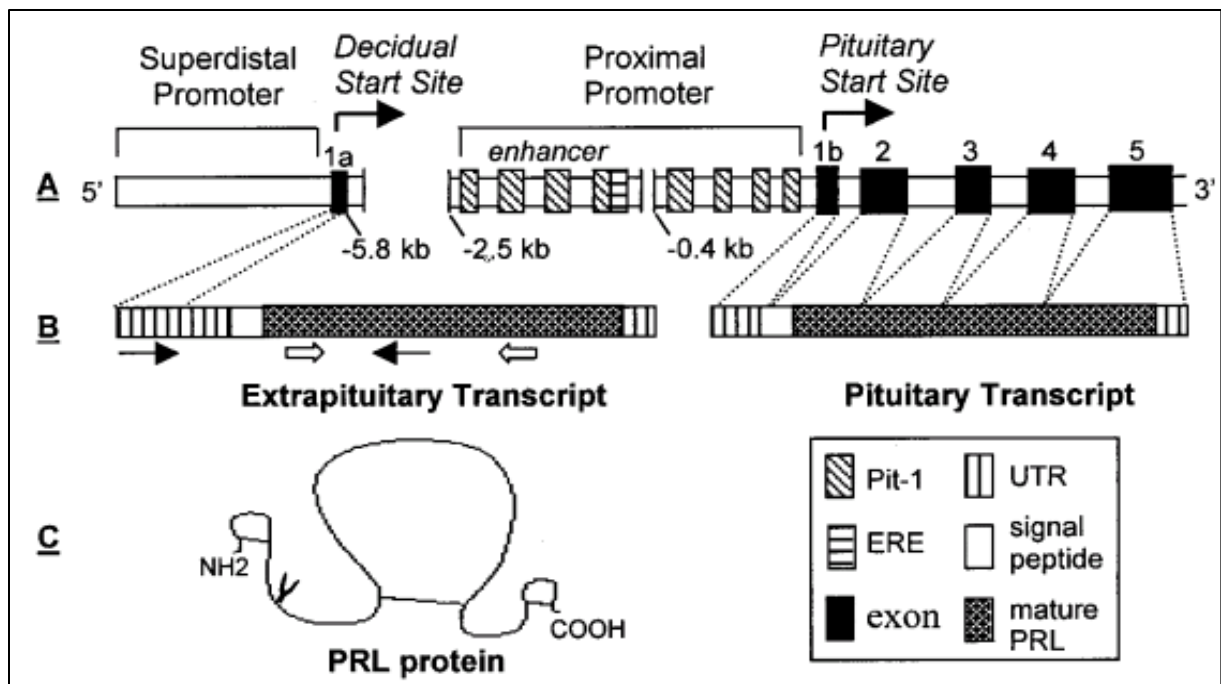
O gene que codifica a proteína localiza-se, em humanos, no cromossoma 6 (Horseman & Yu-Lee, 1994).

É composto por seis exões e quatro intrões, com aproximadamente 18 kb de comprimento. A transcrição deste gene é regulada por duas regiões promotoras independentes: a região promotora proximal hipofisária e a região promotora superdistal responsável pela expressão extra-hipofisária.

O exão extra 1a não-codificante apresenta um local de transcrição com 5.8 Kb a montante do local de início da região promotora hipofisária (Figura 1).

Em locais extra-hipofisários, como decídua, miométrio e células linfocitárias, o exão 1a é transformado no exão 1b. Isto origina um RNA mensageiro (mRNA-*messenger ribonucleic acid*) transcripcional que é aproximadamente 150 pares de base (bp) mais longo do que o da região hipofisária, diferindo assim, na região não-codificante 5' (UTR-*untranslated region*) (Brandebourg et al., 2007) (Figura 1).

A região promotora proximal hipofisária, no gene humano, apresenta três, raramente quatro, locais de ligação Pit-1. Ao passo que, a zona distal tem oito locais de ligação Pit-1, onde apenas dois (D2 e D6) contêm a sequência exacta. No local D5 aparece uma ligação ao factor pertencente à família AP-1 [*activating protein 1 (jun)*]. Apesar de conter a sequência degenerada ERE (*estrogen response element*), o promotor humano da PRL responde fracamente aos estrogénios (Ben-Jonathan et al., 1996) (Figura 1).



Adaptado de Zinger et al. (2003)

Figura 1 Diagrama do gene da PRL humana (A), transcrição da PRL hipofisária e extra-hipofisária (B) e proteína PRL madura (C). É de salientar a utilização do exão 1a no início da transcrição da prolactina extra-hipofisária e a região não-codificante 5' (UTR) mais longa. ERE (*estrogen response element*), PRL (prolactina), UTR (*untranslated region*).

II. Proteína prolactina

a. Características estruturais da PRL

A PRL humana é formada por uma cadeia simples de 199 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 23 kDa, sendo estabilizada por três pontes dissulfeto, entre seis resíduos de cisteína. Deduzido a partir do modelo molecular e suportado por ressonância magnética nuclear, a cadeia simples desta hormona adopta em configuração 3D, a forma de quatro cadeias α -hélices anti-paralelas enroladas entre si, organizadas em 'up-up-down-down'. Esta configuração da cadeia da PRL é compartilhada com a somatotrofina (ST), factores hematopoiéticos e várias citocinas (Horseman et al., 1994, Brandebourg et al., 2007).

A forma da PRL hipofisária mais comumente encontrada é com 23 kDa de comprimento. No entanto, podem ser detectadas variantes desta forma que diferem no tamanho e grupo funcional. Estas variantes podem resultar de fenómenos como *splicing* alternativo de transcrição primária, clivagem proteolítica ou pós-translação.

As formas variantes maiores, como a PRL dimérica (*big PRL*, 40-60 kDa) e macroprolactina (*big-big PRL*, >100 kDa), resultam de processos de dimerização ou agregação. A macroprolactina, também designada por PRL oligomérica, é um complexo de PRL monomérica associada a IgG. Apresenta longa semi-vida na circulação e quando elevada é frequentemente diagnosticada como hiperprolactinémia. Contudo, dado o seu grande tamanho, a macroprolactina está provavelmente confinada ao compartimento intravascular, tendo baixa actividade biológica *in vivo* e não tendo grande significado patológico (Ben-Jonathan et al., 2008).

Por sua vez, as moléculas mais pequenas resultam geralmente de fenómenos de proteólise (Freeman et al., 2000).

As funções das variantes moleculares da PRL ainda não estão muito bem estudadas. No entanto, sabe-se que a forma com 22 kDa de comprimento, resultante de clivagem proteolítica, é fundamental na reprodução feminina e o produto com 16 kDa possui actividade anti-angiogénica (Freeman et al., 2000, Bachelot & Binart, 2007).

PRL glicosilada também pode ser detectada no soro humano, sendo especialmente abundante no líquido amniótico e leite. No entanto, ainda não é conhecido se desempenha funções fisiológicas específicas.

Esta molécula também pode ser submetida a fosforilação nos resíduos de serina e/ou treonina, constituindo 5 a 30% da hormona segregada pela glândula hipofisária. A função da

PRL fosforilada ainda continua a ser debatida, sabendo-se apenas que pode ter propriedades agonistas ou antagonistas (Brandebourg et al., 2007).

III. Secreção de prolactina

a. Regulação da secreção da PRL hipofisária

Como já referido, a PRL é sintetizada e segregada sobretudo no lobo anterior da hipófise, por células especializadas designadas por lactotrofos. Estas células representam 20 a 30% do total da população celular hipofisária (Brandebourg et al., 2007). Foram identificadas inequivocamente por imunocitoquímica, descendendo de uma linhagem Pit-1-dependente, juntamente com os somatotrofos e os tireotrofos (Freeman et al., 2000).

Os lactotrofos demonstram significativa heterogeneidade na morfologia, secreção hormonal basal e na resposta aos secretagogos.

Morfologicamente são distinguidos dois tipos de lactotrofos: os de granulação esparsa, secretores de células e os de granulação densa, cuja função consiste no armazenamento celular. Apresentam forma poliédrica ou angular, mas por vezes, redonda ou oval. Localizam-se sobretudo, na porção lateroventral do lobo anterior da glândula hipofisária e estão presentes como uma banda adjacente ao lobo intermédio (Ben-Jonathan et al., 1996).

As concentrações plasmáticas de PRL são mais elevadas durante o sono e mais baixas durante as horas de actividade, em humanos. Verifica-se deste modo, que a secreção basal da hormona apresenta ritmo circadiano, que é originado pelo núcleo supraquiasmático do hipotálamo. Contudo, este pode ser alterado por estímulos ambientais, como luz, stresse, sons e odores, por estímulos reprodutores como a fecundação e a amamentação e por alterações do meio interno, afectando os elementos inibidores ou estimuladores do circuito hipotalâmico regulador (Figura 2).

Quanto à resposta aos secretagogos, os lactotrofos da zona externa ao lobo anterior respondem melhor ao efeito estimulante secretor da TRH do que os da zona interna, adjacentes ao lobo intermédio da hipófise. Por outro lado, as células hipofisárias secretoras de PRL que respondem ao efeito inibidor da DA são mais abundantes na zona interna da referida glândula (Freeman et al. 2000).

Os lactotrofos conservam a capacidade proliferativa durante a vida adulta, aumentando em número durante a gravidez e lactação. Este potencial proliferativo, juntamente com perda do controlo inibidor pela dopamina hipotalâmica, explica a alta incidência dos prolactinomas comparativamente a outros tumores hipofisários (Brandebourg et al., 2007).

A síntese e a secreção de PRL hipofisária são sujeitas a múltiplos reguladores, que podem ser classificados de forma global, em quatro categorias: endócrino, parácrino, autócrino e justácrino. Os agentes endócrinos têm origem no hipotálamo e gónadas, alcançando os lactotrofos por via sanguínea. Por seu lado, os factores parácrinos atingem os lactotrofos por difusão, através das células hipofisárias vizinhas. Os agentes justácrinos são provenientes da matriz extracelular das células adjacentes e os autócrinos são sintetizados pelos próprios lactotrofos. Deste modo, conclui-se que toda a actividade secretora destas células reflecte o balanço entre os factores inibidores e estimuladores, quer locais, quer à distância (Brandebourg et al., 2007) (Figura 2).

Os lactotrofos são únicos na capacidade elevada de produção de PRL, sendo que esta actividade intrínseca é continuamente inibida pela DA. Este neurotransmissor é sintetizado nos axónios dos neurónios tuberoinfundibulares (*TIDA-tuberoinfundibular dopamine*), sendo o principal factor inibidor da PRL (*PIF-prolactin-inhibiting factor*). A DA é libertada na circulação porta-hipofisária e atinge os lactotrofos acoplando-se a receptores específicos tipo 2 (*D2R-dopamine type 2 receptor*), exercendo várias acções inibidoras. Nestas estão incluídas

a diminuição do cálcio intracelular e dos níveis de cAMP (*cyclic adenosine monophosphate*), o que provoca a inibição da expressão do gene e secreção de PRL, bem como a supressão da proliferação dos lactotrofos. Por sua vez, a PRL por retrocontrolo negativo de ansa curta, é o regulador primário deste sistema dopaminérgico. Provavelmente, outros factores hipotalâmicos desempenham um papel de PIF's secundários, como o GABA (*γ-aminobutyric acid*), ST e calcitonina (Freeman et al., 2000, Tóth et al., 2002, Molitch, 2008) (Figura 2).

No entanto, apesar do predomínio do efeito inibidor da DA sobre a secreção de PRL, existem vários estímulos que causam aumento da secreção desta hormona, sendo os mais importantes a TRH, OT e VIP (Figura 2).

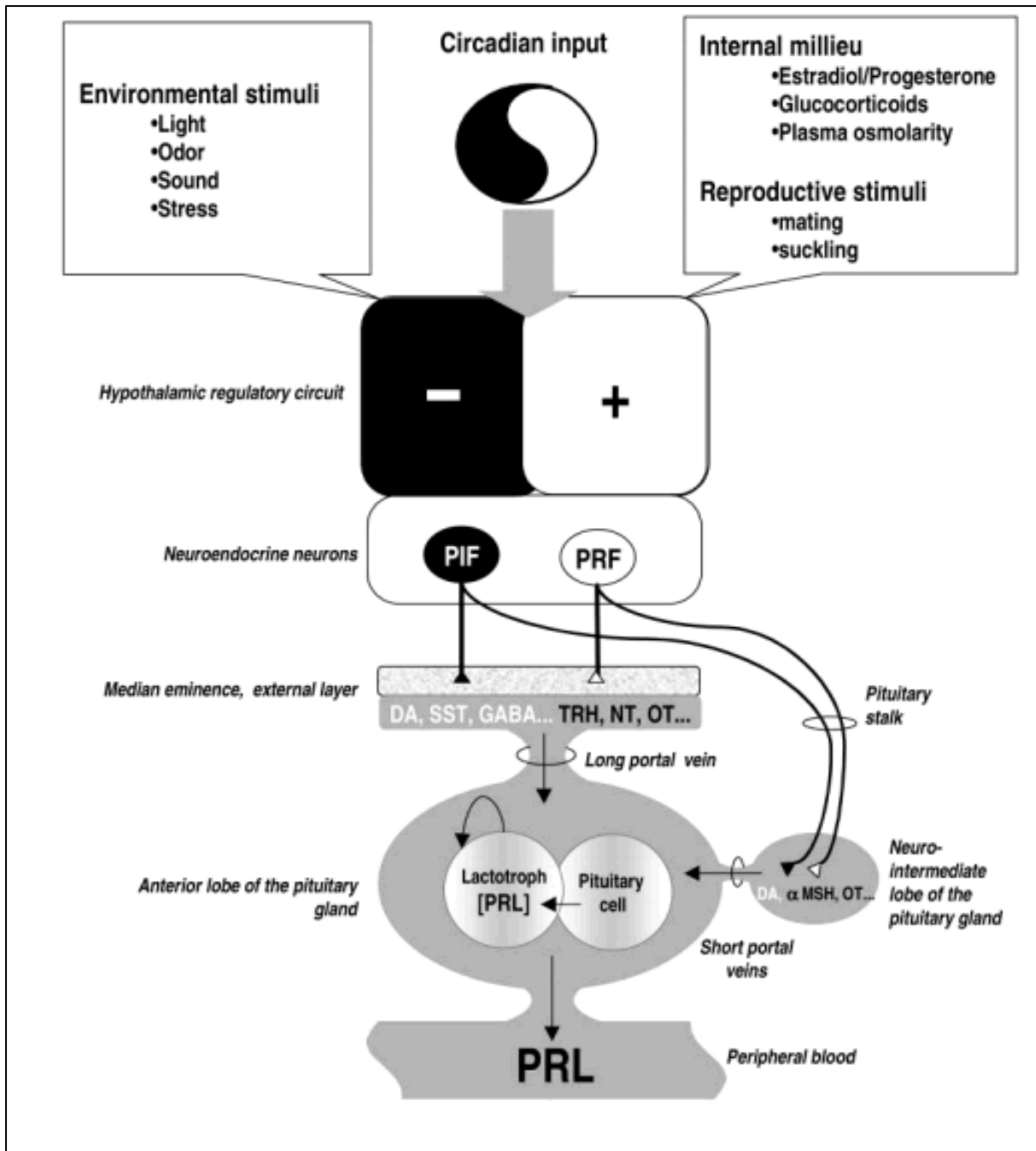
Os neurónios de TRH no núcleo paraventricular com terminais na eminência mediana, secretam TRH na circulação porta-hipofisária. Esta liga-se ao receptor de TRH tipo 1, que é expresso nos tireotrofos e nos lactotrofos. A TRH estimula a secreção de PRL especialmente quando os níveis de DA são baixos ou ausentes. É induzido um aumento rápido e bifásico de cálcio intracelular, levando ao aumento da secreção de PRL e indução do gene desta hormona, com a activação da MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), via proteína cinase C e dependente de cálcio. A TRH não é considerada um PRF (*PRF-prolactin-releasing factor*) crítico, com base na avaliação dos níveis séricos basais de PRL. Apesar da utilização frequente de um teste de estimulação de TRH para diagnosticar hiperprolactinémia em doentes, a sua importância fisiológica como regulador da libertação desta hormona, em humanos, ainda não está totalmente clara.

