



CASA ABIERTA AL TIEMPO

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y
DE LA SALUD

UNIDAD DE INVESTIGACIÓN MÉDICA EN MEDICINA
REPRODUCTIVA
HOSPITAL "LUIS CASTELAZO AYALA"
INSTITUTO MEXICANO DEL SEGURO SOCIAL

**REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE ENZÍMAS
PARTICIPANTES EN LA
ESTEROIDOGÉNESIS EN CÉLULAS DE LA
GRANULOSA**



COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

T E S I S

QUE PRESENTA

BIOL. EXP. PATRICIA GARZA OLGUÍN

PARA OBTENER EL TITULO DE
MAESTRA EN BIOLOGÍA EXPERIMENTAL

MÉXICO, D. F.

ABRIL DEL 2001

El presente trabajo de investigación se realizó en el Laboratorio de Biología Molecular y Fisiología Testicular del Departamento en Ciencias de la Salud en la Universidad Autónoma Metropolitana- Iztapalapa y en el Laboratorio de Investigación Medica en Medicina Reproductiva del Hospital “Luis Castelazo Ayala” del Instituto Mexicano del Seguro Social.

225718

Agradezco a la Coordinación de Investigación Médica del IMSS por el apoyo otorgado para la realización del presente trabajo con la Beca como Auxiliar de Investigación.

La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa cuenta con el apoyo del CONACyT, según el Convenio PFPN/66/92, por considerársele un posgrado con nivel de excelencia.

Agradezco a CONACyT el apoyo económico otorgado durante la realización de la maestría , a través de la beca con número 127811.

TUTOR DE TESIS:

M. en B.E. Joaquín F. Herrera Muñoz

Investigador Titular de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, IMSS.

Profesor Investigador Titular de M.T. en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

ASESORES DE TESIS:

Dr. Pablo Damian Matsumura

Investigador Asociado de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, IMSS.

Profesor Investigador Titular de M.T. en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

Dr. Carlos M. Timossi Baldi

Investigador Asociado de la Unidad de Investigación Médica en Medicina Reproductiva, IMSS.

Dr. Efrain Mercado Pichardo

Profesor Investigador Titular de T.C. en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa.

A MI PADRE:

MANUEL GARZA L.†, quien siempre me acompaña en mis sueños y en mi corazón y a quien le debo entre muchas cosas, el haberme enseñado que tengo que luchar por las cosas que amo. En medio de mi desesperación por su ausencia me reconforta pensar, que algún día, estaremos riendo juntos otra vez.

A MI MADRE:

MARINA OLGUÍN O., quien siempre me ha acompañado en mi camino con su gran amor y su comprensión.

A MIS HERMANOS:

ENRIQUE, ALFREDO, CARMEN, JORGE Y YADIRA, quienes siempre me han enseñado lo importante que es seguir adelante y en todo momento han permanecido a mi lado.

A MIS SOBRINOS:

ARMANDO, ADRIAN, JOSELYN, JONATHAN, ULISES, PAOLA, JORGE, DIEGO Y NUBIA, quienes cariñosamente en algún momento han compartido conmigo sus alegrías.

Agradezco a todos los integrantes de mi familia por el constante apoyo que siempre me han brindado, en especial a **ANGEL, ELENA, IRMA, RUBI Y YOLANDA**.

A **ROBERTO ROSALES R.**, a quien le agradezco su alegría, comprensión y ayuda en todas las cosas que deseo realizar, pero sobretodo, le agradezco el haber llegado a mi vida y llenarla de amor.

A mis compañeros de la maestría que han compartido una parte importante de sus vidas conmigo. Un agradecimiento especial para mis amigos: **LUIS GÓMEZ** por todo su apoyo incondicional, **LAURA CASTAÑEDA, LUCIA HERRERA, CARMEN NAVARRETE** y **TERE MATA** quienes además compartieron conmigo momentos difíciles.

Agradezco a mi tutor de tesis el **M. en B.E. Joaquín Herrera Muñoz** por el apoyo brindado durante la realización de mi trabajo y un agradecimiento muy especial a mis asesores: **Dr. Pablo Damian Matsumura, Dr. Carlos M. Timossi Baldi y Dr. Efraín mercado Pichardo**, ya que, con su orientación y apoyo se hizo posible llevar a buen termino este trabajo.

I N D I C E

Página

RESUMEN..... A

I. INTRODUCCIÓN..... 1

ANTECEDENTES
ANATOMIA DEL OVARIO
CELULAS DE LA GRANULOSA
TRANSDUCCION DE SEÑALES
VIA DEPENDIENTE DEL AMP_c
VIA INDEPENDIENTE DEL AMP_c
PAPEL DE LAS GONADOTROPINAS
INTERACCION ENTRE CELULAS
RUTA ESTEROIDOGENICA
ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA RUTA

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA..... 18

III. OBJETIVOS..... 19

IV. HIPOTESIS..... 19

V. MATERIALES Y METODOS..... 20

A. SEPARACION CELULAR
B. CULTIVOS
C. EVALUACION DEL EFECTO DE LA ADICION DE LOS DIFERENTES
FACTORES SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS
RADIOINMUNOANALISIS DE T Y E₂
RADIOINMUNOANALISIS DE AMP_c
D. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE LOS mRNAs DE CG
E. TRANSCRIPCION REVERSA (RT) SEGUIDA DE REACCION EN CADENA
DE LA POLIMERASA (PCR) (RT-PCR)
F. ANALISIS ESTADISTICO

VI. RESULTADOS..... 25

RESULTADOS PRELIMINARES
EXPLORACION DE LAS VIAS DE TRANSDUCCION DEPENDIENTES
Y NO DEPENDIENTES DE AMP_c
EXPRESION DEL RNAm DE LA AROMATASA

VII. DISCUSION..... 38

VIII. CONCLUSIONES..... 47

IX. BIBLIOGRAFIA..... 48

REGULACION DE LA EXPRESION DE ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA ESTEROIDOGENESIS EN CELULAS DE LA GRANULOSA.

R E S U M E N

Las células de la granulosa (CG) del ovario de la rata adulta son las principales productoras de estrógenos. Las CG están sujetas a diversos sistemas de señalización que pueden actuar por diferentes vías: dentro del eje hipotálamo – hipófisis – gónada, incluye las hormonas glicoproteicas LH y FSH y la hormona no glicoproteica, prolactina. La FSH es el inductor de la maduración folicular y la responsable para el desarrollo de las CG en respuesta a otras hormonas.

La FSH estimula a las CG para secretar estrógenos y progestinas, así como también varias sustancias no esteroideas. La LH estimula el crecimiento en folículos preovulatorios, induce la ovulación y regula la función del cuerpo luteo. La LH regula la síntesis de andrógenos en células de la teca (CT) y, actúa en células de la granulosa tras una inducción previa de FSH. Ambas, FSH y LH son requeridas para la síntesis de estrógenos, y la cantidad de estrógenos producidos dependen de la relativa exposición a cada gonadotropina.

La actividad enzimática responsable de la síntesis de estrógenos es llamada complejo de la aromatasa o estrógeno sintetasa (dependiente del cyt P450_{aro}), este complejo esta formado por una NADPH citocromo P450 óxido reductasa (flavoproteína) y una hemoproteína citocromo P450_{aro}. La aromatasa cataliza la conversión de los andrógenos (A y T) a los estrógenos correspondientes [estrona (E₁) y (E₂)].

Los resultados del presente trabajo tratan de esclarecer la presencia de la actividad enzimática de la P450_{aro} en CG provenientes de ratas adultas en proestro para dar lugar a la formación de estradiol. Así mismo, se muestra desde un punto de vista molecular, la expresión del RNAm de esta enzima.

De acuerdo al modelo general, la FSH y la LH activan a las proteínas cinasas A, esto es, siguen una vía dependiente de AMPc. Sin embargo, los resultados de este trabajo muestran que la vía de síntesis de T y E₂ en las CG, sugiere que múltiples vías de señalización pueden estar estimuladas.

Regulación de la Expresión de Enzimas Participantes en la Esteroidogénesis en Células de la Granulosa

I. INTRODUCCION

ANTECEDENTES

El ovario es una glándula con funciones endocrinas, las cuales se encuentran principalmente reguladas por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo juega un papel importante como centro integrador de la información que es recibida tanto de la corteza cerebral como de otros centros neuronales. Es ahí donde se regula la actividad de las neuronas peptidérgicas encargadas de la síntesis y secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), neurohormona que es transportada por el sistema porta hipotálamo-hipofisiario hasta la hipófisis, donde se une a receptores de membrana de alta afinidad en la superficie celular de los gonadotropos. Los cuales a su vez son los encargados de sintetizar y secretar las gonadotropinas que viajan por la circulación general hasta encontrar las gónadas, su órgano blanco¹. Las gonadotropinas liberadas a la circulación periférica modulan la actividad de sus células blanco a través de su interacción con receptores membranales específicos acoplados al sistema de la adenilato ciclasa¹. Así, las gonadotropinas unidas a sus receptores incrementan dicha actividad enzimática y, por lo tanto, la concentración intracelular del 3'5'-adenosínmonofosfato cíclico (AMPc), que actúa como segundo mensajero, desencadenando cambios en los patrones de fosforilación proteica y, por tanto, se modifican las funciones particulares de cada tipo celular. La hormona estimulante de los folículos (FSH) induce la maduración y crecimiento folicular, así como también promueve la biosíntesis de estrógenos y progesterona, en tanto que la hormona luteinizante (LH) estimula la secreción de andrógenos e induce la luteinización de los folículos ovulatorios. El ovario responde endócrinamente al estímulo de las gonadotropinas, principalmente secretando estradiol (E₂) y progesterona, así como la síntesis de diferentes péptidos como la inhibina,

activina, follistatina, etc.; productos que a su vez, regulan la secreción de gonadotropinas actuando a través de asas largas de retroalimentación negativa, así por ejemplo, el E₂ puede regular a nivel hipotalámico la liberación de GnRH y a nivel hipofisiario la secreción de las gonadotropinas, en tanto que la activina solo actúa a nivel de la hipófisis estimulando la liberación de FSH para dar lugar al proceso de ovulación², figura 1.

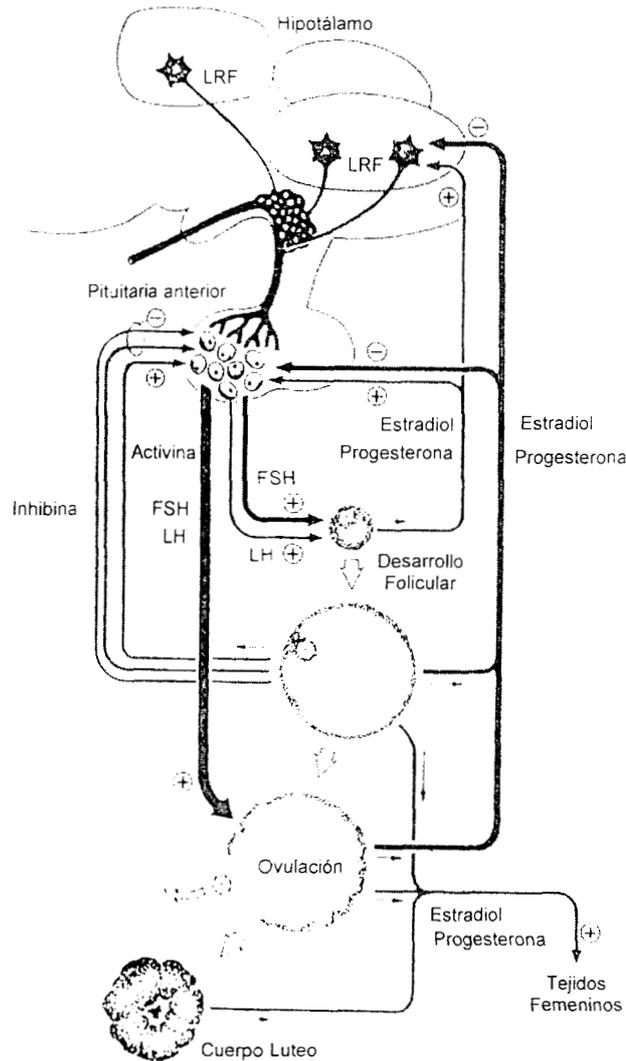


Figura1. Se muestran las interacciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la regulación de una respuesta final e intermedia de los diferentes órganos blanco y, a su vez, estos órganos blancos regulan positiva o negativamente la actividad sobre la función y secreción de la hipófisis. (Reproducido de SY Ying, Inhibins, activins, and follistatins: gonadal proteins the secretion of follicle-stimulating hormone, *Endocr Rev* 9,267-293, 1988)

ANATOMIA DEL OVARIO

El ovario anatómicamente consiste de tres regiones: una corteza externa que contiene al llamado epitelio germinal e incluye a los folículos, una médula central que consiste en el estroma de tejido conectivo laxo y fibroso y un *hilum* que se encuentra alrededor de la zona de unión del ovario al mesovario, como se muestra en la figura 2.