A OT é um nonapeptídeo produzido pelos neurónios magnocelulares dos núcleos paraventricular e supraóptico do hipotálamo. Esta hormona é libertada quando ocorre um aumento da secreção de PRL, como por exemplo durante a amamentação, após a administração de estradiol ou durante o stresse de imobilização. Devido ao facto da OT e da

PRL apresentarem diferentes limiares de activação e cinéticas dissimilares, esta correlação pode ser pura coincidência. No entanto, o consenso geral é que este peptídeo não é um PRF crítico, mas pode modular a secreção de PRL em algumas condições.

O VIP é um peptídeo formado por 28 aminoácidos, estando presente em elevadas concentrações na circulação porta-hipofisária. Este vaso-peptídeo é também produzido pelos lactotrofos, onde estimula a secreção basal de PRL. O VIP actua por aumento do cAMP intracelular, resultando na activação da PKA (*protein kinase A*). É um secretagogo mais lento e menos potente que a TRH. O VIP aumenta a secreção de PRL apenas em concentrações micromolares. Deste modo, considera-se que o VIP não é um potente indutor da secreção desta hormona, em humanos (Freeman et al., 2000, Molitch, 2008).

A regulação da secreção da PRL, por retrocontrolo de ansa longa é executada por vários factores de crescimento como os estrogénios. Estes exercem múltiplos efeitos estimuladores nos lactotrofos, incluindo o aumento da expressão do gene desta hormona, armazenamento, secreção e estimulação da proliferação celular (Brandebourg et al., 2007) (Figura 2).



Adaptado de Freeman et al., (2000)

Figura 2 Visão geral da regulação da secreção da PRL. A secreção de PRL tem ritmo circadiano, sendo modificado por estímulos ambientais, reprodutores e alterações do meio interno, que afectam os elementos inibidores ou estimuladores do circuito hipotalâmico regulador. Os PIFs como a DA, ST e GABA e os PRFs como a TRH, OT, NT e α -MSH são as vias centrais da inibição ou secreção da PRL, respectivamente. Estas substâncias podem exercer a acção na hipófise por retrocontrolo de ansa curta ou ansa longa. DA (dopamina), GABA (*γ-aminobutyric acid*), NT (neurotensina), OT (ocitocina), PIF (*prolactin-inhibiting factor*), PRF (*prolactin-releasing factor*), PRL (prolactina), ST (somatotrofina), TRH (*thyrotropin-releasing hormone*), α -MSH (*alpha melanocyte stimulating hormone*).

b. Regulação da PRL extra-hipofisária

Como já supracitado, a PRL é também sintetizada em locais extra-hipofisários como glândula mamária, placenta, útero, linfócitos T, adipócitos e próstata, sendo a expressão nestes, exclusiva em humanos e primatas (Brandebourg et al., 2007).

A regulação da expressão é diferente nos locais hipofisários e extra-hipofisários. A região promotora superdistal, responsável pela expressão da PRL extra-hipofisária, não requer o Pit-1 para a transcrição e a sua secreção não é afectada pela DA, neuropeptídeos ou estrogénios. Tecidos como decídua, miométrio, linfócitos, células malignas da mama, próstata e adipócitos utilizam este promotor. A região localiza-se entre os nucleótidos -1500 e -2000, sendo a actividade de transcrição basal regulada por cerca de 300-400 nucleótidos, que se encontram numa região proximal da região promotora superdistal. Esta última contém locais de ligação para vários factores de transcrição como AP1, CCAAT/elemento de ligação proteica (C/EBP-*enhancer-binding protein*) e proteína ligante com resposta cAMP (CREB-*cAMP response*

binding protein), sendo estas ligações reguladas de modo específico pelos diferentes tecidos. Apesar disto, os ligandos naturais que interferem com a transcrição do gene da PRL, em cada local extra-hipofisário, são ainda, largamente desconhecidos.

Outro dos pontos de divergência com a regulação da secreção hipofisária de PRL é que na extra-hipofisária a exocitose não é dependente de cálcio (Ben-Jonathan et al., 2000).

i. Secreção de PRL na decídua e miométrio

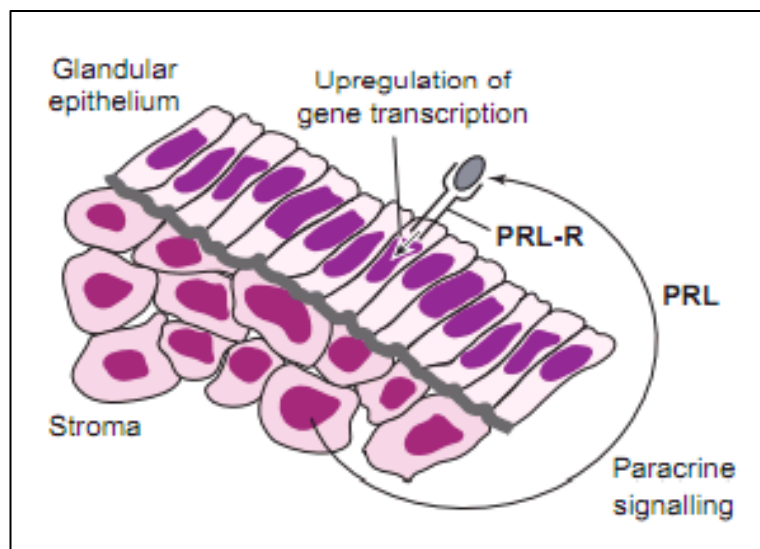
A produção extra-hipofisária de PRL foi primeiramente descoberta na decídua, após a detecção de concentrações muito elevadas desta hormona no líquido amniótico. A PRL neste fluido atinge o seu nível máximo entre as 20 e 24 semanas de gestação, sendo temporal e quantitativamente distinta dos níveis da hormona no soro materno ou fetal (Ben-Jonathan et al., 2008).

A síntese da PRL é detectada nas células do estroma uterino na fase médio-secretora do ciclo menstrual, que coincide com os primeiros sinais da decidualização (Figura 3). Este processo constitui uma etapa crítica na iniciação e manutenção da gravidez, sendo principalmente controlada no útero, pela acção da progesterona e dos estrogénios. O papel indutor da PRL na decidualização endometrial depende da progesterona, que é uma hormona esteróide necessária para iniciar e manter a decidualização. Contudo, a progesterona tem efeitos indirectos na expressão do gene da PRL na decídua (Jabbour et al., 2001).

A síntese e a secreção de PRL pela decídua não são afectadas pela DA, TRH ou estrogénios, uma vez que a expressão do gene é regulada pelo promotor superdistal, acima elucidado. O facto dos agonistas dopaminérgicos, como a bromocriptina, não inibirem a secreção de PRL decidual *in vitro* é consistente com os estudos clínicos que demonstram que

a terapêutica com bromocriptina durante a gravidez, suprime os níveis da hormona no soro materno e fetal, mas não altera os mesmos no líquido amniótico.

Diversos factores afectam a secreção de PRL pela decídua, sendo que a maioria apresenta acção inibidora. Como factores que estimulam a secreção são de salientar a insulina, a IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*) e a relaxina. Pelo contrário, como factores inibidores temos as interleucinas (ILs) (IL-1 α , IL-1 β , IL-2 e IL-8), TNF- α (*tumor necrosis factor alpha*), endotelina-1 (ET-1), ácido araquidónico, TGF- β (*transforming growth facto beta*) e a lipocortina I. Alguns destes factores são produzidos pelas próprias células deciduais, enquanto outros têm origem em macrófagos infiltrativos. Isto sugere a existência de um mecanismo complexo autócrino/parácrino que governa a produção de PRL pela decídua (Jabbour et al., 2001).



Adaptado de Jabbour et al., (2001)

Figura 3 PRL decidual segregada pelas células do estroma uterino, através da ligação da hormona aos seus receptores de membrana e transcrição de genes nas células epiteliais glandulares regulada por via parácrina. PRL (prolactina), PRL-R (receptor da prolactina).

O tecido miometrial humano também sintetiza PRL. A secreção desta hormona a partir de miométrio transferido para um meio de cultura foi baixa no primeiro dia, tendo aumentado significativamente ao quarto dia. Um perfil semelhante de libertação de PRL foi observado em células de leiomiomas uterinos transferidas para um meio de cultura. A incubação de células vivas de miométrio com gonadotrofina coriônica humana β (β -HCG-*beta human chorionic gonadotropin*) levou a um grande aumento da secreção de PRL. Notavelmente, a progesterona inibe a secreção de PRL a partir destas células transferidas para um meio cultura, em oposição ao seu efeito estimulador sobre a decidualização das células do endométrio. Por sua vez, a ET-1 é um potente inibidor da PRL decidual, enquanto a ET-3 (endotelina-3) aumenta a secreção de PRL pelo miométrio (Ben-Jonathan et al., 2008).

ii. Secreção de PRL pelos linfócitos e adipócitos

A PRL é produzida por diversas células linfohematopoiéticas, incluindo timócitos, linfócitos periféricos (principalmente linfócitos T) e células mononucleares. Como a libertação de PRL pelos linfócitos é muito baixa, a maior parte da sua caracterização tem sido feita ao nível da transcrição.

A expressão de PRL em linfócitos T é estimulada por análogos do cAMP e inibida por IL-1 β , IL-2 e IL-4. No entanto, não é afectada por IL-10, IFN- γ (*interferon-gamma*) ou TNF- α . Diversas linhagens, como exemplo o B-linfoblastóide IM-9P3, produziram PRL suficiente para ser detectada por *Western blotting* ou em ensaios. A produção desta hormona é estimulada por activadores de cAMP e prostaglandinas E2, sendo suprimida por glicocorticóides e algumas ILs.

O consenso geral é que a transcrição de PRL em células do sistema imunitário é ausente, fraca ou transitória (Ben-Jonathan et al., 2008).

Por sua vez, a produção de PRL por tecido adiposo humano foi descoberta quando se estudava tecido mamário humano em cultura, que foi separado em células adiposas e glandulares. Destinadas a serem utilizadas como controlo negativo, as células adiposas da mama foram encontradas, de modo inesperado, a segregar PRL 10 a 15 vezes mais do que as células glandulares. Esta secreção de PRL, a partir de células adiposas da mama aumentou progressivamente até 7 a 10 dias em cultura, sugerindo que houve remoção da inibição.

Considerando a secreção de PRL pelas células glandulares inibida pela progesterona, nem esta hormona esteróide, nem os estrogénios alteram a secreção da PRL pelas células adiposas. Este facto demonstra novamente a diferente regulação da secreção de PRL em tecidos adjacentes.

Tanto os pré-adipócitos, como os adipócitos maduros produzem PRL. A libertação da referida hormona pelos pré-adipócitos isolados da mama é bastante baixa, mas é estimulada pela elevação de agentes cAMP, como o IBMX (3-isobutil-1-metilxantina), um inibidor da fosfodiesterase; isoproterenol, um agonista do receptor β -adrenérgico; e PACAP (*pituitary adenylate cyclase activating peptide*). Para identificar as vias de sinalização envolvidas, os pré-adipócitos foram incubados com as substâncias acima referidas, na presença de PKA, PI3K (*phosphoinositide-3 kinase*) ou inibidores de MAPK. Todos os inibidores bloquearam a secreção de PRL estimulada pelo isoproterenol, ao passo que o inibidor de PKA não afectou a estimulação pelo PACAP.

Estes dados indicam que a produção de PRL nos pré-adipócitos é estimulada pelas catecolaminas e outros activadores do cAMP, através de várias vias de sinalização.

A expressão da PRL é indetectável no tecido adiposo de ratos confirmando assim, a noção que, a secreção desta hormona pelas células adiposas é exclusiva em seres humanos (Brandebourg et al., 2007).

IV. Receptor da prolactina e sinalização

a. Estrutura do receptor da PRL e isoformas

O gene que codifica o receptor da PRL está localizado nos humanos, no cromossoma 5 e é formado por dez exões com 100 kb de comprimento (Brandebourg et al., 2007).

O receptor da PRL pertence à classe 1 da superfamília dos receptores de citocina, que inclui a PRL, GH, leptina, algumas ILs, eritropoietina e o factor inibidor de leucemia (Ben-Jonathan et al., 2008).

Este receptor localiza-se na superfície da célula e é composto por três domínios: extracelular, transmembranar e intracelular (Freeman et al., 2000). O domínio extracelular é formado por 210 aminoácidos e pode ser dividido em duas regiões designadas por S1 e S2, que demonstram analogia com a molécula de fibronectina tipo 3. A região S1 contém dois locais de ligação NH₂, dois pares de pontes dissulfeto e a maioria dos locais de ligação da PRL. A região S2 tem o motivo *WS* conservado, que é necessário para o funcionamento do receptor e sua dimerização. O domínio transmembranar, por sua vez, é formado por 24 aminoácidos, sendo a sua acção exercida na transmissão do sinal após a ligação. O domínio intracelular difere em comprimento e composição nas várias isoformas do receptor da PRL, demonstrando pequenas sequências similares com outros receptores de citocina. Contudo, apresentam duas regiões, Box-1 e Box-2, relativamente conservadas. A Box-1, rica em prolina, situa-se na proximidade da membrana plasmática, sendo necessária para a transdução molecular. A Box-2 é menos conservada, onde estão ausentes as isoformas curtas do receptor da PRL (Brandebourg et al., 2007).

A activação do receptor desta hormona envolve a ligação e indução sequencial da dimerização do mesmo. Cada molécula de PRL contém dois locais de ligação, sendo o local 1 formado pelas hélices 1 e 4 e o local 2 pelas hélices 1 e 3. A indução da homodimerização e

formação do complexo trimérico activo (2 receptores e 1 hormona) necessita de ligação a estes dois locais (Ben-Jonathan et al., 1996).

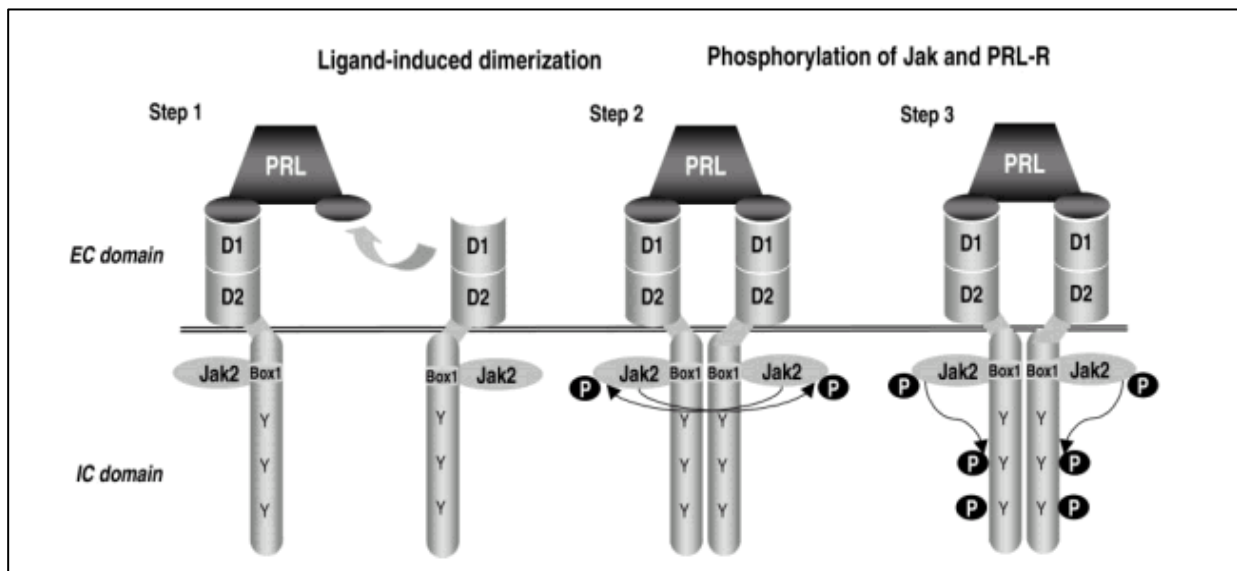
O receptor da PRL é expresso em vários tecidos e órgãos. No entanto, é principalmente notória a sua expressão no fígado, hipotálamo, glândulas mamárias e supra-renais. Esta expressão é alterada de acordo com a modificação da PRL e hormonas esteróides circulantes. Algumas hormonas, como a GH e a PL podem ligar-se ao receptor da PRL e assim, mimetizar algumas acções desta.