En general se puede decir que funcionalmente, el ovario consta de dos compartimentos separados, uno intersticial y uno folicular. El intersticial, son células que se encuentran entre los folículos y que secretan esteroides (principalmente andrógenos), mientras que en el folicular, la estructura de los propios folículos contiene células que contribuyen a la formación de estrógenos además de producir y liberar las células sexuales¹.

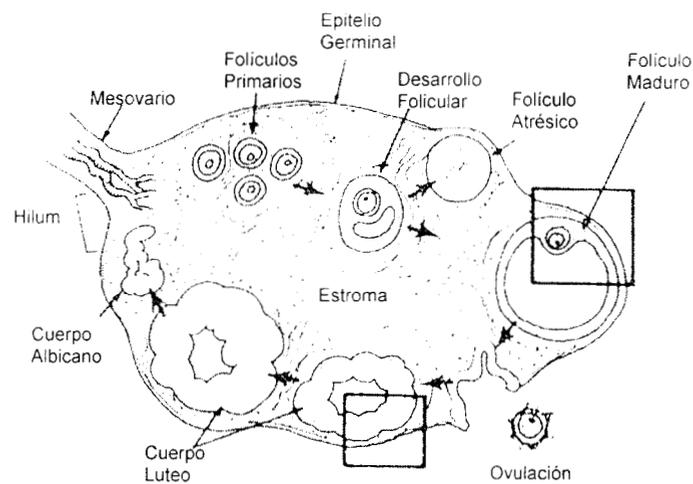


Figura 2. Esquema anatómico general de un ovario donde se muestran los diferentes estados de crecimiento y diferenciación de los folículos. (Reproducido de Wilson JD, Foster DW. Williams textbook of endocrinology 8th edition, W.B. Saunders, 1992).

Los folículos se encuentran embebidos en el tejido conectivo del estroma ovárico y pueden ser subdivididos a partir de los primordiales en alguno de dos tipos funcionales: los de no crecimiento y los de crecimiento. La mayoría de los folículos (90 al 95%) son de no crecimiento o primordiales toda la vida reproductiva, mientras que los que presentan crecimiento están divididos en cinco estados: primarios; secundarios; terciarios, de Graaf y atrésicos, como se muestra en la Figura 3.

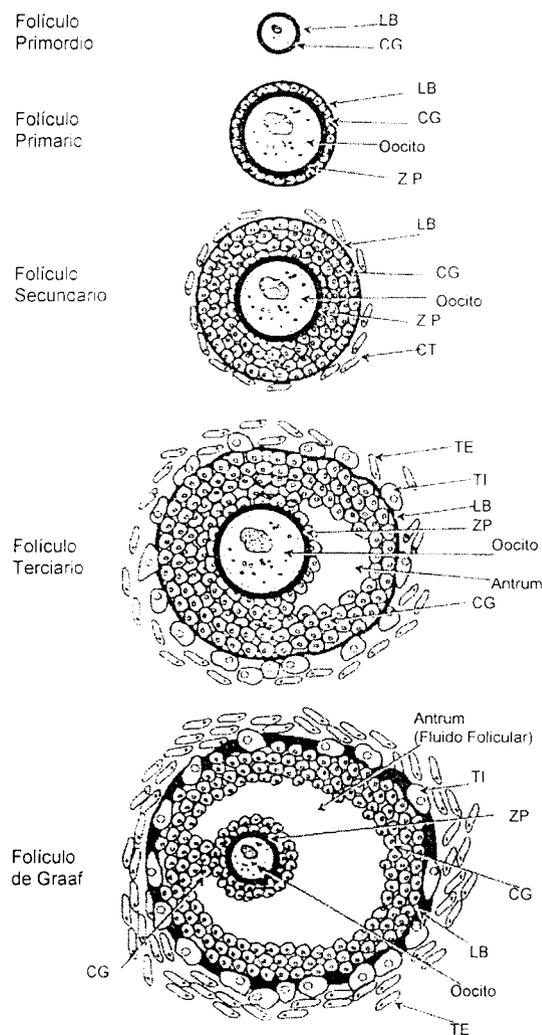


Figura 3. Estructura y clasificación de los folículos ováricos durante su crecimiento y desarrollo. LB (Lámina Basal), CG (Células de la Granulosa), ZP (Zona Pelúcida), CT (Células de la Teca), TE (Teca Externa), TI (Teca Interna). (Reproducido de Erickson GF, Magoffin DA. The ovarian androgen producing cells: a review of structure/function relationships, *Endocr Rev* 6, 371-379, 1985).

CELULAS DE LA GRANULOSA

En sentido radial el folículo en desarrollo consiste de tres capas tisulares bien definidas: a) la exterior a la lámina basal, llamadas células de la teca (CT), que consiste en capas de células altamente vascularizadas que producen andrógenos; b) el compartimento medio, situado bajo una lámina basal, el cual consiste de muchas capas de células pobremente vascularizadas, llamadas células de la granulosa (CG), que van desde el aspecto epitelióide al inicio del crecimiento folicular hasta un aspecto redondeado y altamente granuloso por la presencia de las inclusiones celulares, y que es característico de los folículos maduros o de Graaf; y c) el compartimento interno, que consiste en el complejo oocito-células cúmulo de aspecto semejante a las CG pero que, por medio de complejos de unión intercelular, no pierden la relación estructural entre ellas ni con la zona pelúcida del ovocito³.

Las CG están sujetas a diversos sistemas de señalización que pueden actuar por diferentes vías: dentro del eje hipotálamo – hipófisis – gónada incluye las hormonas glicoproteicas LH y FSH y la hormona no glicoproteica prolactina. Estas hormonas interactúan con el ovario por medio de una regulación endócrina. Fuera del eje endócrino se incluyen interacciones parácrinas y neuronales.

Las CG se encuentran comunicadas entre sí mediante uniones comunicantes (gap), las cuales resultan muy importantes para la sincronización de su funcionamiento por medio de intercambios metabólicos y para el transporte de pequeñas moléculas como el AMPc⁴.

El proceso de diferenciación de las CG es llevado a cabo bajo la influencia de múltiples señales autócrinas, parácrinas y endócrinas. Las CG vía sus receptores hormonales, adquieren la habilidad para interactuar de manera específica y sincronizada con las señales hormonales involucradas en el proceso de diferenciación. Dentro del complejo folicular la FSH se une a las CG, esto

ocurre desde que es un folículo primario⁴. Algunos estudios han demostrado que la FSH incrementa el contenido de su propio receptor⁵, sin embargo una exposición continua *in vitro* da como resultado una regulación a la baja y se disminuye la respuesta a FSH. El E₂ no tiene efecto en la distribución, número o afinidad de sitios de unión de FSH en las CG, pero el sinergismo E₂ y FSH incrementa el número de receptores de FSH⁵.

El receptor de LH se expresa en las CG siempre que exista una inducción previa de FSH, los receptores a LH en CG sólo se encuentran en folículos preovulatorios. Los receptores de LH en CG requieren la continua presencia de FSH para su mantenimiento, aunque también pueden ser mantenidos con prolactina⁵.

La FSH estimula la aparición de receptores para prolactina ya que la prolactina se incrementa en folículos preantrales y cuerpo lúteo, y es dependiente de AMPc. Existe una alta afinidad pero una baja capacidad de sitios de unión del receptor del factor de crecimiento epidermal (EGF) en CG, se ha demostrado que tratamientos exógenos de FSH y LH incrementan el contenido de receptores a EGF en CG de rata⁵.

Las CG secretan inhibina. Se especula que ésta regula los niveles de FSH y la misma inhibina es controlada por FSH pituitaria. Otros productos secretados por las CG son, el activador de plasminógeno, las prostaglandinas, las cuales están involucradas en la maduración folicular y el proceso de ovulación, proteoglicanos y relaxina, la mayoría de estos productos están regulados por la FSH⁵ y todos poseen un papel importante en la maduración del folículo.

TRANSDUCCION DE SEÑALES

En los últimos años se han realizado avances importantes en la comprensión de la comunicación celular, pero aún falta por definir con mucho más precisión las bases moleculares de la comunicación química. Entre los sistemas de transducción que se conocen en la actualidad, se destacan tres: el de la adenilato ciclasa, el de la GMPc fosfodiesterasa y el sistema del trifosfato de inositol-Calcio (IP_3-Ca^{2+}). En todos estos casos debe existir un receptor de membrana que está relacionado funcionalmente con el sistema transductor por un sistema de varias proteínas membranales capaces de unir nucleótidos de guanina (difosfato y trifosfato de guanina, GDP y GTP respectivamente)⁶.

Las moléculas de señalización, como las hormonas proteicas, se unen a proteínas receptoras específicas existentes en la superficie de la membrana externa de las células blanco. Estos receptores, se unen al ligando externo con gran afinidad y transforman este evento en una señal intracelular que modifica las funciones celulares⁶.

Cuando una molécula de señalización se une a su receptor, le modifica su estructura conformacional y estos cambios conducen a la formación de una señal intramembranal que finalmente activa o inhibe una enzima ligada a la membrana, por ejemplo, la adenilato ciclasa, la cual cataliza la síntesis del segundo mensajero AMPc y éste a su vez desencadena una serie de eventos de activación e inactivación enzimática. Otros receptores de la superficie celular, al unirse a su ligando específico; pueden abrir o cerrar directamente canales iónicos, lo cual genera una señal que provoca un flujo reducido y transitorio de iones, que altera poco en magnitud y brevemente el voltaje a través de la membrana o bien una señal mediante un importante flujo de iones desde o hacia el citosol⁷.

Los receptores de membrana activados estimulan indirectamente la adenilato ciclasa, ya que, como se había mencionado, están acoplados a través

de otro tipo de proteínas de membrana que unen nucleótidos de guanosina como GTP, las llamadas proteínas G. Cada proteína G está formada por tres subunidades, denominadas α , β y γ . La subunidad α tiene la capacidad de unirse a GTP y, a la vez, actúa como una enzima rompiéndolo, poco después de unirse a él. Las subunidades β y γ no se encuentran libres sino que forman un complejo. Este tiene una función relevante en la transducción de información en las células y va a servir en el reconocimiento al complejo hormona-receptor. La activación de las proteínas G por los receptores debe persistir únicamente mientras se halla presente el ligando para que las células sean capaces de responder a los cambios hormonales externos⁷. Cuando se utilizan análogos de GTP en los que el fosfato terminal no pueda ser hidrolizado, la actividad de la adenilato ciclasa se incrementa y prolonga notablemente. La síntesis de AMPc se encuentra bajo un control dual de proteínas G, las estimuladoras (Gs) y las inhibitorias (Gi), que a su vez son controladas por estímulos extracelulares diversos, que serían en última instancia, conjuntamente responsables a nivel gonadal de la estimulación de las funciones celulares⁸, el esquema se muestra en la figura 4.