Existem cinco isoformas deste receptor, resultantes de *splicing* alternativo, que diferem no comprimento e composição proteica do domínio intracelular. Estas isoformas podem ser classificadas em longas, com 85-90 kDa de comprimento, intermédias, com 50 kDa, ΔS com 70 kDa e curtas 1a com 56 kDa e 1b com 42 kDa (Freeman et al., 2000).

A isoforma longa é formada por 591 aminoácidos, sendo considerada a maior responsável pelas propriedades de transdução de sinal atribuídas ao receptor da PRL. As demais isoformas são expressas em níveis variados tanto em tecidos normais, como malignos. Quando co-expressos com as isoformas longas, algumas isoformas curtas inibem a resposta transcripcional da PRL, sugerindo que, em certas condições fisiológicas, as formas curtas conferem protecção contra a sobrestimulação pela PRL (Horseman, 2002).

b. Vias de sinalização do receptor da PRL

O receptor da PRL é dotado de actividade de tirosina-cinase, sendo a principal cascata de sinalização usada por este receptor a Jak2 associada a STATs. Uma molécula de PRL liga-se a duas do seu receptor, causando a dimerização do mesmo. Isto activa a Jak2 que fosforila o receptor e autofosforila-se em diversas tirosinas (García-Martínez et al., 2009) (Figura 4).



Adaptado de Freeman et al. (2000)

Figura 4 Mecanismo de ativação do receptor da PRL. Uma molécula de PRL liga-se a duas do seu receptor, causando a dimerização do mesmo. Primeiramente, o local 1 de ligação da PRL interage com a molécula do receptor da PRL (passo 1). A formação do complexo inicial receptor-PRL induz a interação com o local 2 de ligação na mesma molécula de PRL a outro receptor de PRL, ou seja, uma molécula de PRL liga-se a duas do seu receptor. Isto activa a Jak2 que fosforila o receptor e autofosforila-se em diversas tirosinas (passos 2 e 3). A Box-1, rica em prolina, situa-se na proximidade da membrana plasmática, sendo necessária para a transdução molecular. D1 (subdomínio NH₂-terminal), D2 (subdomínio membrana-proximal), *EC domain* (domínio extracelular), *IC domain* (domínio intracelular), P (*phosphorylation*), PRL (prolactina), PRL-R (receptor da prolactina), Y (resíduos de tirosina).

As tirosinas fosforiladas no complexo receptor-Jak2 formam locais de ligação para várias proteínas sinalizadoras, onde se destacam as STATs (Figura 4).

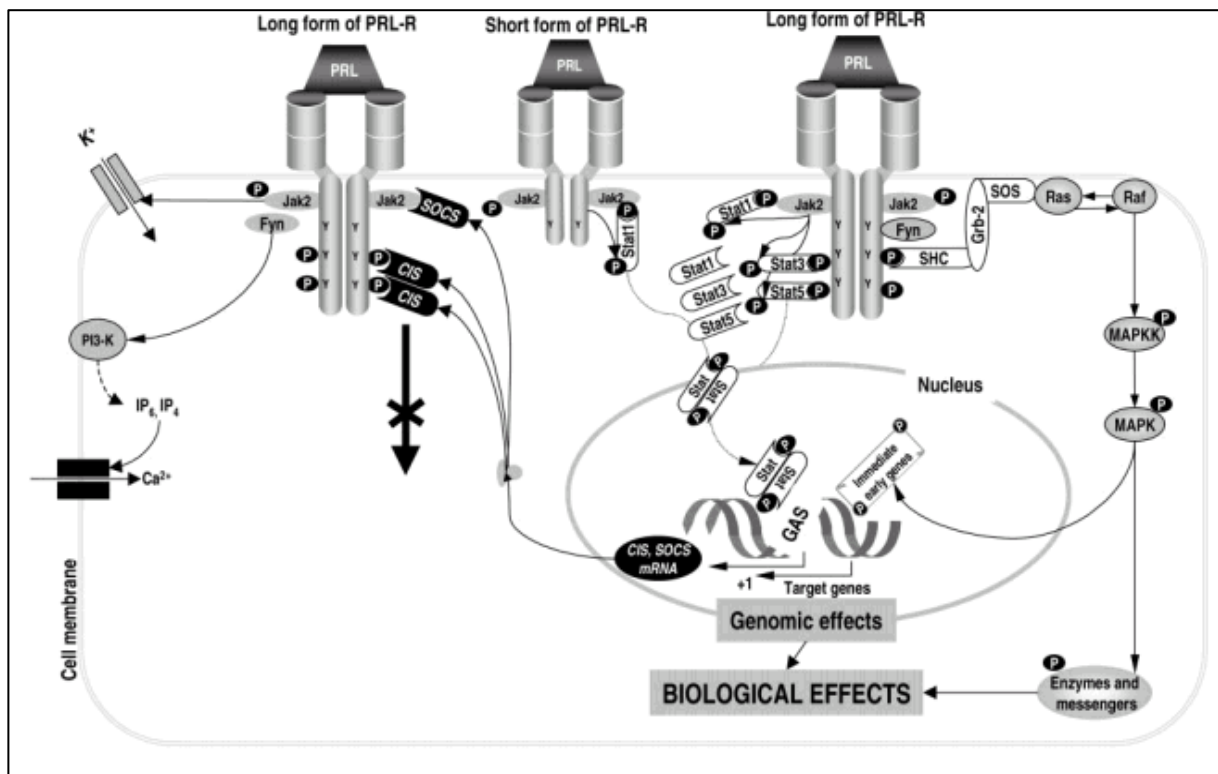
As STATs são factores de transcrição citoplasmáticos latentes, sendo a família destas proteínas formada por oito membros. Quatro deles, STAT 1, STAT 3 e principalmente as STAT5a e 5b foram identificadas como moléculas transdutoras do receptor da PRL. As duas formas da STAT5 são especialmente importantes para o desenvolvimento e função da glândula mamária, como veremos adiante.

O factor de transcrição STAT contém cinco domínios, ligando de DNA (*deoxyribonucleic acid*), SH3-like (*src homology 3*), SH2-like (*src homology 2*) e NH₂- e COOH- terminais transactivados.

A fosforilação do resíduo de treonina na isoforma longa activada do receptor da PRL interage com o domínio SH2-like da STAT. Após a ligação ao complexo receptor-Jak2, as STATs são fosforiladas pela Jak2. Posteriormente, as STATs separam-se deste complexo, homo- ou heterodimerizam-se com outras STATs, através de interacções SH2-fosfotirosina. Os dímeros activados são translocados para o núcleo, onde interagem de modo específico, com uma sequência palindrómica de DNA, onde estão incluídos os genes-alvo promotores, sendo esta sequência designada por GAS (*γ-interferon activated sequence*) (Freeman et al., 2000).

Apesar da cascata Jak2-STAT ser a principal via de sinalização usada pelo receptor da PRL, outras vias estão envolvidas com a transdução do sinal deste receptor, como a Ras-Raf-MAPK. A fosforilação da Jak2 conduz ao recrutamento de proteínas como a Shc, Grb2 e SOS com capacidade de adaptação ao receptor da PRL, resultando na ligação e activação da Ras e Raf. Isto conduz por sua vez, a activação da via MAPK, que leva ao aumento da proliferação celular.

A activação do receptor da PRL é também facilitada pela ligação à família Src cinase, que activa a cascata PI3K/Akt, que tem como função mediar as acções anti-apoptóticas e metabólicas da PRL (Dominguez-Caceres et al., 2004, Brandebourg et al., 2006, García-Martínez et al., 2009) (Figura 5).



Adaptado de Freeman et al., (2000)

Figura 5 Vias de sinalização iniciadas por activação do receptor da PRL. A principal via de transdução de sinal utilizada pelo receptor da PRL é a Jak2 associada aos factores STAT1, STAT3, STAT5a e STAT5b. As STATs contêm cinco domínios, ligando de DNA, SH3-like, SH2-like e NH2- e COOH- terminal transactivado. A fosforilação do resíduo de treonina na isoforma longa do receptor da PRL interage com o domínio SH2-like da STAT. Após a ligação ao complexo receptor-Jak2, as STATs são fosforiladas pela Jak2. Depois, as STATs separam-se deste complexo, homo- ou heterodimerizam-se com outras STATs, através de interacções SH2-fosfotirosina. Os dímeros activados são translocados para o núcleo, onde interagem de modo específico, com uma sequência de DNA, que inclui os genes-alvo promotores, GAS. Outras vias estão envolvidas com a transdução do sinal, como a Ras-Raf-MAPK e a família Src cinases e Fyn, que activam a cascata PI3K/Akt. Shc, Grb2 e SOS, proteínas com capacidade de adaptação ao receptor. A cascata de sinalização Jak2-STAT pode ser inibida pelas SOCS ou pela CIS. Ca²⁺ (cálcio), CIS (*cytokine-inducible SH2-containing protein*), GAS (*γ-interferon activated sequence*), IP4 (*inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate*), IP6 (*inositol hexakisphosphate*), Jak2 (*janus kinase 2*), K⁺ (potássio), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), mRNA (*messenger ribonucleic acid*), P (*phosphorylation*), PRL (prolactina), PRL-R (receptor da prolactina), STAT (*signal transducer and activator or transcription*), SH2-like (*src homology 2*), SH3-like (*src homology 3*), SOCS (*supressores of cytokine signalling*).

É fundamental que a desactivação deste sistema ocorra no momento preciso, uma vez que, a activação constitutiva desse está associada com a transformação celular.

Sabe-se que tanto a intensidade, como a duração do sinal induzidas pela PRL são reguladas por membros da família de proteínas supressores da citocina (SOCS- *supressores of cytokine signalling*) e por membros da família CIS (*cytokine inducible SH2-containing protein*). As SOCS interagem com o receptor ou com o Jak2, atenuando a sinalização, que pode ser efectuada através da competição com as STATs pelo local de ligação ao receptor e pela interacção com proteínas alvo para degradação. Por sua vez, as CIS actuam apenas por competição com as STATs por bloquearem locais de ligação do receptor da PRL (Bachelot & Binart, 2007) (Figura 5).

A PRL induz rapidamente a activação do SOCS-1, SOCS-3 e CIS nos neurónios hipotalâmicos, adipócitos e células mamárias. Existe a evidência que a PRL induz a internalização do seu receptor, especialmente das isoformas curtas (Freeman et al., 2000).

Em suma, a transdução do sinal activado pelo receptor da PRL não é uma progressão linear, envolvendo várias vias de sinalização, o que difere predominantemente entre as várias células que expressam o referido receptor.

V. Funções da prolactina

A PRL é a hormona hipofisária melhor conhecida, sendo essencial na iniciação e manutenção da lactação. Contudo, como já referido, esta hormona é altamente versátil, exercendo acções diversas relacionadas com a reprodução, crescimento e desenvolvimento, osmorregulação, metabolismo, regulação imunitária, função cerebral, comportamento e tumorigénese humana (Grattan & Kokay, 2008).

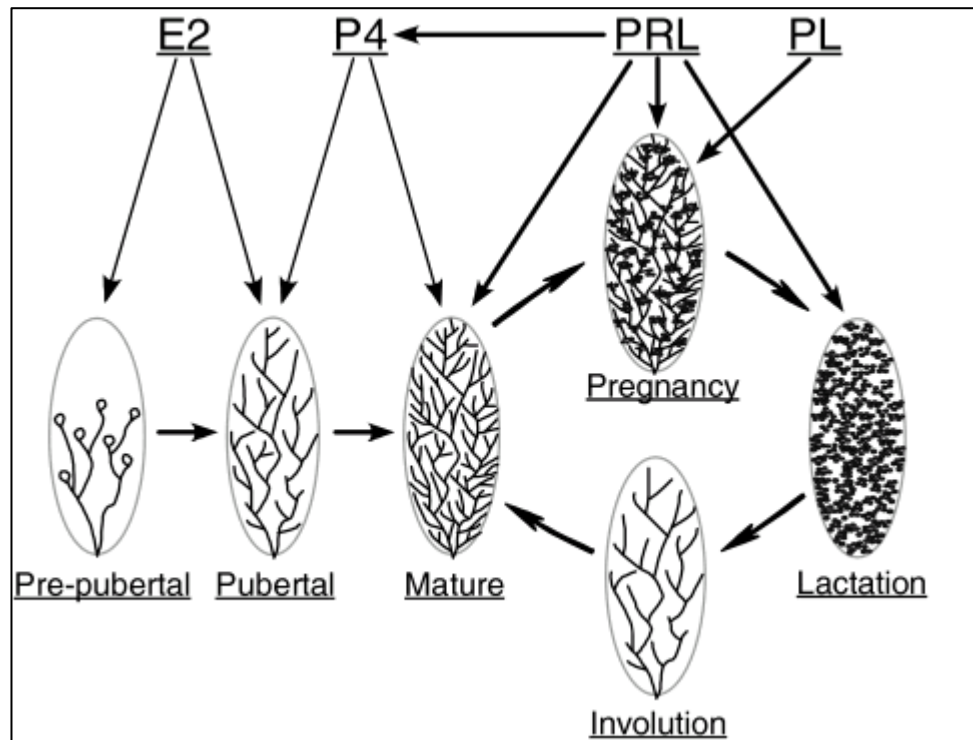
a. Função da PRL na glândula mamária

i. Desenvolvimento da glândula mamária

A PRL exerce múltiplos efeitos na glândula mamária. É responsável pelo crescimento e desenvolvimento desta glândula, pela síntese e manutenção do leite (lactogénese e galactopoiese, respectivamente) e pela involução (retorno ao estado de não lactação) (Freeman et al., 2000, Nouhi et al., 2006).

Nos adultos a organogénese mamária é irreversível, ao passo que as alterações funcionais e estruturais que ocorrem durante a gravidez são reversíveis, ocorrendo de novo em gravidezes e lactações sucessivas. A maior parte da informação sobre a morfogénese mamária e lactação é proveniente de estudos com ratos (Ben-Jonathan et al., 2008).

A glândula mamária desenvolve-se desde a superfície epitelial e base do mesênquima. Contudo, o controlo molecular embrionário do desenvolvimento mamário é ainda largamente desconhecido. No entanto, sabe-se que os factores hormonais essenciais que interferem nas fases tardias do desenvolvimento desta glândula, em ratos, são os estrogénios, glicocorticóides e GH durante a puberdade e os estrogénios, progesterona e hormona luteínica (*LH-luteinizing hormone*) e/ou PRL durante a gravidez. Por sua vez, o desenvolvimento funcional do epitélio da mama durante a gravidez depende predominantemente da PRL (Bachelot & Binart, 2007) (Figura 6).



Adaptado de Ben-Jonathan. (2008)

Figura 6 Hormonas que regulam o desenvolvimento e a função da glândula mamária, em ratos. As papilas mamárias formam-se durante o desenvolvimento embrionário e alongam-se desde o nascimento até à puberdade. No início do ciclo estral, ocorre a ramificação dos ductos sob a influência do E2 (estrogénio) e da P4 (progesterona), sendo esta última estimulada pela PRL. Durante a gravidez, a elevação da PRL e da PL estimulam a ramificação ductal, bem como a formação e diferenciação dos alvéolos. Durante a lactação, a PRL estimula a produção dos componentes principais do leite. No fim deste período, a glândula mamária retorna ao seu estado pré-gestacional através da apoptose de células epiteliais (involução) e remodelação do estroma, ficando preparada para gestações futuras. E2 (estrogénio), P4 (progesterona), PL (lactogénio placentar), PRL (prolactina),

A proliferação e diferenciação da capacidade secretora estão dependentes da presença do receptor da PRL, bem como da via de sinalização Jak2–STAT5 (Noubi et al., 2006). No entanto, as bases dos eventos celular e molecular ainda não são completamente conhecidas. As contribuições específicas do referido receptor, bem como dos factores de transcrição STAT5a e 5b, na formação e diferenciação do epitélio alveolar mamário, ainda continuam a ser objecto de estudo.

Deste modo, foram avaliados os níveis molecular e histológico do desenvolvimento da glândula mamária durante a gravidez, em animais que se induziu a não expressão do receptor da PRL (*PRL-null*) e do factor de transcrição STAT (*STAT-null*) no epitélio mamário. Concluiu-se assim que o factor de transcrição *STAT5-null* no epitélio mamário tem a capacidade de desenvolver os ductos, mas falha na formação dos alvéolos e na expressão do gene da proteína do leite. Pelo contrário, o receptor conduz à formação de estruturas alveolares com uma pequena abertura luminal.

Com recurso a microscopia electrónica foi possível demonstrar a perturbação no contacto célula a célula por transplante do receptor da PRL e STAT5 epitelial. O co-transporte Na-K-Cl (sódio-potássio-cloro) característico do epitélio ductal e a proteína associada com as *tight junctions* (ZO-1) são mantidos nas estruturas alveolares-*like* do receptor da PRL e STAT5 epiteliais. Em contraste, a conexina 32 da *gap junction*, usualmente expressa no epitélio secretor, não foi detectada após a inibição da expressão do receptor e do factor de transcrição, em ratos. Assim sendo, esse estudo demonstrou que tanto o receptor como o factor STAT são fundamentais para a proliferação e diferenciação dos alvéolos mamários durante a gravidez (Bachelot & Binart, 2007).

O desenvolvimento mamário da PRL e do seu receptor *null*, em ratos, é essencialmente bloqueado no estado de crescimento ductal, o que é razoável, uma vez que, a maior parte do desenvolvimento da glândula mamária ocorre durante a gravidez (Horseman et al., 1997).

Com o intuito de avaliar a acção deste receptor no desenvolvimento da referida glândula em ambiente endócrino normal e na gravidez, foram realizados transplantes experimentais em animais que apresentavam ausência de receptores da PRL no epitélio mamário. Verificou-se assim que, o receptor da PRL é capaz de induzir o desenvolvimento de ramos ductais, em animais virgens. Contudo, durante a gravidez foi observada a total falência do desenvolvimento lóbulo-alveolar, tendo-se verificado somente o aparecimento de pequenos botões alveolares mamários. De acordo, as glândulas mamárias dos animais com receptores ausentes da PRL podem manter a gravidez, seguindo um tratamento com progesterona, mas falham o desenvolvimento lóbulo-alveolar (Bachelot & Binart, 2007).

Os receptores da PRL estão presentes no estroma, mas não apresentam um papel directo no desenvolvimento desta glândula (Camarillo et al., 2001, Hovey et al., 2001). De facto, nas glândulas mamárias que apresentam receptores ausentes no estroma ocorre um desenvolvimento normal, sendo desconhecido se esses receptores são essenciais na lactação.

O desenvolvimento mamário e a diferenciação alveolar anómalos em ratos hemizigotos para o receptor da PRL, durante a gravidez, sugere que o nível do fluxo de sinalização iniciado pela própria hormona, pode modular o desenvolvimento da glândula mamária. Isto é correspondente a redução da fosforilação do STAT5 e acentuada redução da expressão dos genes das proteínas do leite. O desenvolvimento da glândula mamária é arrastado até metade do tempo de gestação. A PRL activa o STAT5 apenas no epitélio mamário e a GH activa esse mesmo factor preferencialmente a nível do estroma (Gallego et al., 2001). Sabe-se que, na ausência de receptores da GH o desenvolvimento ductal é prejudicado. Esta observação

suporta a noção da ocorrência de sinal da GH através do compartimento do estroma. De facto, a demonstração que a PRL e a GH activam a STAT5 em compartimentos diferentes, reflecte o papel específico destas duas hormonas no desenvolvimento e diferenciação ductal e alveolar.

Através da inactivação de um ou de ambos os genes dos factores de transcrição STAT5a e STAT5b, conseguiu-se apurar os papéis únicos e redundantes destas duas isoformas. A deficiência da isoforma STAT5a resulta na perda do desenvolvimento da glândula mamária, dependente da PRL. Pelo contrário, a inactivação do STAT5b não afecta o desenvolvimento e função glandulares, mas retarda de forma severa o seu crescimento (Udy et al., 1997).

Em ratos, *splicing* alternativo no gene do receptor da PRL resulta em quatro formas diferentes, que diferem no comprimento do citoplasma. A função da forma longa está claramente estabelecida, ao contrário das funções das três formas curtas. Deste modo, através da utilização de modelos transgénicos que expressam a forma curta dos receptores de PRL (F3-SPRLR) nas glândulas mamárias, verificou-se a ocorrência de redução do desenvolvimento alveolar, da fosforilação do STAT5 e da expressão dos genes das proteínas do leite. No entanto, não ocorreu alteração da proliferação, o que sugere que esta forma curta pode actuar como um domínio negativo de controlo do nível de diferenciação ocorrido na glândula mamária. A expressão transgénica de uma outra forma curta (S1), em ratos heterozigotos para o receptor da PRL, normalmente incapaz de lactação após a primeira gravidez, actua na restituição do desenvolvimento da glândula mamária a nível da proliferação e diferenciação, actuando assim, de modo similar à forma longa. Por sua vez, a função da forma curta S2 ainda não está esclarecida.

Um elevado número de estudos utiliza estes modelos, o que permite a revisão de candidatos moleculares regulados pela PRL a nível transcripcional. Estes candidatos incluem citoqueratinas, moléculas de adesão celular, factores de transcrição e alguns factores de

crescimento e já demonstraram ser importantes para o desenvolvimento mamário. Além destes, os factores IGF2 (*insulin-like growth factor 2*) e *Rankl* demonstraram ser cruciais para este processo. É de sublinhar o papel do primeiro como mediador da PRL, responsável pela indução da morfogénese da mama (Bachelot & Binart, 2007).

ii. Lactogénese

Como já supracitado, a glândula mamária sofre alterações estruturais e funcionais dramáticas durante a gravidez em preparação para a lactação, onde estão incluídas um aumento dos ramos ductais e a emergência de numerosos alvéolos. A diferenciação alveolar das estruturas secretoras, designadas por ácinos, acumula lípidos. O controlo hormonal da alveologénese é complexo, com PRL, PL e progesterona como principais reguladores e insulina, GH, corticoesteróides e hormonas da tiróide a providenciar apoio metabólico (Ben-Jonathan et al., 2008).

A morfogénese alveolar está relacionada com a lactogénese, que é funcionalmente dividida em duas fases. A primeira fase começa a meio do tempo de gestação e envolve a expressão progressiva de genes que codificam componentes do leite, tais como a β -caseína, proteínas do leite e α -lactoalbumina. A segunda fase ocorre por sua vez, no momento do parto e implica a secreção abundante de leite.

A PRL e a PL são os principais reguladores da transição de glândula mamária proliferativa a secretora, em todas as espécies estudadas.

A lactação é controlada em exclusivo, pelo promotor III do gene do receptor da PRL, sendo que a glândula mamária expressa principalmente a isoforma longa do receptor. A activação deste envolve a ligação dos factores de transcrição C/ERB β (CCAAT/*enhancer-binding protein*) e Sp1 [*SV40-promoter-1*, que reconhece as boxes GC no DNA] nos

respectivos elementos de ligação e a activação da sequência a montante, assemelhando-se com o local de ligação AP-2 (*activating protein 2*). Vários estudos *in vitro* e *in vivo* confirmaram que o receptor da PRL na glândula mamária é fosforilado sob a ligação da PRL, activando a via Jak2-STAT5, sendo esta responsável quer pelo desenvolvimento da glândula mamária, como já referido, quer pela lactogénese. O factor de transcrição STAT, especialmente o STAT5a, activado pela isoforma longa do receptor da PRL induz a transcrição dos genes das proteínas do leite. Uma mutação no STAT5a ou 5b é prejudicial para o desenvolvimento lóbulo-alveolar da glândula mamária e resulta em lactação inviável em fêmeas homozigotas para o referido receptor. O sinal de transdução responsável pela indução do crescimento e desenvolvimento desta glândula tem sido extensamente estudado. Mais de 30 genes já foram identificados como factores-chave envolvidos na fase secretora da glândula mamária (Freeman et al., 2000, Ben-Jonathan et al., 2008).

Apesar de essencial para a lactogénese, em roedores e humanos, a PRL não actua isoladamente. Para um processo ideal é necessário a combinação de PRL, com glicocorticóides, insulina e entrada de factores parácrinos, como exemplo a PTHrP (*parathyroid hormone-related protein*) e IGF-1. Em roedores, o estrogénio é indirectamente envolvido, estimulando a libertação de PRL hipofisária pré-parto. Por outro lado, a progesterona inibe a expressão do receptor da PRL, por antagonizar o aumento da expressão das proteínas do leite, por ocupar os receptores de glicocorticóides e por prevenir o encerramento das *tight junctions* no epitélio mamário, que deve ocorrer para permitir a segunda fase da lactogénese (Ben-Jonathan et al., 2008).

iii. Lactação

A produção de leite é metabolicamente dispendiosa para a mãe e requer acções coordenadas de várias hormonas. Além das alterações da glândula mamária, ocorrem também modificações no hipotálamo, hipófise e tecido adiposo. A grande dificuldade em estudar o controlo da lactação é a inexistência de um modelo *in vitro* totalmente diferenciado de uma glândula mamária produtora de leite. Contudo, o tratamento *in vivo* com a bromocriptina revela que a PRL é necessária para a lactação na maioria das espécies, como já referido. Em ruminantes, a GH isoladamente ou em conjunto com PRL é responsável pela galactopoiese (Ben-Jonathan et al., 2008).

A secreção de PRL na lactação aumenta significativamente em poucos minutos após o início da sucção. Este reflexo neuroendócrino está bem estudado, consistindo nas vias neural aferente e hormonal eferente. A sucção activa receptores sensíveis à pressão nos mamilos e gera impulsos nervosos que viajam através do tracto nervoso espinho-talâmico até ao cérebro, activando uma rede neuronal central que converge para o hipotálamo. Isso resulta num aumento coordenado da secreção de PRL a partir do lobo anterior da hipófise e de OT pelo lobo posterior (Ben-Jonathan et al., 2000).

A PRL aumenta a produção de leite, afectando a síntese de todos os seus constituintes principais: proteínas, lactose e lípidos. Entre as proteínas, a PRL aumenta a síntese da β -caseína, das proteínas ácidas do leite e da α -lactalbumina. Esta última, constitui a subunidade reguladora do complexo sintetase da lactose. Assim, a PRL aumenta a síntese de lactose, por aumentar a absorção de glicose e a disponibilidade da α -lactoalbumina (Freeman et al., 2000).

Durante a lactação, a PRL actua como um sensor fisiológico que responde às necessidades de produção de leite, através da separação de nutrientes provenientes do tecido

adiposo para a glândula mamária. O metabolismo dos lípidos pelo tecido mamário em não lactantes é insignificante, comparativamente com o tecido adiposo. Durante a lactação, porém, a produção de lípidos é escassa no tecido adiposo, aumentando significativamente na glândula mamária. No entanto, o papel da PRL na síntese de lípidos pelo tecido mamário é instável. Segundo alguns autores, a PRL aumenta a produção de lípidos, activando quatro enzimas: a lipoproteína lípase (LPL-*lipoprotein lipase*), que hidrolisa os triglicéridos circulantes; a piruvato desidrogenase, que gera acetil-coenzima A (CoA); a acetil-CoA carboxilase, que produz malonil CoA; e sintetase de ácidos gordos (FAS-*fatty acid synthase*), que produz palmitato. No entanto, outros autores argumentam que a GH e a insulina são mais importantes do que a PRL na lipogénese mamária, com a hormona PRL a actuar como factor de sobrevivência para as células epiteliais mamárias (MEC- *mammary epithelial cells*).

Durante a lactação foram detectadas grandes mudanças no sistema neuroendócrino de ratos. A libertação de PRL induzida por sucção, só é possível graças à supressão da actividade dos neurónios TIDA (*tuberoinfundibular dopamine*) e à estimulação concomitante de vários factores estimuladores da secreção da hormona (PRFs). A hiperprolactinémia fisiológica pode ser mantida uma vez que, os neurónios TIDA tornam-se insensíveis à inibição de retrocontrolo negativo induzido pela PRL. Ao mesmo tempo, a expressão do receptor da PRL é aumentada nos plexos coróide e no hipotálamo. Os receptores no plexo coróide medeiam o transporte de PRL para o cérebro, enquanto os do hipotálamo estão envolvidos no comportamento materno e aumento do apetite e ingestão de alimentos (Ben-Jonathan et al. 2008).

Ao contrário dos roedores, a produção abundante de leite em mulheres começa apenas no segundo dia após o parto, apesar dos níveis elevados de PRL. Este facto é atribuído a uma queda lenta de progesterona sérica para níveis que já não inibem a lactação. Sem o

aleitamento materno, os níveis basais de PRL permanecem elevados durante as primeiras duas a três semanas após o parto, começando a declinar depois desse período.

A sucção é o estímulo fisiológico mais potente e melhor caracterizado para a estimulação da secreção de PRL, em seres humanos. A magnitude do aumento de PRL induzida por sucção é robusta durante o início da lactação, mas diminui depois desse período. Convém salientar que estímulos tácteis da glândula mamária podem aumentar os níveis de PRL sérica em mulheres não lactantes, mas não em homens. A amenorreia durante a lactação, usada como um método de contracepção, por algumas mulheres após o parto, está associada com a frequência e duração dos episódios de amamentação, bem como com os níveis elevados de PRL.

O tecido mamário, em humanos, produz a sua própria PRL. Em mulheres não lactantes, a progesterona inibe a libertação de PRL das células epiteliais. No entanto, não tem efeito sobre a produção de PRL pelos adipócitos. Por outro lado, não existe informação sobre a síntese desta hormona ou do seu receptor em lactantes. Quantidades significativas de PRL fosforilada e glicosilada são também encontradas no leite humano (Ben-Jonathan et al., 2008).

iv. Involução

A involução é parte integrante do ciclo de vida da glândula mamária. Permite a regressão da glândula ao estado pré-gestacional, ficando apta para futuras gestações e aleitamentos. É caracterizada por sucessivas etapas, que incluem a cessação da produção de leite, a apoptose de células epiteliais e remodelação extensiva do tecido. Geralmente ocorre após a cessação natural do aleitamento, mas pode ser induzida pela supressão da PL.