Los fenómenos intramembranales han sido estudiados minuciosamente con el uso de sustancias tales como la toxina de cólera (TC) que inhibe la capacidad de la subunidad α de las proteínas G estimuladoras para hidrolizar el GTP, por lo que la subunidad permanece en forma activa formando grandes cantidades del AMPc⁹. De manera análoga la toxina de pertusis (TP) actúa a nivel de las proteínas G inhibitorias manteniendo al sistema permanentemente inhibido. Otra de estas sustancias es la forskolina, la cual estimula directamente a la adenilato ciclasa y el dibutilil AMPc, el cual se utiliza como análogo del AMPc, empleando estas sustancias se puede explorar el mecanismo de acción más allá de la formación del complejo hormona-receptor y de la activación de proteínas G¹⁰.

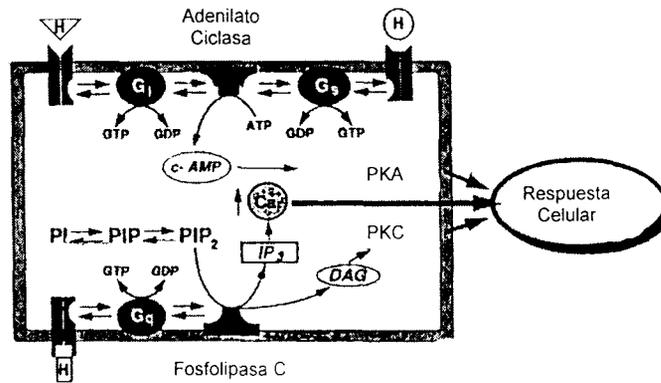


Figura 4. Vías de transducción de señales. Activación de proteína cinasa A (PKA) y proteína cinasa C (PKC) para dar lugar a una respuesta celular, con la anterior activación de diferentes segundos mensajeros. Los receptores, se unen al ligando externo con gran afinidad y transforman este evento en una señal intracelular que modifica las funciones celulares.

VIA DEPENDIENTE DEL AMP_c

El AMP_c se produce a partir del trifosfato de adenosina (ATP), por la acción de adenilato ciclasa, el AMP_c es considerado el más importante de los segundos mensajeros intracelulares en todos los eucariotes. Muchos de los efectos bioquímicos y fisiológicos son mediados a través de proteínas cinasas dependientes de AMP_c; además este puede directamente modular la activación de algunos canales iónicos. El calcio intracelular también modula la actividad de la adenilato ciclasa en diversos tejidos y son precisamente las adenilato ciclasas sensibles a calcio las que proveen del mecanismo llamado "cross-talk" o entrecruzamiento de vías entre los sistemas de transducción del calcio y el del AMP_c¹¹.

La gran mayoría de los efectos funcionales de este segundo mensajero no se deben a si mismo, sino a la activación de una enzima que fosforila proteínas (cinasa) y que es estimulada por el nucleótido cíclico, por lo que se le denomina proteína cinasa A (PKA). Esta enzima transfiere grupos fosfato del ATP a ciertos

aminoácidos (serina o treonina) de determinadas proteínas. La unión del grupo fosfato regula a su vez la función de las proteínas blanco, las cuales pueden ser canales iónicos, enzimas, proteínas reguladoras de la expresión de genes y otras. En su estado inactivo, la PKA es un complejo de cuatro proteínas, dos de ellas con actividad enzimática y dos reguladoras. Las subunidades reguladoras presentan cada una dos sitios de unión para el AMPc y el cambio conformacional ocasionado por la unión del nucleótido origina la disociación de las subunidades reguladoras del complejo, permitiendo así la expresión de la actividad enzimática¹². Algunos canales iónicos son regulados mediante fosforilación por PKA pero también pueden ser regulados por AMPc directamente modificando la entrada y salida de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} . La PKA puede entrar al núcleo celular donde fosforila a una proteína nuclear denominada CREB, estimulando así la expresión de un número importante de genes y originando la síntesis de enzimas, canales iónicos, así como de otros factores de transcripción que a su vez activan a otros genes¹³.

VIA INDEPENDIENTE DEL AMPc

Gran cantidad de hormonas activan a receptores acoplados a la fosfolipasa C (PLC), responsable de la hidrólisis de fosfoinosítidos y la formación de dos segundos mensajeros, el 1,4,5-trifosfato de inositol (IP_3) y el diacilglicerol (DAG)¹⁴. El mecanismo principal por el cual los complejos agonistas-receptor activan a la PLC implica también la participación de proteínas G. El sustrato principal de la PLC, el 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP_2), es un fosfolípido de membrana cuya hidrólisis genera una molécula hidrosoluble, el IP_3 y un compuesto hidrofóbico, el DAG. El IP_3 difunde al espacio citoplásmico y al unirse a receptores específicos localizados en depósitos intracelulares de Ca^{2+} promueve la liberación de estos iones. Por su parte, el DAG activa a otra enzima, la proteína cinasa C (PKC), estas proteínas son dependientes de Ca^{2+} , fosfolípidos y diacilglicerol. En la membrana celular el DAG activa a la PKC y entre los efectos de la PKC está la

regulación de la liberación de neurotransmisores, de la apertura de canales iónicos, de la activación de receptores y de la actividad de ciertas enzimas del metabolismo celular¹⁵.

El papel del AMPc en la biosíntesis de esteroides es claramente aceptado, sin embargo existen evidencias que indican que sumado al efecto del AMPc, se encuentran cambios en las concentraciones de calcio, que son resultado de alteraciones en el metabolismo de los fosfatos de inositol¹⁶.

PAPEL DE LAS GONADOTROPINAS

El inicio del desarrollo folicular es aparentemente independiente de las gonadotropinas, por lo que se presenta la proliferación de las CG y el crecimiento del ovocito y no es sino hasta la estructuración de un folículo terciario en donde se demuestra claramente la participación de las gonadotropinas⁵.

La FSH es el inductor de la maduración folicular y la responsable para el desarrollo de las CG en respuesta a otras hormonas. La FSH estimula a las CG para secretar estrógenos y progestinas, así como también varias sustancias no esteroideas.

Dentro del complejo folicular, la FSH se une a las CG y vía proteínas Gs se estimula la producción de AMPc que activa a proteínas cinasas, las cuales fosforilan proteínas clave para su diferenciación celular. Toda esta cascada de señalización produce la estimulación de las CG para secretar estrógenos¹⁷.

La LH estimula el crecimiento en folículos preovulatorios, induce la ovulación y regula la función del cuerpo luteo. La LH regula la síntesis de andrógenos en las células de la teca, actúa en las células de la granulosa pero tras una inducción previa de FSH. Una vez que la FSH actúa en las CG, se

aumenta el número de receptores en éstas tanto para ella misma, como para otros mensajeros y se vuelven capaces de responder a LH. Flores y colaboradores¹⁸ sugieren la posibilidad de que la LH puede estimular la formación de segundos mensajeros por dos vías que aparentemente son independientes, uno es a través de la activación de la adenilato ciclasa y la otra es la de la hidrólisis de los inositoles fosfato (IP). Se ha demostrado que las CG tratadas con gonadotropinas incrementan la incorporación de $^{32}\text{PO}_4$ y ^3H inositol dentro de los fosfoinosítidos¹⁹, así mismo la gonadotropina es capaz de incrementar la acumulación de los inositoles fosfato.

Estudios realizados en rata indican que en las CG, la LH estimula la acumulación de los inositoles fosfato y aparentemente los niveles de IP_3 son más sensibles a la estimulación con LH (concentraciones de $0.01 \mu\text{g}$). Estos hallazgos sugieren que el IP_3 puede ser un segundo mensajero en las CG actuando en la movilización de Ca^{2+} además sugiere que el calcio está involucrado en la esteroidogénesis en las CG.

Es generalmente aceptado que el IP_3 es el resultado fisiológico de la hidrólisis de fosfatidilinositoles²⁰. En el ovario, los relativamente altos niveles de IP radiomarcados después de la estimulación con LH, sugieren dos posibilidades: 1) Que la acumulación de IP puede ser un reflejo de la acumulación de IP_2 e indirectamente del IP_3 ó 2) Que la generación de IP puede ser un indicador de la generación de DAG con la concomitante producción de IP_3 . Se puede argumentar que la estimulación del metabolismo de los fosfoinositoles por parte de la LH, puede resultar en la generación de dos segundos mensajeros (DAG y IP_3) que pueden variar cuantitativamente y temporalmente²⁰.

Además se ha demostrado que el IP_3 es fosforilado por una cinasa para formar inositol 1,3,4,5-tetrakisfosfato (IP_4), el cual se ha involucrado en la entrada de calcio a la célula²⁰. El incremento del calcio citosólico es un factor de

acoplamiento muy importante que activa múltiples enzimas y proteínas cinasas en forma directa o a través del complejo calcio-calmodulina¹⁹.

INTERACCION ENTRE CELULAS

Como ha sido descrito, las gonadotropinas son indispensables para la función reproductiva en todos los vertebrados, estas son secretadas por la hipófisis bajo el control de la GnRH. La LH actúa sobre las células de la granulosa de los folículos preovulatorios para desencadenar la ovulación y posteriormente activar la producción de progesterona y por otra parte en las células del estroma ovárico para formar las tecas que rodean al folículo y promover la síntesis de andrógenos así como su transformación a estrógenos en las células de la granulosa.

Ambas, FSH y LH son requeridas para la síntesis de estrógenos, y la cantidad de estrógenos producidos dependen de la relativa exposición a cada gonadotropina, una vez que la dosis efectiva mínima de gonadotropina ha sido alcanzada.

Con lo anterior podemos decir que la FSH y el Estradiol producen un incremento en el número de receptores para LH en las células de la granulosa. La LH actúa en CG vía esos receptores para aumentar la secreción de progesterona, la cual incrementa la liberación de FSH. Estas observaciones enfatizan los papeles importantes de acciones parácrinas y autócrinas de los esteroides.

De acuerdo al modelo dos células - dos gonadotropinas²¹, la LH estimula la biosíntesis de andrógenos a partir del colesterol en el compartimento de la teca interna, los andrógenos difunden por la lámina basal y son convertidos a estrógenos por las CG. Sin embargo, las CG secretan progesterona en respuesta

a gonadotropinas y es posible que la progesterona de la CG pueda difundir hacia las células de la teca para servir como un sustrato para la biosíntesis de andrógenos.

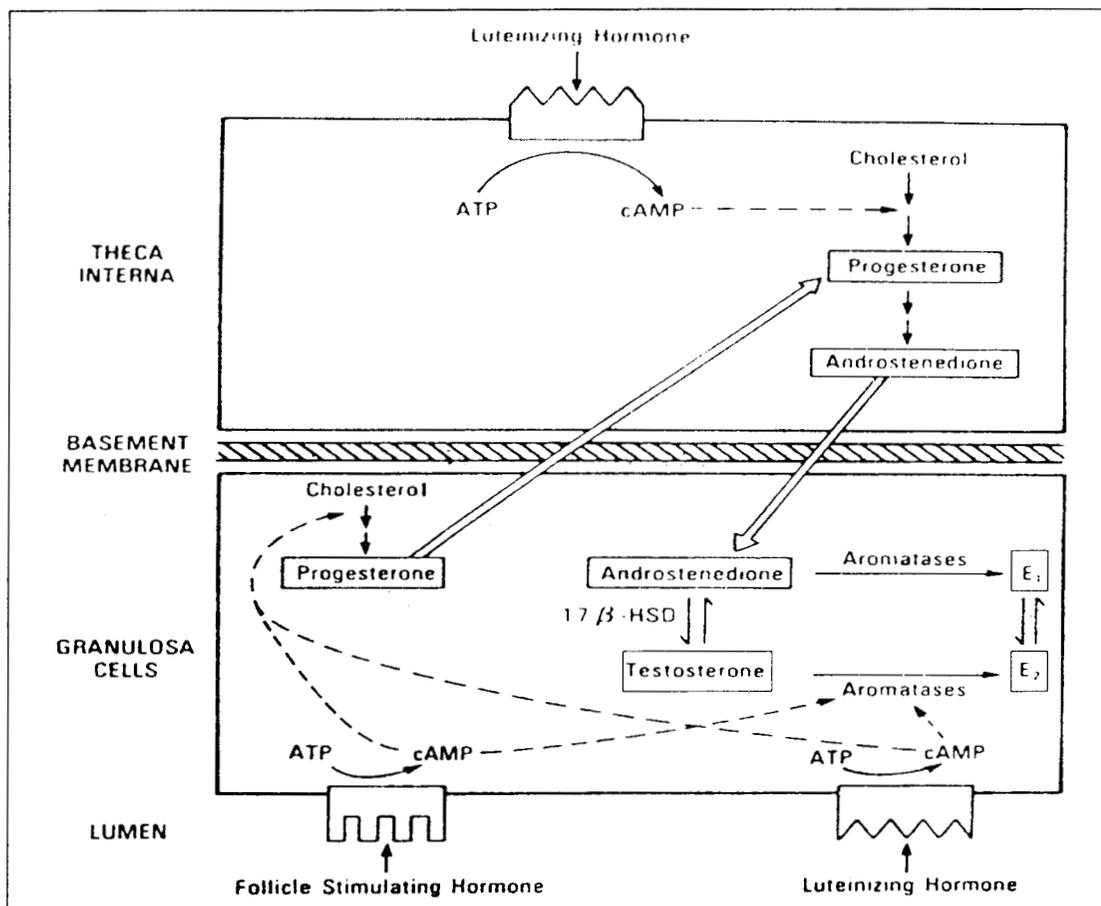


Figura 5. Representación del diagrama dos células – dos gonadotropinas. (Reproducido de Hsueh J W. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5: 76-127, 1984).

El mecanismo por el cuál las hormonas esteroideas regulan la síntesis de gonadotropinas es complejo, es necesario un aumento en los estrógenos antes de la secreción preovulatoria de la LH, junto con un incremento en la secreción de GnRH.

RUTA ESTEROIDOGENICA

Todos los esteroides del ovario son derivados del colesterol y este puede ser obtenido a partir de tres fuentes: por colesterol preformado circulando en la sangre incluido en las lipoproteínas de baja densidad (LDL); por colesterol sintetizado de *novo* dentro del ovario desde dos unidades de carbono (acetilCoA) y colesterol liberado desde ésteres de colesterol almacenados dentro de gotas de lípidos. En el ovario humano, por ejemplo, el colesterol derivado de las LDL son la principal fuente de colesterol utilizado para la esteroidogénesis.

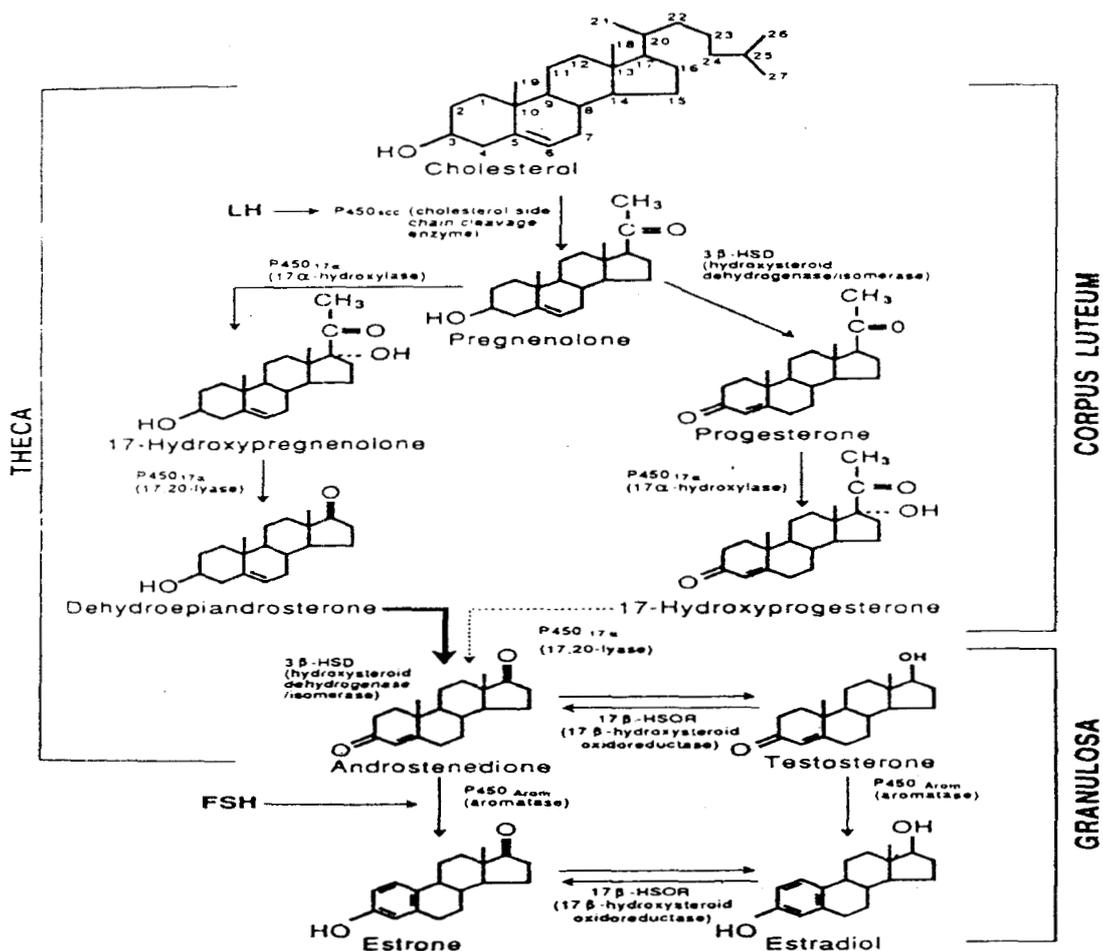


Figura 6. Ruta para la formación de estrógenos a partir del colesterol y con la participación de las CG y células de la teca. (Reproducido de Hsueh J W. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* 5: 76-127, 1984).

No solamente las CG son las productoras de esteroides, sino también las células de la teca y en su momento, el cuerpo lúteo. Los factores que determinan cuales esteroides son secretados por tipo celular incluye: los niveles de gonadotropinas y de sus receptores; la expresión de enzimas esteroidogénicas y la disponibilidad de colesterol.

ENZIMAS PARTICIPANTES EN LA RUTA

En el compartimiento folicular, las CG son capaces de sintetizar andrógenos *de novo* a partir del colesterol (Col), el cual es transformado en el interior de la mitocondria por la enzima llamada C20,22 desmolasa, dependiente del citocromo P450 (Cyt P450_{scc}), para dar origen a la pregnenolona (Preg), la cual a su vez será transformada hasta progesterona (P) mediante la acción de un conjunto de enzimas llamadas 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y la Δ 4 o Δ 5 isomerasa²².

La principal ruta de rompimiento de progesterona está mediada por la 20 α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual convierte de manera reversible la progesterona a sus metabolitos inactivos (20 α -OH-P). Otra enzima encargada de la transformación de androstendiona (A) a testosterona es la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, la cual se encuentra en gran cantidad dentro de las CG.

La capacidad esteroidogénica de la gónada no se encuentra restringida a la producción de andrógenos, ya que la secreción de estrógenos es una función bien reconocida en el ovario de los mamíferos, y la importancia de este proceso ha sido estudiada ampliamente, sugiriéndose que pudiera tener tanto efectos locales a nivel de los folículos relacionados con el control de la gametogénesis, como una actividad mitogénica para las CG²³.

La actividad enzimática responsable de la síntesis de estrógenos es llamada complejo de la aromatasa o estrógeno sintetasa (dependiente del cyt

P450_{aro}), este complejo está formado por una NADPH citocromo P450 óxido reductasa (flavoproteína) y una hemoproteína citocromo P450_{aro}, el complejo enzimático se encuentra localizado dentro de la membrana del retículo endoplásmico liso orientado hacia el lado citosólico.

La aromatasa cataliza la conversión de los andrógenos (A y T) a los estrógenos correspondientes [estrón (E₁) y (E₂)], a través de una hidroxilación en el grupo metilo del C19, una segunda oxidación en el mismo carbono para formar un aldehído y una tercera en el C2, las cuales resultan en la pérdida del C19 y la consecuente aromatización del anillo A, característica de los estrógenos²⁴. Los electrones requeridos para estas reacciones son provistas por la NADPH a través de la flavoproteína que forma el complejo enzimático.

El interés de este trabajo está orientado hacia el estudio del efecto de los diferentes sistemas de transducción de señal (dependientes o independientes del AMPc) sobre la expresión y actividad de aromatasa en las CG, así como a la determinación de su mecanismo de acción (transcripcional y/o post-traducciona), con el objetivo de evaluar la participación del estímulo hormonal en la expresión de las enzimas de la esteroidogénesis.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las células de la granulosa pueden sintetizar estradiol a partir de testosterona y estrona a partir de androstendiona, actividad de aromatización mediada por la acción de la FSH. A su vez, la FSH incrementa el número de receptores para LH en las CG, promoviendo la síntesis de progesterona². Por lo tanto podría suponerse que, en un momento determinado, las CG pueden llevar a cabo toda la vía esteroidogénica con la participación de todas sus enzimas. La pregunta sería ¿Qué ocurre con la expresión de las enzimas de la esteroidogénesis en presencia de FSH y/o LH?. Se determinará desde un punto de vista bioquímico si hay actividad enzimática formando testosterona y estradiol y desde un punto de vista molecular si se expresan RNA mensajeros y si éstos se traducen en moléculas proteicas correspondientes que se activan.

A partir de lo anterior resulta importante estudiar el efecto de la FSH y de la LH en forma aislada y de otros factores a través de los diferentes sistemas de transducción membranal sobre la expresión y actividad de la aromatasa presente en las CG y así poder evaluar la participación de un estímulo hormonal en la expresión de estas enzimas y tratar de determinar su mecanismo de acción.

III. OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL: Estudiar los factores que regulan la expresión de la aromatasa en CG *in vitro*, así como determinar sus posibles mecanismos de acción.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1. Determinar el efecto del sistema transductor dependiente del AMPc sobre la actividad de las enzimas de la vía que sintetizan T y E₂ en CG
2. Determinar el efecto de los sistemas transductores no dependientes del AMPc sobre la actividad de las enzimas de la vía que sintetizan T y E₂ en CG.
3. Determinar el efecto de los diferentes sistemas transductores sobre la expresión de mRNAs de la enzima aromatasa en CG.
4. Establecer los posibles mecanismos de regulación de la expresión de la enzima aromatasa de la vía esteroidogénica en las CG.

IV. HIPÓTESIS.

La expresión y la actividad de la aromatasa de la vía esteroidogénica presentes en las CG provenientes de folículos preovulatorios puede ser regulada por factores presentes en el medio, a través de mecanismos de transducción dependientes de AMPc.

V. MATERIALES Y METODOS

Las células de la granulosa fueron obtenidas de los ovarios de ratas Wistar adultas (>90 días de edad) provistas por el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. Estas fueron sacrificadas en el día del proestro, el cual fue determinado mediante frotis vaginal.

A. Separación celular.

El método de separación celular se basó en lo reportado por Erickson y colaboradores²⁵, en donde para obtener las CG se realizó la punción y aspiración de los folículos con una jeringa 27G X 13 mm, posteriormente se centrifugó el contenido folicular a 250 x g por 10 minutos a 20 °C. Se descartó el sobrenadante y la pastilla celular fue utilizada. A las células se les realizó una prueba de viabilidad con azul tripan y se contaron en una cámara de Neubauer.

B. Cultivos

Las células de la granulosa aisladas fueron incubadas en placas (Nunclon, Roskilde, Denmark) de 24 pozos conteniendo 7.5×10^5 células en 500 μ L de medio McCoy's 5a (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado con 400 μ L de peniestreptomina (Gibco), L-glutamina (20 mM) (Gibco), insulina 1000 U/ μ L (Laboratorios Lilly, México). A los medios utilizados para la exploración de la vía dependiente de AMPc se les adicionó 0.25 mM de Metilisobutilxantina (MIX), (Sigma, St. Louis, MO, USA) con la finalidad de tener un efecto exclusivamente por AMPc. Las preparaciones celulares fueron mantenidas en incubación hasta 6

horas a una temperatura de 37° C y una atmósfera aire: CO₂ (95:5), en presencia o ausencia de diferentes factores de estimulación y/o reactivos experimentales.