A Jak2-STAT é a principal via de sinalização envolvida na primeira fase de involução. O STAT3, activado pelo factor inibidor de leucemia, é fundamental para a involução. A via

Jak2-STAT também estimula a activação das proteínas SOCS, que atenuam a transdução de sinal. As proteínas SOCS-1 e SOCS-2 actuam a jusante do receptor da PRL e regulam a sua actividade durante a gravidez e lactação. Por sua vez, a SOCS-3 atenua a sinalização da via Jak2-STAT durante a involução.

Contudo, o papel exacto da PRL na involução humana ainda não é bem compreendido, por inacessibilidade de lactação em glândulas mamárias para experimentação. Evidência anedótica deste processo sugere a substituição gradual de ductos e alvéolos por tecido estromal e gordura, a reversão das células alveolares a um estado menos diferenciado e a perda de células epiteliais por apoptose (Ben-Jonathan et al., 2008).

b. Função da PRL na reprodução

A PRL exerce múltiplos efeitos, regulando a diferenciação e a proliferação em diversos tecidos (Bole-Feyson et al., 1998). Uma grande parte da literatura afirma que esta hormona apresenta um papel fundamental na função reprodutora. Esta função depende da acção coordenada de vários órgãos e glândulas ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal-reprodutor (Bachelot & Binart, 2007, Ben-Jonathan et al., 2008).

A produção de descendência viável requer a geração e entrega atempada de gâmetas funcionais, fertilização e implantação bem-sucedidas, tempo de gestação que permita o óptimo desenvolvimento fetal, parto de termo e fornecimento de leite para a nutrição neonatal. Embora o sucesso da reprodução não seja essencial para o indivíduo, é crucial para a sobrevivência da espécie. Por tal motivo, cada espécie desenvolveu diferentes padrões de ciclos de reprodução, comportamento sexual, bem como duração da gestação e lactação, de modo a serem mais adequados para a sua estrutura social e meio ambiente. Sendo uma

hormona adaptativa, a PRL desempenha um papel pouco crítico, mas principalmente de modulação, nos processos de reprodução.

Um número considerável de funções chave da PRL foi clarificado com recurso a modelos transgênicos e *knockout*, em ratos. Deste modo sabe-se que, as fêmeas homozigotas para o receptor da PRL são completamente estéreis. Estas, após acasalamento com machos com fertilidade estabelecida não conseguiram engravidar. Cada fêmea acasalada repetidamente em intervalos irregulares, não atingiram um estado de pseudogravidez. As fêmeas homozigotas apresentaram ciclos estrogénicos irregulares, falhando qualquer padrão de consistência cíclica. Assim, todas estas observações permitem concluir que a PRL é essencial na reprodução feminina (Horseman et al., 1997, Bachelot & Binart, 2007).

i. Função da PRL no corpo lúteo

A acção da PRL no corpo lúteo depende da espécie e do estado do ciclo estrogénico. Em ratos, esta hormona pode ter acção luteotrófica após acasalamento ou luteolítica na ausência de estímulo de acasalamento. Na maioria dos ratos, a PRL actua como hormona luteotrófica, mantendo o corpo lúteo e induzindo a produção de progesterona. Esta hormona é essencial para a implantação do ovo fertilizado, juntamente com os estrogénios. Além disso, é importante para a manutenção da gravidez e inibição da ovulação (Freeman et al., 2000, Bachelot & Binart, 2007,).

Na ausência de PRL, o esteróide principalmente produzido pelo corpo amarelo é a 20α -hidroxiprogesterona, cuja síntese de progesterona é catalisada pela 20α -hidroxiesteróide desidrogenase. Este metabolito é inactivado na maioria dos ensaios com progesterona.

A PRL estimula a secreção de progesterona de duas formas diferentes. Por um lado, potencia o efeito esteroidogénico da LH nas células da camada granulosa e por outro, inibe a

enzima 20 α -hidroxiesteróide desidrogenase, que inactiva a progesterona. É de salientar que, a síntese de PRL pela decídua é única nos humanos (Freeman et al., 2000, Jabbour et al., 2001, Bachelot & Binart, 2007).

O papel da PRL decidual parece envolver a estimulação do local do receptor do estradiol e a inibição da IL-6 da decídua e da 20 α -hidroxiesteróide desidrogenase, fundamentais para a vida fetal. Deste modo, conclui-se que em humanos, assim como em ratos, os níveis elevados de PRL inibem a luteinização das células da granulosa e a esteroidogénese.

Outra prova da dependência do corpo lúteo em progesterona é encontrada em receptores da hormona não funcionantes que perderam a função luteínica normal e são estéreis devido ao aumento do nível de ovulação, oogénese aberrante e falência de implantação. A PRL é essencial para a biossíntese da progesterona e hipertrofia da célula luteínica durante a gravidez. Além desta função luteínica, o receptor da PRL medeia numerosas funções nas células da granulosa e oócitos.

Além do papel luteotrófico, existe evidência em ratos que a PRL também pode apresentar função luteolítica, por induzir morte celular programada do corpo lúteo. Este efeito é mediado por linfócitos CD3 positivos, cujo aumento da expressão na membrana do Fas ligando, é conhecido por mediar a morte celular luteínica, através do receptor Fas. Existe evidência que a PRL pode desempenhar uma função de limpeza por induzir a regressão estrutural à forma mais antiga destas. Este facto é demonstrado pelo corpo lúteo ser não-funcionante no momento em que a PRL exerce esse mesmo efeito.

O mecanismo através do qual a PRL pode ser luteolítica ou luteotrófica ainda continua incerto. Contudo, existe uma hipótese que tenta explicar este processo. Assim sendo, acredita-se na existência de um tempo crítico entre o período de exposição da PRL durante o ciclo estrogénico, em que o corpo lúteo do rato adquire a capacidade de expressar a *monocyte*

chemoattractant protein-1, que consequentemente vai interagir com a PRL na fase proliferativa, induzindo morte celular do corpo lúteo.

Ambas as isoformas do receptor da PRL estão presentes nos ovários. A transcrição do referido receptor neste órgão é controlada pelo desenvolvimento intrínseco e por regulação hormonal. A regulação deste processo no gene da PRL nos ovários é realizado pelo promotor I, gónada-específico, e pelo promotor III “genérico”. O activador transcripcional essencial do promotor I do receptor da PRL é o factor-1 esteroidogénico (*SF-1-steroidogenic factor-1*)-elemento de ligação, que é activado pelo SF-1. O SF-1 é uma proteína de ligando DNA zinco-específico, também conhecido por Ad4BP (Freeman et al., 2000).

Recentemente, a expressão do receptor da PRL nas células luteínicas foi associado a fosfoproteína (*PRAP- prolactin-R associated phosphoprotein*). Este elemento liga-se ao domínio intracelular da forma longa do receptor da PRL, mas não da isoforma curta. A expressão do PRAP é regulada pelo estrogénio e pela PRL. Estruturalmente, esta fosfoproteína demonstra 89% de homologia com a nova forma caracterizada (tipo 7) do 17 β -hidroxiesteróide desidrogenase/17-cetosteróide reductase (17-HSD), sugerindo que a PRAP pode ser a enzima que catalisa a conversão da estrona em estradiol (Freeman et al., 2000).

ii. Função da PRL no comportamento reprodutor

Existem várias evidências que a PRL influencia o comportamento reprodutor. Em humanos, os níveis elevados desta hormona estão associados com reacções psicossomáticas, incluindo a pseudogravidez. Existem receptores da PRL no núcleo ventromedial do hipotálamo, cuja área controla o comportamento sexual feminino. Coincidentemente, a iontoforese da hormona nessa área aumenta a actividade eléctrica neuronal. Contudo, ainda

não há uma base firme para definir o papel da PRL no comportamento sexual feminino (Freeman et al., 2000).

iii. Função da PRL na reprodução masculina

Uma análise preliminar da fertilidade masculina descreve que cerca de 20% dos homozigotos para o receptor da PRL são estéreis. No entanto, este facto não se deve ao defeito no comportamento sexual. Dois estudos posteriores, usando linhagens separadas de ratos com receptores de PRL ausentes, originários da mesma população inicial, mas que divergiram desde cedo, foram submetidos a nova análise deste fenótipo. Um estudo não encontrou qualquer efeito na fertilidade, enquanto outro demonstrou que apenas 10% são estéreis e aqueles que são férteis só têm 40% de hipóteses de produzir uma primeira gravidez bem-sucedida. Estes dados contrastantes podem ser devido ao efeito da PRL na reprodução masculina, que pode ser modificada pela divergência a nível do fundo genético. Além disso, a maioria dos homens com receptores ausentes são férteis, apesar da PRL apresentar um papel na função neuroendócrina reprodutora, controlada pela secreção de LH. Deste modo, conclui-se que a PRL apresenta um papel modesto na fertilidade masculina, contrariamente ao que sucede na reprodução feminina (Bachelot & Binart, 2007).

A PRL e o seu receptor são expressos nas células epiteliais da próstata, em humanos e ratos, sendo o seu nível aumentado com o tratamento com androgénios, demonstrando ser um factor de crescimento autócrino/parácrino ou um factor de sobrevivência para as células epiteliais da próstata, *in vitro*. O peso da próstata está ligeiramente aumentado em animais jovens com receptores de PRL ausentes. Algumas alterações nas células do estroma e epiteliais no lobo dorsal ocorrem provavelmente, reguladas pela cooperação entre a PRL e os androgénios. A PRL apresenta um papel subtil na próstata, enquanto a hiperprolactinémia tem

um efeito directo na hiperplasia prostática. Esta evidência está de acordo com o papel da PRL na proliferação celular (Freeman et al., 2000, Krüger et al., 2003, Bachelot & Binart, 2007).

iv. Comportamento materno e neurogénese

O comportamento materno em ratos PRL $-/-$ é normal. Contudo, sabe-se que, em virgens e grávidas PRLR $-/-$ ou PRLR $+/-$ o comportamento materno induzido pelas crias é significativamente reduzido, independentemente de outras actividades comportamentais e funções olfactivas, implicando que o receptor é um importante regulador do comportamento materno. Além disso, a diminuição deste comportamento está associado à falha na lactação em fêmeas heterozigotas para o receptor da PRL (Bachelot & Binart, 2007).

A acção estimulante da PRL no comportamento materno pode ser induzida pela PL. Deste modo, animais com o gene da PRL disrupto exibem algum comportamento materno, presumivelmente mediado através da activação do receptor da PRL pela PL. Em adição, a mimica molecular da fosforilação da PRL, S179 D, é capaz de retardar o comportamento materno em ratos. Durante a gravidez e lactação, foi recentemente descoberto que os novos neurónios produzidos na parte anterior do cérebro migram para o bolbo olfactivo, onde vão participar no processo olfactivo recebido pela recém-mãe, que tem de se adaptar às necessidades e mudanças da nova fase. Esses novos neurónios estabelecem conexões funcionais ao sétimo dia da gravidez, bem como ao sétimo dia da lactação, o que era aparente nas fêmeas pseudográvidas, sendo que essa resposta pode ser gerada unicamente pelas alterações associadas com esse estado (Grattan & Kokay, 2008).

Alguns autores demonstraram que a neurogénese pode ser induzida por administração de PRL por via sistémica ou central. Esta foi a primeira demonstração que a PRL pode estimular a génese, migração e diferenciação dos neurónios no cérebro de mães adultas. Foi também a

primeira evidência que os níveis de neurogênese podem ser influenciados por alterações do *status* endócrino.

Além de estimular a mitogênese na zona sub-ventricular, a PRL também estimula a mitogênese nos astrócitos e nos oligodendrócitos. Estas células gliais apresentam um papel de ajuda na recuperação cerebral (Grattan & Kokay, 2008, Gregg, 2009).

c. Função da PRL na regulação imunitária

A PRL é um mediador imunoneuroendócrino comum, onde os sistemas nervoso, endócrino e imunitário comunicam entre si.

A primeira evidência que a PRL desempenhava um papel na regulação imunitária foi demonstrada em 1972. Nessa data, foi verificada que esta hormona quando administrada por via exógena estimulava a função do timo em ratos que apresentavam anomalia na secreção ou função da PRL. Pouco depois, dois investigadores verificaram que a hipofisectomia ou a supressão da secreção da PRL com a bromocriptina conduziam a atenuação da resposta celular ou humoral, que podia ser reversível através da administração de hormona exógena (Freeman et al., 2000).

Duas revisões recentes demonstraram que a PRL estimula a mitogênese nos linfócitos T normais e nas células Nb2 do linfoma. Não é surpreendente que esta hormona afecte as células acima mencionadas, uma vez que, o receptor da PRL foi detectado em linfócitos humanos periféricos, sendo a sua expressão regulada pela própria PRL. Além disso, os efeitos desta hormona nos linfócitos podem envolver a IL-2, incluindo a activação dos linfócitos T pela IL-2, que requer PRL. Interessante é o facto do local de acção da PRL, que modifica os efeitos da IL-2 nas células linfocitárias, estar localizado no núcleo. A PRL é também necessária para a estimulação da proliferação mitógena dos linfócitos. As células Nb2,

derivadas dos linfócitos T imaturos, são igualmente dependentes da actividade mitógena da PRL. De facto, esta propriedade tem servido como base, de alta sensibilidade, nos ensaios específicos da hormona em análise.

Relativamente ao papel da PRL na hematopoiese, ainda não há uniformidade de opiniões. Apesar das disrupções alvo no gene da PRL conduzir a várias anomalias dependentes da hormona como a lactação, não existe diferença alguma entre homozigotos e heterozigotos na expressão antigénica das células B e T. Estas evidências demonstram assim, que a PRL não apresenta um papel fundamental na diferenciação primária das células linfocitárias, sendo que a ausência desta hormona durante o desenvolvimento pode ser compensada por outros factores (Ben-Jonathan et al., 1996, Freeman et al., 2000, Montgomery, 2001).

O papel da PRL na resposta imunitária no organismo é um assunto de contínua preocupação, sendo aparente que essa resposta *in vivo* é estimulada por esta hormona.

Várias experiências sugerem que a PRL linfocitária apresenta um papel específico na rejeição de enxerto de pele e pode ter também um papel na resposta a outros transplantes.

Demonstrações imunocitoquímicas do receptor da PRL nos linfócitos B e T foram seguidas por detecção do mRNA das isoformas curtas e longas do receptor no timo, baço, nódulos linfáticos e medula óssea, em ratos. A expressão das isoformas do receptor da PRL foi mais extensa nas células do baço e do timo em ratos jovens, comparativamente com adultos, bem como no ciclo estral, gravidez e lactação.

As funções da PRL são mais extensivamente descritas e revistas nas células da linhagem Nb2. Estas células expressam a isoforma intermédia do receptor da PRL. Nos linfócitos Nb2, a activação do receptor está associado a rápida fosforilação de tirosina nos factores STAT5a, STAT5b, STAT1 α e STAT3, a formação rápida e selectiva de heterodímeros STAT5a/b, a fosforilação marcada de serina nas STAT5a e STAT5b e por último, ao aparecimento de duas

formas do complexo proteico STAT5, diferentes qualitativamente, que fazem distinção entre os oligonucleótidos correspondentes ao elemento de resposta da PRL na β -caseína e ao gene promotor do factor-1 regulado pelo interferão (Freeman et al., 2000, Cejkova et al., 2009).

d. PRL e doenças auto-imunes

No geral, as doenças auto-imunes podem ser caracterizadas por um desequilíbrio imunológico provocado pelo desenvolvimento e sobrevivência de células B e T auto-reactivas. A PRL pode desempenhar um papel imunomodulador na génese e progressão destas doenças. A hiperprolactinémia pode ser detectada em doenças específicas de órgão, como diabetes *mellitus* tipo 1, doença de *Graves*, tiroidite de *Hashimoto*, doença de *Addison*, hipofisites linfocíticas, doença celíaca e esclerose múltipla, assim como em diversas doenças auto-imunes sistémicas (LES-lúpus eritematoso sistémico, AR-artrite reumatóide).

Em doentes com LES, foi detectado uma correlação entre a actividade da doença e os níveis de PRL. O soro de doentes com LES induz a diferenciação de monócitos normais em células dendríticas, em correlação com a actividade da doença, dependendo das acções do $\text{INF-}\alpha$ (*interferon-alpha*), complexos imunes e da PRL. O papel específico da PRL extra-hipofisária na auto-imunidade é demonstrado pela observação de linfócitos periféricos sanguíneos de doentes com LES que produzem elevadas quantidades de PRL (Walker & Jacobson, 2000, Montgomery, 2001, Cejkova et al., 2009).

e. Função da PRL no crescimento e metabolismo

As acções da PRL na homeostase metabólica, em condições não lactantes, receberam até à data pouca atenção, comparativamente com a GH, hormona reguladora da homeostasia por excelência.

Seguidamente, serão revistos dados recentes sobre os efeitos da PRL na regulação do peso corporal, no desenvolvimento dos ilhéus pancreáticos e controlo de insulina e no metabolismo lipídico. A maioria da informação é proveniente de experiências em ratos, com alguns estudos realizados em seres humanos e cultura de células de tecido humano adiposo e adipócitos (Ben-Jonathan et al., 2008).

i. Regulação de peso corporal

O peso do corpo permanece dentro de uma faixa relativamente estreita, uma vez que, a ingestão alimentar e o gasto de energia são constantemente monitorizados e ajustados. Os sinais periféricos que transmitem o estado nutricional afectam a circulação cerebral, regulando a ingestão alimentar e o gasto energético. Estes sinais incluem substratos ricos em energia tais como ácidos gordos, glicose, hormonas e adipocinas. Considerando que a PRL tem acção bem estabelecida na promoção do peso em peixes e aves, na maioria dos mamíferos tem um efeito moderado, inconsistente ou até nenhum efeito no peso corporal (Ben-Jonathan et al., 2008).

Em ratos, as elevações crónicas de PRL estão associadas com o aumento da ingestão de alimentos e do peso corporal. Pelo contrário, a supressão dos níveis de PRL por bromocriptina tem o resultado oposto. Injecções de PRL no núcleo paraventricular conduzem ao aumento da ingestão de alimentos, indicando que esta hormona interage com os centros hipotalâmicos que regulam o apetite. Os homens com ectopia hipofisária demonstram pequeno aumento do peso corporal, com um declínio suave da massa gorda. Como discutido abaixo, a PRL exerce vários efeitos específicos sobre os adipócitos, embora não se traduzam em mudanças globais no peso corporal.

Em humanos, a elevação sustentada da PRL causada por prolactinomas leva a aumento do peso corporal em alguns doentes, efeito esse que pode ser amenizado com o recurso ao tratamento com a bromocriptina. Nomeadamente, a redução do peso corporal em resposta a este medicamento é mais eficaz em homens do que em mulheres. No entanto, esta perda de peso não acontece em todos os doentes, sendo modesto e retardado, não sendo bem correlacionado com a supressão rápida e acentuada dos níveis séricos de PRL.

O aumento do peso corporal é também um efeito colateral comum em doentes que tomam medicamentos antipsicóticos, que antagonizam o receptor da DA tipo 2 (D2R-*dopamine type 2 receptor*). No entanto, se a PRL elevada é causa ou coincidência desse aumento de peso é ainda controverso (Ben-Jonathan et al., 2008, Grattan & Kokay, 2008).

ii. Pâncreas e insulina

A insulina desempenha um papel crucial na homeostase metabólica, regulando os níveis de glicose no soro. A diminuição da produção de insulina (diabetes *mellitus* tipo 1) e a sensibilidade reduzida às suas acções (diabetes *mellitus* tipo 2) são doenças que apresentam riscos graves para a saúde, estando a sua prevalência na sociedade a aumentar (Labriola et al., 2006, Ben-Jonathan et al., 2008, Cejkova et al., 2009).

O papel melhor caracterizado da PRL sobre o pâncreas é durante a gravidez, aumentando a produção de insulina em resposta às necessidades metabólicas crescentes da mãe, afectando o desenvolvimento dos ilhéus pancreáticos no feto (Labriola et al., 2006).

A maior parte do conhecimento sobre o papel da PRL no desenvolvimento ou função pancreática é proveniente de estudos com ratos, havendo informação limitada em humanos.

A gravidez induz profundas alterações no metabolismo materno, em resposta à necessidade de energia crescente fetal. Essas necessidades são satisfeitas por meio de um

aumento da ingestão calórica materna, elevação da resposta secretora de insulina, resistência à insulina em alguns tecidos e aumento do metabolismo lipídico. O pâncreas desempenha um papel importante nestas adaptações. Durante a gravidez, as células β -pancreáticas sofrem alterações estruturais e funcionais que incluem: aumento da secreção de insulina estimulada pela glicose, devido ao menor limiar de glicose; aumento da síntese de insulina; aumento da proliferação das células- β e hipertrofia; aumento do acoplamento entre as células- β ; e aumento do metabolismo da glicose. A PRL e a PL têm efeitos significativos em todos estes processos.

Apesar da GH ser frequentemente considerada como tendo efeitos importantes sobre o pâncreas, estudos experimentais utilizando hormonas homólogas, revelaram que a PRL e a PL são mais potentes e têm efeitos mais duradouros do que a GH. Por exemplo, a infusão de PRL em ratos diminuiu o limiar de estimulação da glicose, aumentou a secreção de insulina e o acoplamento das células- β pancreáticas. Pelo contrário, a GH teve pouco ou nenhum efeito. Da mesma forma, a PRL e a PL estimularam a libertação de insulina em ilhéus pancreáticos isolados, enquanto a GH foi ineficaz.

Uma alteração metabólica importante que ocorre durante a gravidez é a redução do limiar para a secreção de insulina, estimulada pela glicose. Dois sensores de glicose nas células- β , glucoquinase e transportador 2 de glicose são estimulados pela PRL em ilhéus pancreáticos isolados.

As acções da PRL nas células- β são mediadas pelo factor de transcrição STAT5 e por outras vias. O tratamento contínuo com PRL induz a activação transitória do STAT5a e uma activação bifásica do factor STAT5b. No entanto, *Fleenor* e *Freemark* argumentaram que a STAT5 não é essencial para a indução da secreção de insulina pela PRL, uma vez que, a supressão do factor STAT5 pelo promotor de insulina em ratos, não tem efeito sobre a

activação de insulina pela PRL. Esta hormona também regula a estrutura e a função dos ilhéus pancreáticos por induzir a fosforilação dos substratos -1 e -2 do receptor de insulina e por activação das vias PI3K e MAPK.

A análise do papel da lactogénese na função pancreática humana *in vitro* revelou efeitos semelhantes aos observados em roedores. Esses efeitos incluem o aumento do número de células dos ilhéus pancreáticos e a estimulação da secreção de insulina. Os dados clínicos sugerem que a PRL exerce efeitos diabetogénicos, pois a hiperprolactinémia é frequentemente associada a hiperinsulinémia e resistência à insulina.

A expressão do receptor da PRL em fetos de ratos foi detectada pela primeira vez nos ilhéus pancreáticos embrionários ao décimo sétimo dia e meio, com imunoreactividade do receptor verificada dois dias mais tarde. Na gestação precoce, o receptor é principalmente expresso em células acinares e ductos, mas no final da gestação e período pós-natal, é colonizado por insulina e glucagina. Uma mudança similar na expressão do receptor da PRL entre o pâncreas exócrino e endócrino é observada no feto humano.

O suporte ao papel da PRL e da PL no desenvolvimento de ilhéus provém do estudo em ratos com deficiência no receptor da PRL. O tamanho dos ilhéus pancreáticos, bem como a densidade, massa das células- β e o conteúdo de insulina estão reduzidos e ocorre diminuição da secreção de insulina induzida pela glicose. Ainda assim, estes ratos demonstram utilização normal de glicose após injeções de insulina, o que indica que a resistência periférica é normal. A redução transitória de tolerância à glicose pode ser devido a um atraso na maturação da função pancreática ou menor sensibilidade à insulina (Ben-Jonathan et al., 2008, Cejkova et al., 2009).

iii. Tecido adiposo

O tecido adiposo consiste em adipócitos que contêm lípidos, pré-adipócitos fibroblastos-*like* e células endoteliais e imunitárias. Para se tornarem células maduras, os pré-adipócitos sofrem adipogénese, o que implica paragem no ciclo celular e diferenciação terminal. A adipogénese é induzida *in vitro* pela exposição a factores adipogénicos, que tipicamente contêm componentes de cAMP activados (por exemplo, o IBMX), insulina e glicocorticóides e envolve a activação sequencial dos factores de transcrição, genes específicos do tecido adiposo e proteínas estruturais (T. Brandebourg et al., 2007, Ben-Jonathan et al., 2008).

Além do armazenamento de lípidos, o tecido adiposo é um órgão endócrino importante cujas hormonas, as adipocinas, actuam no cérebro, fígado, pâncreas e músculo para regularem o equilíbrio de energia, resistência à insulina e as respostas inflamatórias. A secreção destas células é influenciada pelo estado nutricional, sinais hormonais e gasto energético.

Baseado na crença de que o receptor de PRL não é expresso no tecido adiposo, foi inicialmente proposto que a PRL não era um regulador directo das funções dos adipócitos. Contudo, com o aparecimento de provas em contrário, este conceito teve que ser revisto. Na verdade, este receptor é expresso no tecido adiposo de ratos e de seres humanos. A expressão da isoforma longa do receptor da PRL no tecido adiposo dos ratos aumenta durante a lactação.

Estudos recentes revelam que a PRL apresenta um papel na adipogénese. Por exemplo, a expressão do receptor da PRL é induzida muitas vezes durante a diferenciação do epidídimo em ratos e nos pré-adipócitos da glândula mamária humana. O receptor da PRL, mas não o da GH é marcadamente induzido após a diferenciação de células 3T3-L1, com uma activação robusta dos factores de transcrição STAT5a e STAT 5b. A PRL regula a expressão do seu receptor em adipócitos do epidídimo e aumenta a actividade dos factores

STAT5a e STAT5b na diferenciação das células 3T3-L1. A PRL aumenta também a expressão de C/EBP β e do PPAR- β (*peroxisome proliferator-activated receptor beta*), dois factores de transcrição que desempenham um papel fundamental na adipogénese e na expressão ectópica do receptor da PRL nas células NIH-3T3, aumentando a conversão dos adipócitos quando estimulados pela PRL e ligando de PPAR- γ .

O tecido adiposo é o principal local do metabolismo lipídico. Com base no peso, a gordura contém o dobro de calorias das proteínas ou dos hidratos de carbono. Assim, o armazenamento de energia na forma de gordura é altamente eficiente.

O armazenamento de lípidos reflecte o equilíbrio dinâmico entre a formação de triglicéridos (lipogénese) e sua repartição (lipólise). Duas enzimas, a LPL, que hidrolisa os complexos de triglicéridos-lipoproteínas circulantes e a FAS, que catalisa a formação da cadeia longa dos ácidos gordos, estão principalmente envolvidas na lipogénese. A lipólise é principalmente regulada pela lipase hormona-sensível (*HSL-hormone-sensitive lipase*), que é activado por catecolaminas e inibida pela insulina.

Existem apenas informações esporádicas sobre os efeitos directos da PRL sobre o metabolismo lipídico, no tecido adiposo em condições não lactantes. Esta hormona inibe a actividade da LPL em células adiposas humanas, em cultura.

O efeito anti-lipolítico da PRL em células adiposas de epidídimo em cultura de ratos leva várias horas a ocorrer, sugerindo a regulação da transcrição, em vez da alteração dos níveis de cAMP ou fosforilação da HSL e/ou perilipina, como é o caso das catecolaminas e insulina. Mais importantes ainda, esses dados revelam que a PRL afecta as funções dos adipócitos nos machos, indicando que o seu impacto sobre a homeostase metabólica é mais ampla do que anteriormente apreciada. Os efeitos da PRL sobre a lipólise variam entre as espécies.

A PRL também altera a libertação das adipocinas, incluindo leptina, adiponectina e IL-6. A leptina regula a ingestão alimentar e o gasto energético e é a adipocina melhor estudada. No entanto, os dados sobre uma associação entre PRL e leptina estão em conflito. A PRL inibe a secreção de leptina estimulada pela insulina em adipócitos de ratos, mas potencia o efeito da insulina em cultura de adipócitos castanhos. Níveis elevados de PRL sérica aumentaram os níveis circulantes de leptina, ao passo que a incubação de PRL com células de tecido adiposo, em cultura, causou inibição dependente da dose. É difícil conciliar essas diferenças, excepto para postular efeitos directos *versus* indirectos da PRL, libertação dos efeitos da leptina dependentes do depósito ou efeitos variáveis de doses de PRL. Ainda não existe correlação consistente entre PRL sérica e os níveis de leptina em humanos.

A adiponectina é uma adipocina abundante, sensibilizadora de insulina, cujos níveis séricos são mais baixos na obesidade e há um aumento após a perda de peso. Um efeito inibidor de PRL na libertação de adiponectina é apoiado pela redução dos níveis séricos desta. Contudo, é improvável que a PRL seja o principal regulador da adiponectina em ratos, pois a deficiência de PRL ou do seu receptor não tem efeito sobre os níveis séricos desta hormona. Estudos recentes, em que foi utilizado tecido adiposo humano, demonstraram um efeito inibidor directo da PRL na secreção de adiponectina, a partir de células de tecido adiposo em cultura e adipócitos isolados (Flint et al., 2003, Brandebourg et al., 2007, Ben-Jonathan et al., 2008).

f. Função da PRL na osmorregulação

Uma das acções menos compreendidas da PRL é a regulação do transporte de solutos e água através das membranas celulares dos mamíferos. Estudos nesta área foram motivados pelo facto de em vertebrados inferiores, ter sido descoberto que a PRL estimulava o transporte

de solutos através das membranas celulares e que esta poderia ser assim, uma hormona osmorreguladora. Algumas acções da PRL nos mamíferos são mais fáceis de entender fisiologicamente do que as outras. Por exemplo, esta hormona exerce várias acções no transporte de solutos através das membranas celulares epiteliais mamárias.

Segundo as mais recentes descobertas, foi observado que a PRL diminui o transporte de sódio e aumenta o de potássio através das células epiteliais retiradas de coelhos tratados com bromocriptina. De modo semelhante, a PRL estimula os aminoácidos nas glândulas mamárias em ratos, bem como os ácidos não-metabolizados α -aminoisobutíricos dos ratos. O requerimento desse movimento do soluto, conduzido pela PRL para a lactação ainda não está muito bem esclarecido.

A PRL também afecta o transporte de água através das membranas amnióticas. Nos humanos esse transporte é inibido. A hormona em análise é responsável pelo transporte de fluidos, sódio, cloro e cálcio através das membranas celulares epiteliais. A correlação entre o cloro do suor e a concentração da PRL pode implicar esta hormona como um factor patogénico possível na fibrose quística.