225718

C. Evaluación del efecto de la adición de los diferentes factores sobre la esteroidogénesis de CG.

Las CG se cultivaron en presencia o ausencia de las siguientes sustancias:

SUBSTANCIA	ABREVIATURA	VIA AMPc	CONCENTRACION
Toxina de colera	TC	✓	100 ng/mL
Toxina de pertusis	TP	✓	25 ng/mL
Forskolina	FK	✓	50 ng/mL
Dibutiril AMPc	DB	✓	1 mM
Factor de crecimiento epidermal	EGF	✓	50 ng/mL
Meristato de forbol	EP	×	10 mg/mL
A23187	IONO	×	10 mM

(todos los productos fueron obtenidos de Sigma), durante periodos de 6 horas en las condiciones anteriormente mencionadas. Los medios de cada cultivo se recuperaron para determinar el efecto de la estimulación sobre la producción de T y E₂. Las gonadotropinas, hCG y FSH fueron donadas por la Unidad de Investigación Medica en Medicina Reproductiva Hospital "Luis Castelazo Ayala", IMSS y utilizadas en concentraciones de 200 pg/100 µL, 10 ng/50 µL respectivamente.

Radioinmunoanálisis de T y E₂.

Los medios de cultivo se recuperaron después de las 6 hr de incubación por centrifugación. Las concentraciones de ambos esteroides, estradiol (E₂) y testosterona (T) presentes en los medios de cultivo fueron determinadas en alícuotas de 200-500 µL, mediante radioinmunoanálisis (RIA) específicos²⁶.

Se preparó una solución ensayo con ³H-T (marcada) ó ³H-E₂ (marcada) de actividad específica conocida para que al final tuviera 5,000 cpm / 500 µL en DME y suero antiT (19 hemisuccinato de T) o anti E₂ (18 hemisuccinato de E₂) en diluciones finales 1:10,000 y 1:12,500 respectivamente²⁷.

A cada tubo se adicionaron 100 µL de la solución de ensayo con el anticuerpo y la T marcada. Así mismo, pero de manera independiente se trabajo con el E₂ marcado. Se dejaron incubar toda la noche a 4°C para establecer el equilibrio de unión y competencia por el anticuerpo. Finalmente, para separar la fracción unida al anticuerpo, se agregaron 200 µL de una suspensión de Carbón activado - Dextrán T-70 (0.625-0.0625%) y previa agitación, fueron sedimentados a 1500 x g durante 15 min. El sobrenadante o fracción unida se decantó a un vial de conteo y se le adicionaron 5 mL de solución de centello Insta-gel (Illinois, USA) y se evaluó el contenido de radiactividad en un espectrómetro de centelleo líquido Beckman LS-7000, con una eficiencia de conteo homogénea de 45%.

Radioinmunoanálisis de AMPc.

El RIA de AMPc se realizó siguiendo el método descrito por Zambrano *et al.*²⁸. Se determinó cuantitativamente AMPc extracelular (3'-5' adenosina monofosfato cíclico) con reactivos del National Hormone and Pituitary Program (Bethesda, MD, EUA). El anticuerpo utilizado fue el CV-27, el cual se empleó a una dilución final

de 1:70,000. El trazador del RIA fue 2-O-monosuccinil AMPc tirosil-metil-éster (Sigma) radiomarcado con ^{125}I por el método de cloramina T.

D. Aislamiento y caracterización de los mRNAs de CG.

El aislamiento del RNA total de las CG se realizó mediante la técnica descrita por Chomcynski²⁹. La preparación celular se lavó 2 veces con solución salina de fosfatos (PBS) fría, y al botón celular se le adicionaron inmediatamente 500 μL de TRIzol[®] (Gibco). Posteriormente, la adición de 200 μL cloroformo - alcohol isoamílico (980 μL - 20 μL) seguida de centrifugación (12.000 xg) permitió que se obtuviera la separación de las fases; a la fase acuosa se le adicionó 500 μL de isopropanol para precipitar al RNA total y posteriormente se realizaron lavados con etanol al 75%. Por centrifugación se recuperó el RNA y se disolvió en agua tratada con Dietilpirocarbonato (DEPC) (Biorad, Hercules, CA, USA), con la finalidad de inhibir RNAsas.

E. Transcripción reversa (RT) seguida de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (RT-PCR)

La transcripción reversa se realizó por técnicas estándar (PCR Superscript II[™] (Gibco) utilizando el estuche que contiene oligo dT y la enzima transcriptasa reversa aislada del virus de la leucemia murina (MuLV). Brevemente, 2 μg de RNA total fueron incubados a 37°C durante 45 minutos con 1 μL (50 unidades) de transcriptasa reversa MuLV en una mezcla de nucleótidos y oligo dT como iniciador de la retrotranscripción. El DNA complementario (cDNA) obtenido se sometió a amplificación por PCR utilizando secuencias de oligonucleótidos específicas para P₄₅₀ aromatasas³⁰ (5'ARO:5'-GCTTCTCATCGCAGAGTATCCGG-3' y 3'ARO:5'-CAAGGGTAAATTCATTGGGCTTGG-3') y gliceraldehido 3-fosfato-

deshidrogenasa (G3PD) como normalización³⁰ (5'G3PD:5'-ACAATCTCTGGGCTCGGCTT-3' y 3'G3PD:5'-CCCAAAGGTCACTCAGGCAA-3'). En ambos casos, se usaron las siguientes temperaturas y tiempos de desnaturalización, alineamiento y extensión: 94°C – 30 seg, 60°C – 30 seg y 72°C – 60 seg durante 35 ciclos. El tiempo de extensión para el último ciclo fue de 7 minutos. Los productos de PCR obtenidos fueron separados electroforéticamente en un gel de agarosa al 1.2% durante 30 minutos a 90 V. Finalmente, los geles se tiñeron con bromuro de etidio y el análisis de los resultados se realizó mediante un transiluminador y un paquete computacional Molecular Analysis (BioRad). La normalización se realizó dividiendo los valores relativos de la absorbancia del producto de PCR de la aromatasa entre los del G3PD.

F. Análisis estadístico .

Las concentraciones de T y E₂ se reportaron en función de las densidades celulares, y las medias de los diferentes grupos fueron comparadas estadísticamente a través de pruebas de T de Student o análisis de varianza, seguidos de la prueba de Tukey. En ambos casos se consideró como nivel de significancia estadística p<0.05.

VI. RESULTADOS

RESULTADOS PRELIMINARES

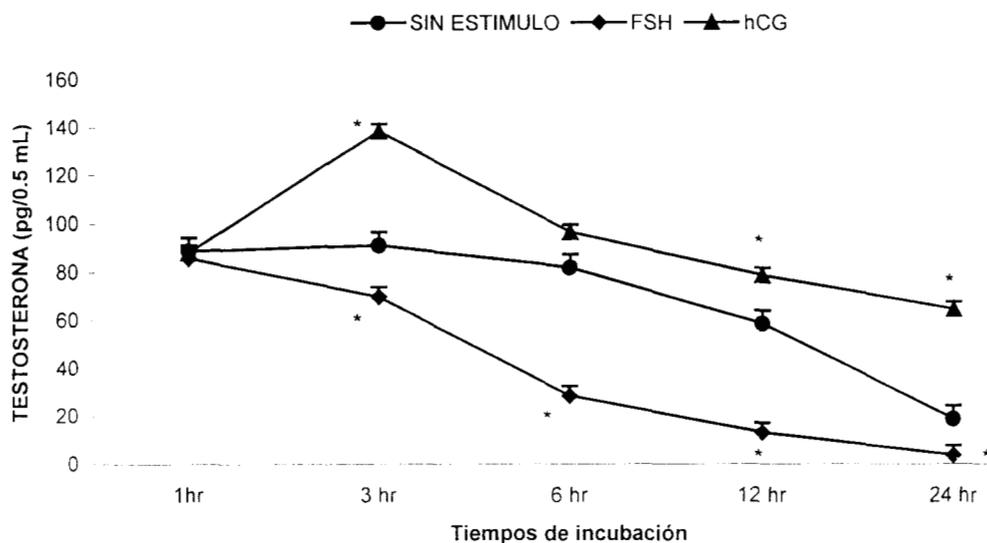
Durante el inicio de la fase experimental y en lo correspondiente a la estandarización de técnicas y métodos se realizaron múltiples experimentos para optimizar la obtención de células de la granulosa viables, esta viabilidad fue medida utilizando la prueba de exclusión de azul de tripán. La viabilidad celular fue mayor al 85% y el número de células obtenidas por cada grupo de cinco ratas se mantuvo en un rango de $5-8 \times 10^6$ células/mL, mientras que el porcentaje de sobrevivencia se mantuvo entre el 87 y 93%.

Con la finalidad de determinar los tiempos óptimos de incubación para obtener una respuesta adecuada en la esteroidogénesis de las CG, se incubaron 7.5×10^5 células con 500 μ L de medio McCoy 5A durante 1, 3, 6, 12 y 24 horas, una vez transcurridos estos tiempos de incubación se separaron los medios por centrifugación y en estos últimos se cuantificó la concentración de testosterona.

En la Gráfica 1 se muestra que en el tiempo de incubación de 1 hora, el contenido de Testosterona en el grupo control es de 87 pg mientras que en las células estimuladas con FSH alcanzan los 84 pg y con las células incubadas con hCG el valor es de 86 pg, es notorio que después de una hora de incubación no existe una diferencia significativa entre los tres grupos experimentales.

La concentración de T en las CG disminuyó conforme aumentaron los tiempos de incubación, tanto en el grupo control como en las células que son estimuladas con FSH y hCG. Las CG estimuladas con FSH tienen una disminución significativa a las 3 horas de incubación y el contenido de T llega apenas a ser apreciable a las 24 horas de incubación. Las CG estimuladas con hCG aumentan significativamente un 50 % con respecto del control a las 3 horas

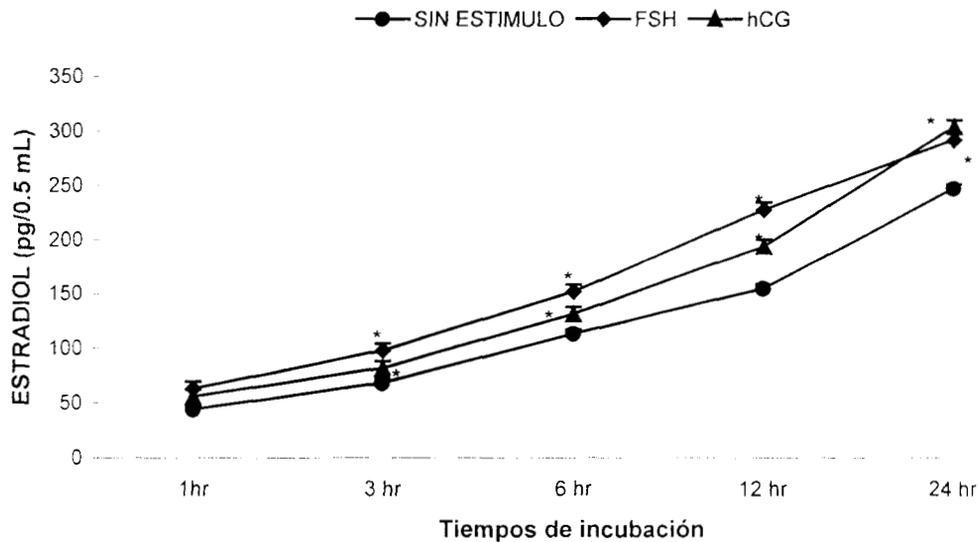
de incubación y posteriormente se decrementa conforme aumentan los tiempos de incubación.



Gráfica 1. Efecto del estímulo con FSH y LH sobre la síntesis de testosterona en CG a diferentes tiempos de incubación para la valoración del tiempo óptimo de incubación. Las pruebas fueron realizadas por triplicado. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (CG incubadas sin estímulo de gonadotropinas) $P < 0.05$ determinado por análisis de varianza.

Se evaluó el contenido de estradiol mediante RIA para los mismos tiempos de incubación (Gráfica 2). En la gráfica se muestra que la concentración de estradiol se incrementa conforme aumentan los tiempos de incubación. Cuando las células fueron incubadas en ausencia de gonadotropinas, las diferencias significativas se observaron después de 6 horas de incubación, en donde se incrementó la concentración de estradiol un 50% y posteriormente los incrementos fueron aumentando significativamente. Cuando las células fueron incubadas en presencia de FSH el aumento significativo se encontró a las 3 horas de incubación y fue incrementando hasta las 24 horas. Cuando las células fueron incubadas con estímulos de hCG, se encontraron diferencias significativas a partir de las 3 horas de incubación y las concentraciones de estradiol en estas células se incrementó

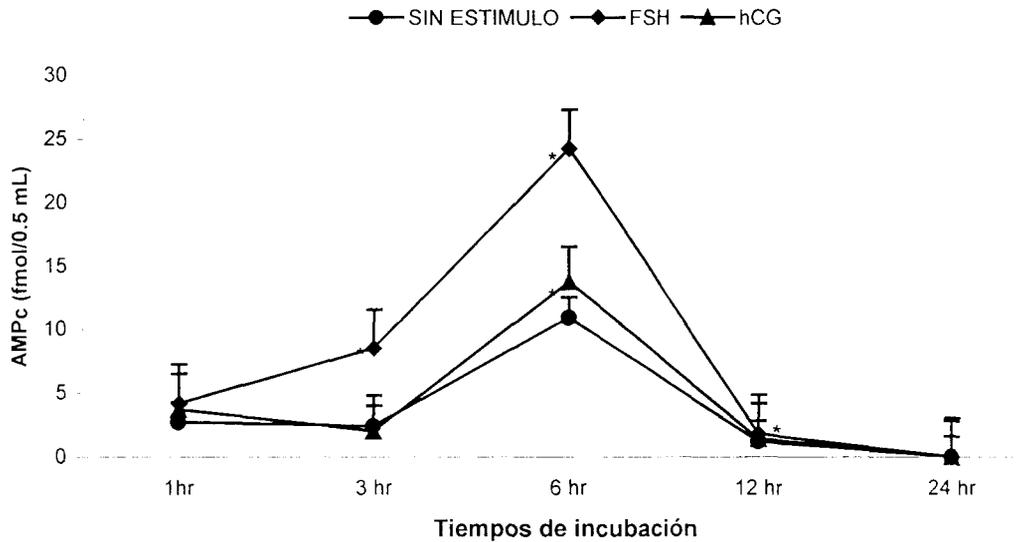
conforme se aumentaban los tiempos de incubación. Las concentraciones de estradiol en células estimuladas con hCG fueron menores que las obtenidas en células estimuladas con FSH. Los incrementos en la concentración de estradiol son independientes del estímulo que se le proporciona a la célula.



Gráfica 2. Efecto del estímulo con FSH y LH sobre la síntesis de estradiol en CG a diferentes tiempos de incubación para la valoración del tiempo óptimo de incubación. Las pruebas fueron realizadas por triplicado. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (CG incubadas sin estímulo de gonadotropinas) $P < 0.05$ determinado por análisis de varianza.

El hecho de que las CG a las 6 horas de estimulación presentaran diferencias significativas con respecto de los controles (Gráfica 1 y 2) determinó que ese era el tiempo óptimo para una respuesta adecuada por parte de las células. Para confirmar que las células respondían adecuadamente a este tiempo se realizó la cuantificación del contenido del AMPc en las CG por RIA (Gráfica 3). Se encontró que las células, independientemente del estímulo, tienen un incremento en la concentración de AMPc a las 6 horas de incubación, que disminuye significativamente a las 12 horas, mientras que a las 24 horas ya no se detectó AMPc en ninguno de los grupos. Las células estimuladas con FSH son las

que poseen un mayor contenido de AMPc y alcanzan una máxima concentración a las 6 horas. De esta manera se determinó que el tiempo adecuado para la incubación de las células era de 6 horas y que el modelo escogido respondería adecuadamente a ese tiempo de incubación.



Gráfica 3. Concentración de AMPc en las CG en diferentes tiempos de incubación. Las pruebas se realizaron por triplicado. * Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control (CG incubadas sin estímulo de gonadotropinas) $P < 0.05$ determinado por análisis de varianza.

EXPLORACION DE LAS VIAS DE TRANSDUCCION DEPENDIENTES Y NO DEPENDIENTES DE AMPc.

Con la finalidad de explorar las diferentes vías dependientes e independientes de AMPc, las CG fueron incubadas en presencia de diversas sustancias durante periodos de 6 horas en presencia y ausencia de gonadotropinas. La incubación se realizó con las diferentes sustancias mencionadas anteriormente en materiales y métodos.

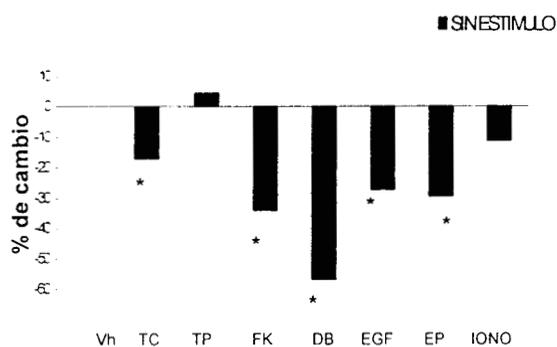
Los medios utilizados para la exploración de la vía dependiente de AMPc se complementaron con metilisobutilxantina (MIX) para inhibir las fosfodiesterasas. Las diferentes sustancias adicionadas a las CG e incubadas por 6 horas modificaron la transformación de los esteroides. Se puede observar que el grupo control con vehículo mostradas en la gráfica 4, cuando las células fueron expuestas a la TC tuvieron un decremento del 18% en el contenido de testosterona, mientras que con la adición de la TP no presento cambios significativos; la FK disminuye el contenido de Testosterona, ya que se redujo un 35%, de igual manera EGF mantuvo una disminución del 28% y el EP tuvo una diferencia significativa obteniendo una disminución del contenido de testosterona del 32% con respecto del control; sin embargo, cuando se adiciona el DB hay una disminución significativa con una reducción en el contenido de testosterona del 56%, mientras que las células incubadas con el IONO presentaron una disminución en el contenido con respecto del control del 13% no presentando una diferencia significativa.

Cuando las células fueron incubadas con FSH (Gráfica 5) se tiene una disminución significativa en el contenido de Testosterona con respecto del control vehículo, ya que disminuye mas del 50% y las células incubadas sin la adición de alguna sustancia mantienen igual contenido de testosterona con las células incubadas con la presencia de TP, es decir, no hay diferencias significativas, sin embargo, cuando las células fueron incubadas en presencia de TC, FK , EGF y EP existe una marcada disminución en cuanto al contenido de Testosterona. Cuando las células fueron incubadas con el IONO presentaron incremento de casi el 100 % con respecto del control vehículo, contrariamente, las células incubadas con DB presentaron una diferencia significativa con respecto del control vehículo, debido a que el contenido de testosterona disminuyó casi un 100%.

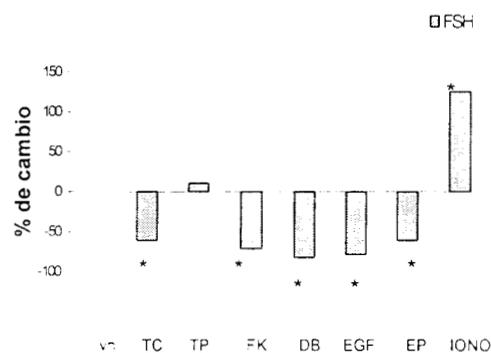
Cuando las células fueron incubadas con hCG (Gráfica 6) el comportamiento fue semejante a las células incubadas con FSH, solamente que el contenido de testosterona es significativamente mayor en la mayoría de los

grupos, sin embargo, cuando las células incubadas fueron expuestas a el DB y EGF el contenido de testosterona se mantuvo por debajo de los grupos de células incubadas sin gonadotropinas, en los casos de la adición de TC y FK existe una disminución significativa con respecto al grupo control vehículo. Las células expuestas a la TP, IONO y EP no presentaron diferencias significativas con respecto de su control.

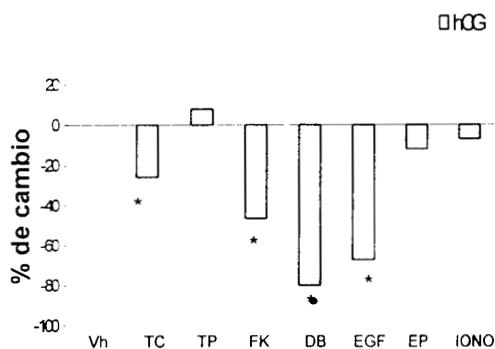
TESTOSTERONA



Gráfica 4.



Gráfica 5.



Gráfica 6.

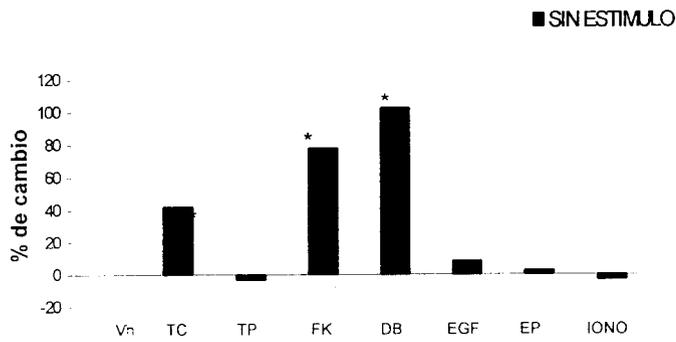
Las Gráficas representan el porcentaje de cambio en el contenido de Testosterona con relación a las sustancias administradas a las CG durante 6 horas de incubación. El porcentaje de cambio se obtuvo comparando cada una de las sustancias administradas con respecto del control vehículo (Vh) en cada una de las gráficas. *Representa los grupos que presentaron diferencias significativas respecto a su control vehículo .

Cuando se adicionaron a la CG las diferentes sustancias y se realizó la determinación de estradiol por RIA (Gráfica 7), se pudo observar que el grupo control vehículo mantuvo igual el contenido de estradiol que el grupo al que se le adicionó TP, es decir, no presentó diferencias significativas. Lo mismo ocurrió cuando las células fueron incubadas con el EGF, EP y el IONO. Sin embargo, existió una diferencia significativa cuando se adicionó TC ya que las células presentaron un incremento en el contenido de estradiol del 75 %. Este aumento fue mayor cuando se adicionaron a las células la FK y el DB, incrementando el contenido de estradiol este último un 100% más que el grupo control vehículo.

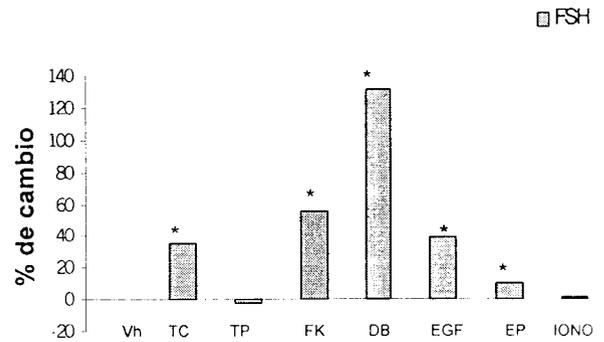
Cuando las CG incubadas fueron estimuladas con FSH (Gráfica 8) la adición de todas las sustancias utilizadas incrementaron el contenido de estradiol. Sin embargo, cuando a las células se les adicionó la TP y el IONO no presentaron diferencias significativas con respecto del control vehículo. Cuando las células fueron expuestas a el DB se encontró una diferencia significativa, siendo, el aumento en el contenido de estradiol de más del 100%. El contenido de estradiol se incrementó un 10% cuando las células fueron incubadas con EP encontrándose una diferencia significativa entre este y el control vehículo.