Apesar de não examinado de forma sistemática, a PRL parece provavelmente, aumentar o transporte de soluto durante o último trimestre da gravidez. Pode ser um mecanismo em que a PRL contribui para a preparação da grávida para a lactação subsequente. Um argumento teleológico similar pode ser feito por observação da actuação da PRL no túbulo contornado proximal do nefrónio renal, que promove a retenção de sódio, água e potássio. É necessário discutir esta necessidade através de estudos sistemáticos do papel da PRL no transporte de fluidos e solutos no contexto fisiológico (Ben-Jonathan et al., 2008).

g. Função da PRL na angiogénese

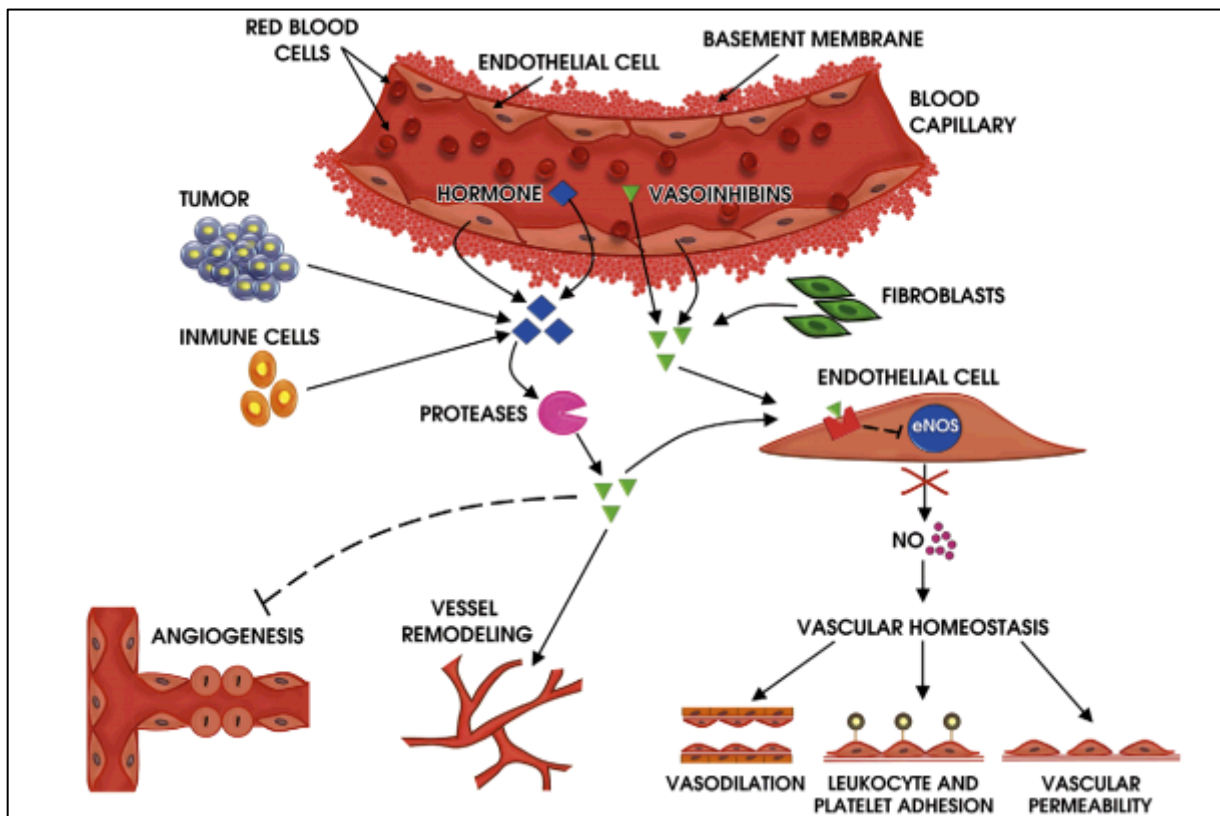
A angiogénese, isto é, a formação de novos vasos sanguíneos, é um processo essencial para tecidos em crescimento durante o desenvolvimento. Normalmente pára na idade adulta, ocorrendo a excepção nos órgãos reprodutores femininos (ovário, útero, placenta), onde a angiogénese ocorre como um processo normal ou na regeneração de tecidos lesados (Clapp et al., 2006).

É um processo dinâmico regulado pelo equilíbrio entre moléculas pro- e antiangiogénicas. A disrupção dos mecanismos de controlo contribuem para o desenvolvimento de uma variedade de doenças, como artrite reumatóide e cancro da mama e da próstata.

Passadas algumas décadas, numerosas proteínas endógenas que inibem a angiogénese foram identificadas. A maioria destas moléculas antiangiogénicas são fragmentos resultantes da clivagem por proteases dos componentes da matriz extracelular ou de proteínas circulantes que apresentam funções relacionadas com a angiogénese (Clapp et al., 2006, Clapp et al., 2008).

Como já mencionado, a PRL, GH e PL são consideradas membros da mesma família proteica, porque são estruturalmente e funcionalmente relacionadas. De facto, estas três hormonas adquirem actividade antiangiogénica após clivagem proteolítica, sugerindo mecanismos de acção comuns e funções paralelas como reguladores vasculares (Corbacho et al., 2002, Goldhar et al., 2003, Clapp et al., 2006). Além disso, os fragmentos antiangiogénicos derivados da PRL não são espécies únicas. São elementos da família de peptídeos com massas moleculares diferentes, todas contendo a região N-terminal da PRL, a que se designou colectivamente por vaso-inibinas (Vi). Com base nas semelhanças funcionais e estruturais, estende-se o nome Vi aos peptídeos antiangiogénicos que contém a região N-

terminal da GH e PL. Os fragmentos das hormonas circulantes podem ser gerados numa grande parte de tecidos, sendo que as Vi representam uma classe importante de peptídeos antiangiogénicos (Figura 7).



Adaptado de Clapp et al., (2006)

Figura 7 Fontes de vasoinibinas e suas ações nos vasos sanguíneos. As vasoinibinas podem ser produzidas extra ou intracelularmente e actuar quer no local ou por via hemática nas células endoteliais. As propriedades vasculares moduladas por vasoinibinas incluem angiogénese, remodelação dos vasos sanguíneos e processos que envolve a homeostase vascular. eNOS (*endothelial nitric oxide synthases*), NO (*nitric oxide*).

A PRL humana, como já referido, é formada por quatro α -hélices organizadas em configuração “*up-up-down-down*” e contém três pontes dissulfeto. O peptídeo antiangiogénico N-terminal da PRL é gerado por clivagem proteolítica perto ou na própria ansa longa, que conecta com a terceira e quarta α -hélices, compreendendo os resíduos 138 ao 160 da PRL. A ansa longa é móvel e solúvel, características estruturais geralmente necessárias para uma clivagem proteolítica eficaz. A proteólise da PRL humana pela capseína D produz peptídeos anti-angiogénicos 1-132 (15,0 kDa), 1-147 (16,8 kDa) e 1-50 (17,2 kDa) e metaloproteinases da matriz (MMP-*matrix metalloproteinases*), (MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9 e MMP-13) que clivam a ligação peptídica 156-157 na PRL humana, gerando a Vi 17 kDa, que pode ser novamente processada pelas MMPs e originar as Vi 16 kDa e 14 kDa.

A estrutura básica e o tamanho das Vi essenciais para a actividade antiangiogénica ainda não estão bem elucidadas. A actividade biológica das Vi é conhecida no resíduo N-terminal da PRL, uma vez que o fragmento c-terminal 16 kDa (resíduos 54-199) da hormona originado pela trombina contém propriedades antiangiogénicas (figura 7).

Todas as Vi correspondem aproximadamente a duas ou três regiões N-terminal da hormona, mas a clivagem de outras regiões protease-sensíveis podem produzir Vi biológicas activas mais pequenas. MMP-1, MMP-2, MMP-3 e MMP-9 também clivam a hormona PRL na ansa curta, que conecta com as hélices 2 e 3 e gerando fragmentos I- III. A actividade antiangiogénica destes fragmentos mais pequenos ainda não está bem estudada. O facto da clivagem proteolítica originar peptídeos antiangiogénicos sugerem que o resultado da nova conformação é mais responsável pela acção inibidora do que é a sequência de aminoácidos particular (Corbacho et al., 2002, Goldhar et al., 2005, Clapp et al., 2006).

Tal como a maioria dos factores antiangiogénicos, as Vi bloqueiam várias etapas do processo angiogénico por mecanismos que envolvem a interferência com a actividade de factores de crescimento, inibição da produção de protease e a estimulação da apoptose das células endoteliais (Figura 8).

As Vi suprimem a angiogénese *in vivo* e *in vitro* por bloquearem o factor de crescimento vascular endotelial (VEGF- *vascular endotelial growth factor*), indutor de vasodilatação, o factor de crescimento dos fibroblastos básicos (b-FGF-*basic fibroblast growth factor*) que estimula a actividade do activador do plasminogénio tipo uroquinase (uPA- *urokinase-type plasminogen activator*) e o VEGF e b-FGF que estimulam a proliferação das células endoteliais. Em adição, as Vi podem bloquear a actividade do uPA basal por induzirem a expressão do inibidor do activador do plasminogénio tipo 1 (PAI-I-*plasminogen activator inhibitor tipo I*), a acção que, provavelmente medeia a capacidade das Vi para interferir com a formação das estruturas capilares (Figura 8). As Vi podem actuar independentemente nos factores de crescimento por induzir a apoptose das células endoteliais em cultura e a apoptose dos vasos sanguíneos.

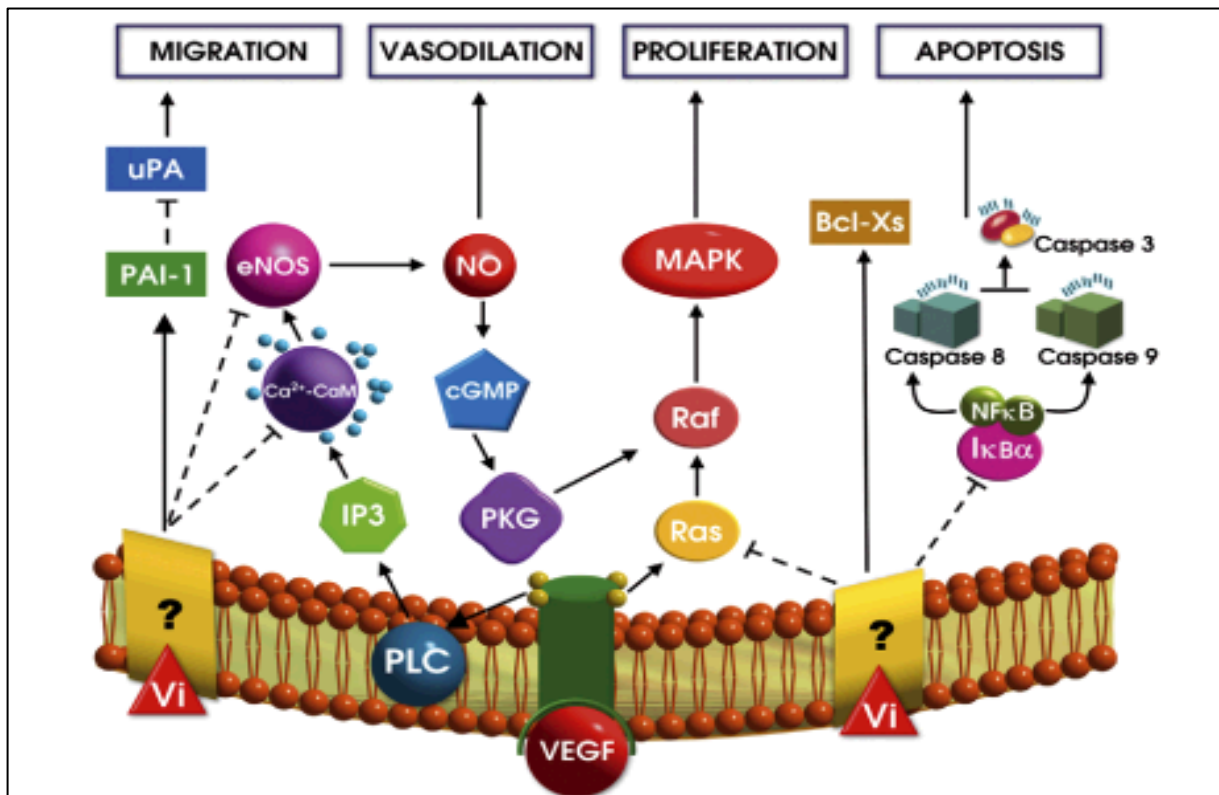
Todas as Vi exercem as suas acções através do receptor transmembranar clássico. As Vi derivadas da PRL ligam-se à classe única dos locais das membranas celulares endoteliais com 1-10 nM e algumas experiências identificaram proteínas com 52 kDa e 32 kDa como as maiores vasoinibinas da espécie. Ainda não está claro que estas proteínas são receptores para as vasoinibinas ou reguladores da ligação das proteínas, importante para as suas funções.

No contexto da proliferação celular, as Vi podem impedir as transições G0-G1 e G2-M do ciclo celular endotelial, por inibição das ciclinas D1 e B1. Isto reflecte a inibição da via MAPK, uma vez que as Vi bloqueiam o VEGF e b-FGF que induzem a activação da via, a nível do Ras. Recentemente, as Vi demonstraram que bloqueiam a actividade da sintetase do

óxido nítrico endotelial (eNOS-*endothelial nitric oxide synthases*), induzido por VEGF e do óxido nítrico exógeno (NO-*nitric oxide*), revertendo a inibição através das Vi da proliferação celular endotelial VEGF induzido. O NO contribui para o efeito mitótico do VEGF por interação com a via das MAPK, através da cascata que envolve a estimulação do NO por produção de cGMP e activação do cGMP-dependente da proteína cinase (PKG-*cGMP-dependent protein kinase*), levando à activação da Raf, por último. Além disso, as Vi podem impedir a activação das MAPK através do Ras ou através do PKG.

O bloqueio da actividade do eNOS pelas Vi inibe também a vasodilatação e podem ter outras consequências vasculares, uma vez que o NO derivado do eNOS promove a permeabilidade dos vasos sanguíneos e previne a adesão dos leucócitos e plaquetas. O mecanismo pelo qual as Vi bloqueiam a activação do eNOS é desconhecido, mas a interferência com a mobilização do cálcio intracelular é uma possibilidade, uma vez que a ligação cálcio-calmodulina é necessária para a activação do eNOS e as Vi bloqueiam a acetilcolina e a bradicinina que induzem a passagem do cálcio para as células endoteliais (Figura 8). Além disso, as Vi podem bloquear a produção de NO pelas células endoteliais através da atenuação da expressão do Nos induzível (iNOS-*inductible nitric oxide synthase*) em resposta à interleucina 1 β (Il-1 β).

Finalmente, as Vi estimulam a apoptose por activação do factor nuclear NF kB através da degradação do inibidor NFkB I κ B- α e indução consequente via caspases 8, 9 e 3, das vias intrínseca e extrínseca da apoptose. Em adição, as vaso-inibinas podem causar a conversão do Bcl-Xl na forma pro-apoptótica Bcl-Xs (Clapp et al., 2006).



Adaptado de Clapp et al., (2006)

Figura 8 Vias de transdução de sinal conhecidas por serem activadas em células endoteliais por Vi. A ligação da Vi aos seus receptores, cuja identidade e localização destes são desconhecidos, pode inibir a migração por aumentar a expressão de PAI-1 ou por apoptose estimulada pela activação Bcl-Xs e/ou NFκB. Além disso, as Vi induzem sinais que podem bloquear a estimulação do eNOS ou da via Ras-MAPK, por VEGF, resultando na inibição da vasodilatação ou proliferação, respectivamente. As acções estimuladoras estão indicadas por setas e as inibidoras por linhas a tracejado. Ca²⁺-caM (cálcio-calmodulina), cGMP (*cyclic guanosine monophosphate*), eNOS (*endothelial nitric oxide synthases*), IP3 (*inositol 1,4,5-triphosphate*), MAPK (*mitogen-activated protein kinase*), NO (*nitric oxide*), PAI-1 (*plasminogen activator inhibitor tipo I*), PKG (*cGMP-dependent protein kinase*), PLC (*phospholypase C*), uPA (*urokinase-type plasminogen activator*), Vi (vaso-inibinas), VEGF (*vascular endotelial growth factor*).

h. Função da PRL na tumorigénese humana

Os tumores resultam da perda dos mecanismos de controlo celular e são afectados por factores genéticos, dietéticos, ambientais e hormonais. As hormonas não têm a capacidade de iniciar a tumorigénese, mas podem promover o crescimento de células transformadas, através da interacção com factores de crescimento e oncogenes.