Cuando las células fueron incubadas en presencia de hCG (Gráfica 9), el contenido de Estradiol no presentó diferencias significativas con respecto del control vehículo cuando se adicionó la TC, TP, EP y el IONO. Sin embargo, cuando las células fueron incubadas con DB el contenido de estradiol se incremento un 140% encontrándose diferencias significativas entre estas células y el control vehículo. Cuando a las células se les adicionó la FK y el EGF se obtuvo un incremento en el contenido de estradiol de casi un 40% encontrándose en estos grupos diferencias significativas con el control vehículo.

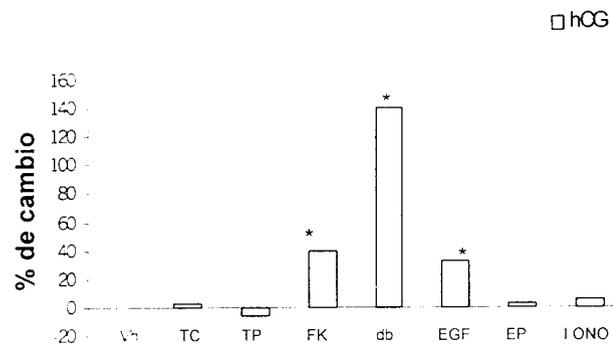
ESTRADIOL



Gráfica 7.



Gráfica 8.



Gráfica 9.

Las Gráficas representan el porcentaje de cambio en el contenido de estradiol con relación a las sustancias administradas a las CG durante 6 horas de incubación. El porcentaje de cambio se obtuvo comparando cada una de las sustancias administradas con el control vehículo (Vh) en cada una de las gráficas. *Representa los grupos que tuvieron diferencias significativas respecto al control vehículo.

EXPRESION DEL mRNA DE LA AROMATASA

La estandarización semicuantitativa de la expresión de la P₄₅₀ en el grupo control vehículo (células incubadas sin la adición de gonadotropinas) se puede observar en la Figura 7. El análisis semicuantitativo de la expresión de esta enzima se realizó obteniendo una relación de la densidad óptica del transcrito del RNAm de la aromatasa, entre la densidad óptica del gen constitutivo, de G3PD (normalización), como se observa en la Gráfica 10, la adición de las diferentes sustancias incorporadas a las CG sobrepasaron de forma mínima al grupo control vehículo. Las células a las que se les adicionó DB tuvieron una producción de aromatasa cercana a la de las células control vehículo, no presentaron diferencias significativas, al igual que las células que fueron incubadas con el EP. Las células a las que se les adicionó la FK mostraron un ligero aumento en la expresión del RNAm, sin embargo, al igual que en los casos anteriores no se presentaron diferencias significativas con respecto del control vehículo.

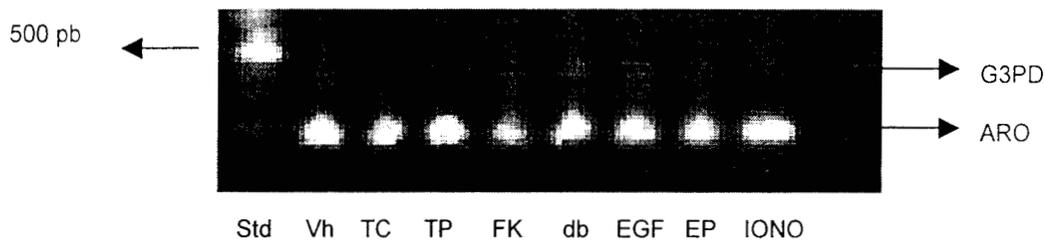
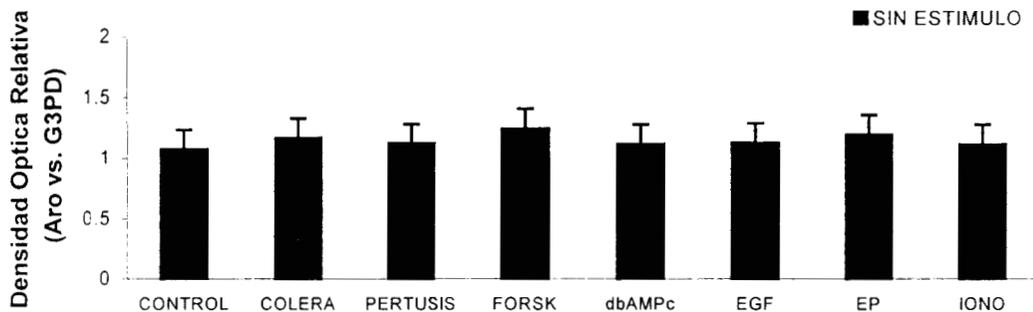


Figura 7. Autoradiografía representativa de la RT-PCR del RNAm de P₄₅₀ aro y RNAm de G3PD, en CG mantenidas en incubación por 6 horas y con la adición de las diferentes sustancias utilizadas para la exploración de las vías de señalización. Las células fueron incubadas en ausencia de gonadotropinas.



Gráfica 10. Análisis semicuantitativo de la expresión de los RNAm de la aromatasa P₄₅₀ con respecto al G3PD (sonda de normalización) obtenidas por RT-PCR, en CG mantenidas en incubación durante 6 horas. Adición de las diferentes sustancias utilizadas para la exploración de las vías de señalización. Las células fueron incubadas en ausencia de gonadotropinas. Las pruebas fueron realizadas con una n=3.

En el caso del análisis semicuantitativo de la expresión del gen de la P₄₅₀ aromatasa por las CG (Figura 8) incubadas en presencia de FSH se observó que las células que fueron tratadas con EP disminuyeron la expresión del RNAm de la aromatasa, existió una diferencia significativa entre el EP y el grupo control vehículo, esto se pudo comprobar con el análisis semicuantitativo, el cual se muestra en la Gráfica 11. Entre los grupos TC, TP, EGF y IONO no presentan diferencias significativas con respecto del grupo control vehículo, es decir, la expresión de la aromatasa se mantiene constante, mientras que a los grupos a los que se les adicionó durante la incubación el DB mostraron un incremento en la expresión de la enzima mostrando una diferencia significativa entre este grupo y el control vehículo.

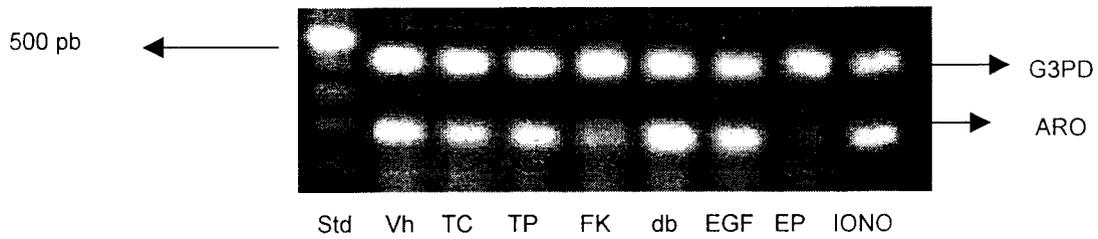
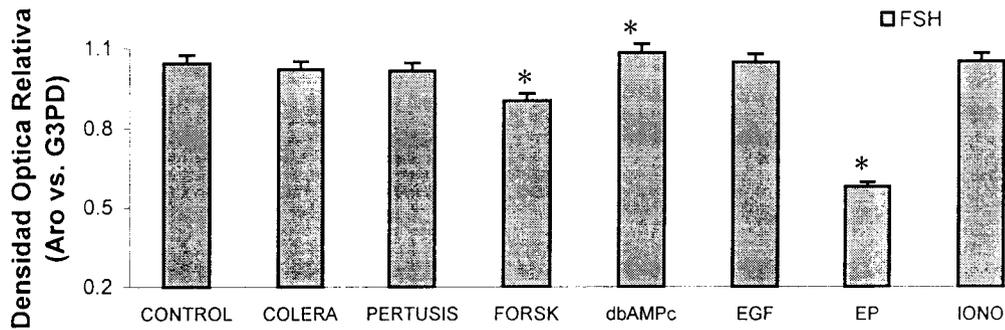


Figura 8. Autoradiografía representativa de la RT-PCR del RNAm de P₄₅₀ aro y RNAm de G3PD, en CG mantenidas en incubación por 6 horas y con la adición de las diferentes sustancias utilizadas para la exploración de las vías de señalización. Las células fueron incubadas en presencia de FSH.



Gráfica 11. Análisis semicuantitativo de la expresión de los RNAm de la aromatasa P₄₅₀ con respecto al G3PD (sonda de normalización) obtenidas por RT-PCR, en CG mantenidas en incubación durante 6 horas. Adición de las diferentes sustancias utilizadas para la exploración de las vías de señalización. Las células fueron incubadas en presencia de FSH. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo P<0.05 determinado por análisis de varianza.

En el caso del análisis semicuantitativo de la expresión del gen de la P₄₅₀ aromatasa por las CG (Figura 9) incubadas en presencia de hCG, se observó que la expresión de la aromatasa se ve disminuida en las células incubadas en ausencia de las sustancias, sin embargo, los otros grupos tuvieron una expresión mayor fueron aquellas tratadas con el IONO.

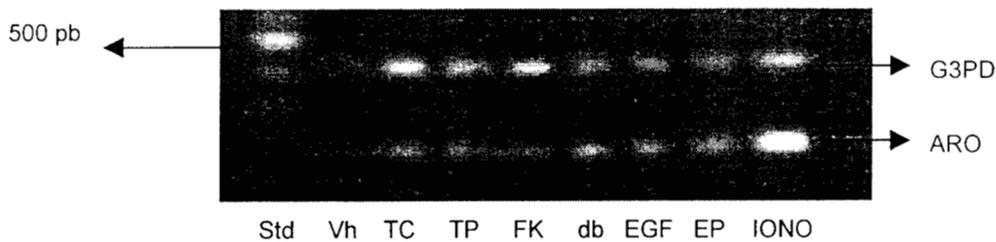
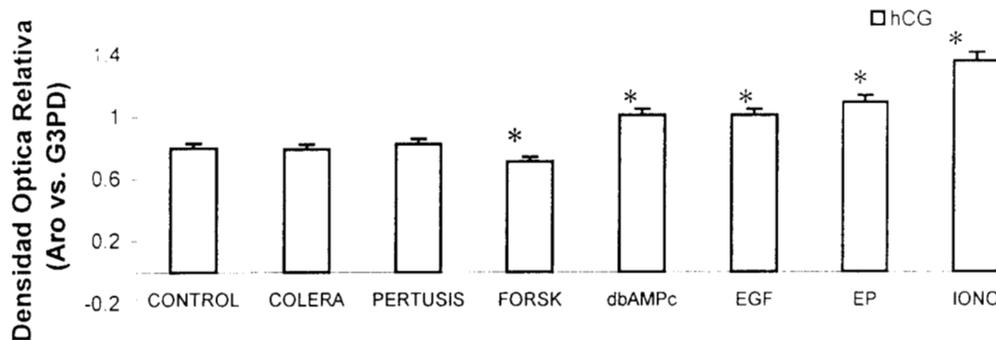


Figura 9. Autoradiografía representativa de la RT-PCR del RNAm de P₄₅₀ aro y RNAm de G3PD, en CG mantenidas en incubación por 6 horas y con la adición de las diferentes sustancias utilizadas para la exploración de las vías de señalización. Las células fueron incubadas en presencia de hCG.



Gráfica 12. Análisis semicuantitativo de la expresión de los RNAm de la aromatasa P₄₅₀ con respecto al G3PD (sonda de normalización) obtenidas por RT-PCR, en CG mantenidas en incubación durante 6 horas. Adición de las diferentes sustancias utilizadas para la exploración de las vías de señalización. Las células fueron incubadas en presencia de hCG. *Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control vehículo P<0.05 determinado por análisis de varianza.