O papel dos esteróides gonadais em tumores do tecido de reprodutor encontra-se bem estabelecido, ao contrário da acção da PRL que tem sido controverso. Deste modo, o envolvimento desta hormona na tumorigénese humana tem sido nos últimos anos, largamente estudado. De facto, ocorreu um aumento de referências bibliográficas que suporta um papel significativo desta hormona na patogénese do cancro da mama e da próstata, em humanos. Análises epidemiológicas revelaram que a concentração de PRL está associada com o risco aumentado de cancro, particularmente em mulheres pós-menopausa (TwoRoger et al., 2006, Ben-Jonathan et al., 2008, Fang et al., 2010).

i. Função da PRL no cancro da mama

Como já referido anteriormente, a PRL desempenha um papel fundamental no desenvolvimento da glândula mamária. É requerida para a formação lóbulo-alveolar dos ductos mamários durante a gravidez, para a diferenciação terminal das células epiteliais mamárias e para a síntese dos componentes do leite durante a lactação. Todos estes efeitos da hormona lactogénica são mediados pela interacção com o seu receptor, induzindo a dimerização do mesmo e a activação das tirosinas-kinases citoplasmáticas. O receptor da PRL e os componentes da principal via de sinalização Jak2/STAT5a confirmam o papel crítico da hormona no crescimento/ diferenciação alveolar da glândula mamária. De facto, a PRL é um potente factor de diferenciação das células epiteliais mamárias, existindo diversas evidências

que realçam o contributo da PRL por mecanismos autócrinos/parácrinos na viabilidade das células tumorais, nos carcinomas da mama (Wennbo & Törnell, 2000, Nouhi et al., 2006, Tworoger & Hankinson, 2008, Fernandez et al., 2010). Tanto a hormona, como o seu receptor são expressos nos tumores mamários e na linhagem de células do cancro da mama, criando deste modo, condições autócrinas/parácrinas para a acção da PRL. Realmente, através da interferência na ansa autócrina/parácrina da hormona, nas células do cancro da mama, com o uso de antagonistas da PRL e do seu receptor ocorreu a inibição do crescimento celular e a indução da apoptose. Além disso, em modelos transgénicos de ratos, a PRL por mecanismo autócrino levou à formação de adenocarcinoma mamário. Em adição, a PRL demonstrou ter um papel permissivo na indução da oncogénese da mama. Em suma, todos estes factos indicam que a PRL apresenta um efeito pro-oncogénico no carcinoma da mama. Contudo, esta função da PRL não explica completamente o seu papel na carcinogénese mamária, particularmente no processo relacionado com a progressão do tumor e metástases.

O cancro é considerado uma doença com múltiplas etapas, que resulta de anomalias em processos relacionados com o crescimento e diferenciação celular. De facto, a plasticidade epitelial, uma propriedade fundamental das células epiteliais originalmente descrita durante a embriogénese, também contribui para a metastização tumoral, de vários tumores epiteliais, onde se inclui o carcinoma da mama. Durante a progressão deste tipo de tumores, as células sofrem um processo complexo de de-diferenciação designado por transformação mesênquima-epitelial (*EMT-epitelial-mesenchymal transformation*). Este processo conduz a perda da polaridade epitelial e aquisição do fenótipo mesênquimal, resultando, em último, no aumento da migração/ invasão potencial das células tumorais. A marca de EMT é a regulação pelas proteínas juncionais de adesão, como a E-caderina e o ganho de várias proteínas mesenquimatosas, como a vimentina, que leva ao aparecimento de um fenótipo

fibroblástico-invasivo. As vias de sinalização que regulam este fenótipo, nos tumores epiteliais não estão ainda muito bem caracterizadas. Contudo, estudos recentes evidenciaram a activação das vias Ras/MAPK e TGF- β /*Smad*, na indução do processo EMT *in vitro* e de metástases *in vivo*.

Em várias experiências, foi demonstrado que a PRL através da activação da via Jak2/STAT5 desempenha um papel crítico na regulação do programa morfogénico das células do cancro da mama, levando a supressão da capacidade invasiva destas células. Além disso, também foi demonstrado que a PRL regula a plasticidade epitelial, por regulação negativa das vias pro-metastáticas, MAPK e *Smad*. Em suma, estes factos apontam para a actividade dual da hormona lactogénica na carcinogénese humana, como pro-oncogénica e como factor de supressão da progressão tumoral (Tworoger & Hankinson, 2006, Ben-Jonathan et al., 2008, Fernandez et al., 2010).

ii. Função da PRL no cancro da próstata

Além do papel que a PRL apresenta na patogénese do cancro da mama, foi demonstrado em modelos de ratos transgénicos, que esta hormona tem também um papel no desenvolvimento de hiperplasia benigna da próstata. As várias características dos tumores benignos da próstata (hipertrofia dos tecidos, hiperplasia do estroma, neoplasia intra-epitelial) induzidos pela expressão local e sistémica da PRL foram muito semelhantes em todos os aspectos. Estudos experimentais demonstraram que a neoplasia intraepitelial da próstata, em homens jovens, desenvolveu-se eventualmente, tornando-se adenocarcinoma invasivo, sublinhando assim, o potencial oncogénico local da PRL.

Estes estudos demonstraram claramente o potencial de promoção de crescimento tumoral da PRL, a nível local, validando assim, o impacto patofisiológico do mecanismo autócrino/parácrino (Ben-Jonathan et al., 2008, Fernandez et al., 2010).

4. CONCLUSÕES

A PRL é uma hormona polipeptídica de 23 kDa, sintetizada e segregada principalmente pelos lactotrofos do lobo anterior da hipófise, sendo também produzida em locais extra-hipofisários como glândula mamária, decídua, miométrio, adipócitos e linfócitos T.

Com base nas suas propriedades genéticas, estruturais e biológicas, a PRL pertence à família proteica da GH e da PL. A PRL é actualmente considerada também uma citocina, classificação baseada nas suas características moleculares e funcionais (Bachelot & Binart, 2007).

O gene que codifica a proteína localiza-se, em humanos, no cromossoma 6. A sua expressão é, sobretudo, inibida pela DA e estimulada pela TRH, OT e VIP (Bachelot & Binart, 2007, Brandebourg et al., 2007).

A PRL actua através de um receptor que pertence à classe 1 da superfamília dos receptores de citocina, sendo que o gene que o codifica está localizado no cromossoma 5, em humanos. Este receptor localiza-se na superfície da célula, sendo formado por três domínios: extracelular, transmembranar e intracelular. De forma sucinta, uma molécula de PRL liga-se a duas do seu receptor provocando a dimerização do mesmo. Isso activa a Jak2 que fosforila o receptor e autofosforila-se em várias tirosinas. As tirosinas fosforiladas no complexo receptor-Jak2 formam pontos de ligação para diversas proteínas sinalizadoras, destacando-se as STATs. O receptor da PRL é expresso em diversos tecidos e órgãos, sendo principalmente notória a sua expressão no fígado, hipotálamo, glândulas mamárias e supra-renais, linfócitos e próstata. (García-Martínez et al., 2009).

A iniciação e manutenção da lactação é a acção mais comumente associada à PRL e a que se deve o seu nome. Esta hormona exerce múltiplos efeitos na glândula mamária, sendo

responsável pelo desenvolvimento da glândula, pela lactogénese, galactopoiese e pela involução ao estado não-lactante. A proliferação e diferenciação da capacidade secretora estão dependentes da presença do receptor da PRL, bem como da via de sinalização Jak2–STAT5.

No entanto, a PRL é uma hormona altamente versátil, desempenhando acções diversas na homeostasia do organismo. Apresenta um papel fundamental na função reprodutora feminina, sendo essencial para a implantação do ovo fertilizado, juntamente com os estrogénios. Além disso, é fundamental para a manutenção da gravidez e inibição da ovulação. A PRL controla também o comportamento sexual feminino e tem um papel modesto na fertilidade masculina.

A PRL pode estimular a génese, migração e diferenciação dos neurónios no cérebro de mães adultas, tendo um papel no comportamento materno. Esta hormona apresenta uma acção significativa na regulação das respostas imunitárias, celulares e humorais, fisiológicas e patológicas, como exemplo as doenças auto-imunes. Tem efeitos na regulação do peso corporal, no desenvolvimento dos ilhéus pancreáticos e controlo de insulina e no metabolismo lipídico, bem como na angiogénese e na tumorigénese humana (Freeman et al., 2000, Ben-Jonathan et al., 2008).

5. REFERÊNCIAS/ BIBLIOGRAFIA

- Bachelot, A., e Binart, N. (2007). Reproductive role of prolactin, *Reproduction*: 133, 361-369.
- Ben-Jonathan, N., LaPensee, C. R., e LaPensee, E. W. (2008). What can we learn from rodents about prolactin in humans?, *Endocrine Reviews*: 29 (1), 1-41.
- Ben-Jonathan, N., Mershon, J., Allen, D.L. e Steinmetz, R.W. (1996). Extrahypothalamic Prolactin: Distribution, Regulation, Functions, and Clinical Aspects, *Endocrine Reviews*, Vol. 17, No. 6.
- Bernichtein, S., Touraine, P., Goffin, V. (2010). New concepts in prolactin biology, *Journal of Endocrinology*, 206, 1-11.
- Brandebourg, T., Hugo, E., e Ben-Jonathan, N. (2007). Adipocyte prolactin: regulation of release and putative functions, *Diabetes, Obesity and Metabolism*: 9, 464-476.
- Cejkova, P., Fojtikova, M. e Cerna, M. (2009). Immunomodulatory role of prolactin in diabetes development, *Autoimmunity Reviews*: 9, 23-27.
- Clapp, C., Aranda, J., Gonzalez, C., Jeziorski, M., Escalera, G. (2006). Vasoinhibins: endogenous regulators of angiogenesis and vascular function, *Trends in Endocrinology and Metabolism*, Vol. 17, No. 8.
- Clapp, C., Thebault, S., Escalera, G. M., (2008). Role of Prolactin and Vasoinhibins in the Regulation of Vascular Function in Mammary Gland, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*: 13, 55-67.
- Corbacho, M., Escalera, G. M. e Clapp, C. (2002). Roles of prolactin and related members of the prolactin/ growth hormone/ placental lactogen family in angiogenesis, *Journal of Endocrinology*: 173, 219-238.

- Dominguez-Caceres M. A., Garcia-Martínez J. M., Calcabrini A. et al. (2004). Prolactin induces c-Myc expression and cell survival through activation of Src/Akt pathway in lymphoid cells, *Oncogenes*: 23, 7378-7390.
- Fang, F., Zheng, J., Galbaugh, T. L., Fiorillo, A., Hjort, E. E., Zeng, X. e Clevenger C. V. (2010). Cyclophilin B as a co-regulator of prolactin-induced gene expression and function in breast cancer cells, *J Mol Endocrinol*: 44 (6), 319-329.
- Fernandez, I., Touraine, P. e Goffin, V. (2010). Prolactin and Human Tumorigenesis, *Journal of Neuroendocrinology*: 22, 771-777.
- Freeman, M. E., Kanyicska, B., Lerant, A., e Nagy, G. (2000). Prolactin: Structure, function and regulation of secretion, *Physiological Reviews*, Vol. 80, No. 4.
- García-Martínez, J. M., Calcabrini, A., González, L., Martín-Forero, E., Agulló-Ortuño, M. T., Simon, V., Watkin, H., Anderson, S. T., Roche, S. e Martín-Pérez, J. (2009). A non-catalytic function of the Src family kinases controls prolactin-induced Jak2 signaling, *Cellular Signalling*: 22, 415-426.
- Goldhar, A. S., Vonderhaar, B. K., Trott, J. F. e Hovey, R. C. (2005). Prolactin-induced expression of vascular endothelial growth factor via Erg-1, *Molecular and Cellular Endocrinology*: 232, 9-19.
- Grattan, D.R. e Kokay, I.C. (2008). Prolactin: A Pleiotropic Neuroendocrine Hormone, *Journal of Neuroendocrinology*: 20, 752-763.
- Gregg, C. (2009). Pregnancy, prolactin and white matter regeneration, *Journal of the Neurological Sciences*: 285, 22-27.
- Horseman N. D. (2002). Prolactin receptor diversity in humans: novel isoforms suggest general principles, *Trends in Endocrinology and Metabolism*: 13, 47-48.

- Horseman, N. D. e Yu-Lee L. Y. (1994). Transcriptional regulation by the helix bundle peptide hormones: Growth hormone, Prolactin and Hematopoietic cytokines, *Endocrine Review*: 15, 627-649.
- Jabbour, H. N. e Critchley, O. D. (2001). Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy, *Reproduction*: 121, 197-205.
- Krüger, T. H. C., Haake, P., Haverkamp, J., Krämer, M., Exton, M. S., Saller, B., Leygraf, N., Hartmann, U. e Schedlowski, M. (2003). Effects of acute prolactin manipulation on sexual drive and function in males, *Journal of Endocrinology*: 179, 357-365.
- Labriola, L., Bomfim Ferreira, G., Montor, W. R., Demasi, M. A. A., Pimenta, D. C., Lojudice, F. H., Genzini, T., Goldberg, A. C., Eliaschewitz, F. G. e Sogayar, M. C. (2007). Prolactin-induced changes in protein expression in human pancreatic islets, *Molecular and Cellular Endocrinology*: 264, 16-27.
- Molitch, M. E. (2008). Drugs and prolactin, *Pituitary*: 11, 209-218.
- Montgomery, D. W. (2001). Prolactin production by immune cells, *Lupus*: 10, 665-675.
- Nouhi, Z., Chughtai, N., Hartley, S., Cocolakis, E., Lebrun, J. J. e Ali, S. (2006). Defining the Role of Prolactin as an Invasion Suppressor Hormone in Breast Cancer Cells, *Cancer Res*: 66 (3), 1824-1832.
- Tóth, B. E., Bodnár, I., Homicskó, K. G., Fülöp, F., Fekete, M. I. K., Nagy, G. M. (2002). Physiological role of salsolinol: Its hypophysiotrophic function in the regulation of pituitary prolactin secretion, *Neurotoxicology and Teratology*: 24, 655-666.
- Tworoger, S. S. e Hankinson, S. E. (2006). Prolactin and breast cancer risk, *Cancer Letters*: 243, 160-169.

- Tworoger, S. S. e Hankinson, S. E. (2008). Prolactin and Breast Cancer Etiology: An Epidemiologic Perspective, *J Mammary Gland Biol Neoplasia*: 13, 41-53.
- Walker, S. E. e Jacobson, J. D. (2000). Roles of prolactin and gonadotropin-releasing hormone in Rheumatic diseases, *Rheumatic Diseases Clinics of North America*, Vol. 24, No. 4.
- Wennbo, H. e Törnell, J. (2000). The role of prolactin and growth hormone in breast cancer, *Oncogene*: 19, 1072-1076.
- Zinger, M., McFarland, M. e Ben-Jonathan, N. (2003). Prolactin expression and secretion by human breast glandular and adipose tissue explants, *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*: 88 (2), 689-696.