En la gráfica 12 se observa que a las CG que fueron expuestas a la TC, TP no presentaron diferencias significativas con respecto del control vehículo, la expresión de la enzima no se modificó con la adición de estos factores, sin embargo, las diferencias significativas se presentaron cuando a las células se les adicionó el DB, EGF, y el EP, estos grupos tuvieron un incremento en la expresión de la aromatasa P₄₅₀, incluso en mayor incremento se mostró cuando a las células se les adiciona el IONO. Cuando las CG se incubaron con la FK mostraron diferencias significativas con respecto del control, se observó que la expresión se vió disminuida con esta sustancia.

VII. DISCUSION

El papel de la FSH y la LH en la activación de el complejo enzimático P₄₅₀ aromatasa en las CG ha sido estudiado utilizando modelos de ratas inmaduras; este tipo de modelos son válidos en el sentido de que aíslan, en términos temporales y espaciales , la acción de los estímulos agregados, pero por lo mismo no permiten evaluar las acciones de otros factores parácrinos o endócrinos que actúan en estas células de manera normal en el organismo adulto. El propósito de este trabajo fue tratar de determinar los posibles mecanismos de acción de los factores que regulan *in vitro* la expresión de las enzimas de la vía esteroidogénica, en particular el complejo enzimático P₄₅₀ aromatasa en CG provenientes de ratas maduras.

El uso de la rata hembra como modelo experimental para el estudio de la función endocrina ha proporcionado datos interesantes y aplicables a otras especies, ya que los mecanismos básicos involucrados en el control endócrino pueden ser extrapolables inclusive al humano³¹. En la edad adulta de las ratas (90 días) su función reproductora está determinada por una multiplicidad de factores interrelacionados, en donde las hormonas ya han actuado en sus órganos blanco de manera repetida, y estos ya han respondido a tales pulsos endócrinos por lo tanto se encuentran sometidos a controles cíclicos, pulsátiles y circadianos⁵.

Se ha demostrado que el uso de cultivos primarios de CG obtenidos por punción de folículos preovulatorios tiene muchas ventajas para el estudio de mecanismos de regulación hormonal³². Las incubaciones de la fracción celular de CG realizadas en este trabajo proveen un conveniente y reproducible modelo experimental para poder elucidar las respuestas rápidas del control hormonal correspondiente a estas células. La particularidad de las células utilizadas en este trabajo es que han estado sometidas al efecto de factores parácrinos y endócrinos presentes de manera "normal" en el ovario y que por tanto semejan las condiciones que se estarían llevando a cabo *in vivo*.

Para definir el papel que tienen la FSH y la LH en la producción de estrógenos en las CG provenientes de folículos preovulatorios se examinaron algunos parámetros relacionados:

- 1) El tiempo óptimo de incubación de las células con la adición de cada una de las gonadotropinas para obtener una respuesta adecuada a los estímulos, en términos de la transformación de los esteroides.
- 2) El efecto en la producción de T y E₂ en las CG incubadas de diferentes agentes útiles para la exploración de diferentes vías de transducción, todo ello en ausencia y presencia de las gonadotropinas.
- 3) La expresión del RNAm de la P₄₅₀ aromatasa en CG incubadas en presencia de FSH y hCG.
- 4) Los posibles mecanismos de acción de las gonadotropinas en estas células provenientes de folículos maduros preovulatorios y su repercusión en términos de la transformación de andrógenos en estrógenos.

Los experimentos realizados sugieren que los tiempos de incubación de las CG para que se obtenga una respuesta significativa en términos de la esteroidogénesis es de 6 horas. Como lo muestra la Gráfica 1 en cuanto a la producción de T, las células incubadas durante una hora, en presencia y ausencia de gonadotropinas no presentan diferencias significativas entre sí, esto sugiere que las células aun no están respondiendo o que al menos el parámetro de evaluación aun no se ha modificado, sin embargo a las 3 hr. ya existe una diferencia significativa entre los tres grupos experimentales: en las células que fueron incubadas con FSH el contenido de T se encontró por debajo de las células control (CG sin gonadotropinas), en cambio el contenido de T en las células que fueron incubadas con hCG fue significativamente mayor con respecto al grupo control, durante los siguientes tiempos de incubación la producción de los esteroides en los grupos experimentales, aunque difirieron en la cantidad, tuvieron

el mismo patrón de comportamiento, el cual consistió en una disminución del contenido conforme se aumentaron los tiempos de incubación. El papel de la FSH para la producción y regulación de T en las células de la granulosa aún no ha sido definido, sin embargo, el hecho de que las CG incubadas con FSH tuvieran sus niveles de T por debajo de los grupos control sugiere que la FSH no promueve la síntesis o la acumulación de T, al menos no en grandes cantidades, o bien que el contenido del andrógeno se disminuyera por su transporte o utilización, contrariamente a las células incubadas con hCG, en las que a 3 hr. de incubación presentaron el incremento máximo y que se mantuvieron en valores por arriba del control. El papel de la hCG y/o LH en las CG para la regulación de la T, tampoco ha sido reportado, no obstante que se le relaciona con el control de la producción y secreción de este andrógeno por las células de las tecas¹, sin embargo, Natraj y colaboradores³³ estudiando el papel de la progesterona en CG proponen que para que las CG tengan síntesis de progesterona requieren de dosis previas de LH y que una vez que la progesterona se encuentra en la célula se inhibe la actividad de la aromatasa.

Por otro lado, cuando observamos las modificaciones en el contenido de estradiol en la Gráfica 2, al tiempo de incubación de 1 hr., las células de los diferentes grupos experimentales aún no mostraron una respuesta que expresara una diferencia entre los tres grupos, sin embargo a 3 horas de incubación se observaron diferencias significativas con respecto del control, en los tiempos posteriores; se incrementaron los niveles en los tres grupos cuando se aumentan los tiempos de incubación. Las células incubadas con FSH tienen una respuesta mayor en la producción de estradiol, es decir, la FSH al parecer estimuló la actividad de la aromatasa para llevar a cabo la síntesis de estradiol, mientras que la producción de estradiol en las células incubadas con hCG es menor que de las incubadas con FSH pero mayor que las del grupo control. Esto sugiere que la hCG pudiera tener un papel sobresaliente en la síntesis de estradiol en CG proveniente de folículos preovulatorios.

Después del análisis de los resultados obtenidos, se propuso seleccionar tres horas como tiempo de incubación, ya que en este tiempo las células respondieron adecuadamente a los estímulos proporcionados, sin embargo, en vista de que también se tenían como objetivos evaluar las vías de transducción de señales, se valoró el contenido de AMPc en estas mismas células y en los tiempos de incubación semejantes. En la gráfica 3 se puede observar que las células independientemente del estímulo que se les aplique, tienen una producción máxima de AMPc a las 6 horas de incubación con cifras significativamente mayores al compararse con los otros tiempos; los resultados obtenidos fueron concluyentes para la elección de un tiempo óptimo de incubación. Cabe resaltar que las células estimuladas con FSH presentaron una mayor producción de AMPc, se puede suponer que la FSH está actuando estimulando la síntesis de AMPc en las CG, y que probablemente el AMPc es utilizado como segundo mensajero en las señales de transducción, tal como lo sugieren los trabajos realizados por Richards, J.³⁴

Para poder determinar el efecto neto en los contenidos de T, de cada una de las sustancias utilizadas para la exploración de las vías de transducción, en las CG mantenidas durante 6 hr. de incubación se analizó la Gráfica 4. Las dosis de las diferentes sustancias utilizadas en la incubación demostraron que la adición de TC, DB, FK, EGF, e inclusive EP se disminuyó significativamente el contenido de T. Sin embargo, las diferencias entre el grupo control vehículo y los grupos a los que se les adicionó la TP o el IONO, mostraron no ser estadísticamente significativas. Estos resultados sugieren que los contenidos de testosterona en las CG tienen una dependencia inversa a la presencia de AMPc, pero no se puede dar una afirmación absoluta de esto, debido a que cuando las células fueron expuestas al EP, que es un agente explorador de una vía independiente de AMPc, también se encontraron niveles de T por debajo del grupo control vehículo.

En el caso de las células incubadas en presencia de FSH (Gráfica 5) se observó que todos los grupos de células decrementaron significativamente su

contenido de T, con excepción del grupo al que se le adicionó la TP y el ionóforo de calcio. Entre el grupo control y el de la TP no existieron diferencias significativas. La magnitud de la disminución en cuanto a la producción de T cuando las células son incubadas con FSH, indica que esta hormona no participa directamente en la producción de T pero posiblemente si en favorecer su utilización. Las CG aisladas provenientes de ratas inmaduras estimuladas con FSH parecen ser incapaces de formar andrógenos, sin embargo se ha demostrado que las CG incubadas en presencia de la FSH y el Ionóforo de calcio, son efectivos para incrementar de síntesis de T en un periodo de incubación de 6 horas¹⁷, esto concuerda con el resultado obtenido. La posible explicación del efecto del Ionóforo es que el contenido citosólico de calcio se incrementa ya que éste abre canales de depósitos intracelulares de calcio y probablemente este ión esté interviniendo en la mayor síntesis de T.

En la Gráfica 6 se puede observar el efecto las sustancias utilizadas para la exploración de las vías de transducción, con el estímulo de hCG sobre las CG, las diferencias significativas están dadas por la disminución en el contenido de T en las células incubadas con TC, FK, DB y EGF. Los grupos a los que se les adicionó la TP, el EP y el IONO se mantuvieron sin cambio significativo con respecto del control vehículo.

Los resultados de estos experimentos sugieren que las CG son capaces de responder a hCG. Esto concuerda con algunos trabajos realizados en los que se plantea que los folículos preovulatorios son capaces de responder a la LH. Estudios experimentales han demostrado que el incremento en la sensibilidad a la LH por parte de las CG es debido al progresivo incremento del número de receptores de LH en esas células³⁵, incremento generado por la acción de la FSH. Por otro lado, Flores y colaboradores¹⁸ han postulado que en las CG maduras la vía de trasducción de la LH está acopladas a PLC (fosfolipasa C), demostrando que a bajas concentraciones de LH se puede activar la liberación de calcio de almacenes intracelulares y por otro lado; la estimulación de CG con

concentraciones altas de LH pueden iniciar una generalizada propagación de liberación calcio intracelular. Este grupo demuestra que las CG de ovino estimuladas con LH envuelven la movilización de calcio intracelular y un flujo de catión transmembranal¹⁸. Estos resultados son consistentes con la idea de que el receptor a LH en CG en proestro están acoplados a la PLC, así como a otros receptores que evocan dinámicas de calcio.

Por otro lado, se ha demostrado que existe un sinergismo entre la LH y el AMPc, con inhibidores de la fosfodiesterasa como por ejemplo la MIX, ya que pueden incrementar tanto los niveles basales, como la producción de T estimulada por LH en CG. Adicionalmente se ha demostrado que la LH puede regular a la adenilato ciclasa vía calcio/calmodulina y proteína cinasa C lo que apoya los resultados encontrados³⁶.

El papel del Calcio en la producción hormonal del ovario parece ser complejo y puede ser afectado por la presencia de gonadotropinas o agentes que inducen la producción o permanencia del AMPc³⁴.

El Calcio tiene un papel importante en la regulación gonadotrópica de la esteroidogénesis en el ovario *in vitro*. La estimulación de un flujo de calcio extracelular en CG puede ser un componente integral importante de acción de FSH en la regulación de la esteroidogénesis en sus células blanco. La participación del sistema Calcio-calmodulina en la regulación hormonal de la producción de progesterona de las CG *in vitro*³⁴. La omisión del calcio en el medio de incubaciones de CG reduce marcadamente la producción de progesterona y la aromatización de andrógenos exógenos a estradiol en respuesta a gonadotropinas³⁴.

En las gráficas donde se evalúa la producción de estradiol se pudo observar que en el grupo de CG que fueron incubadas sin la presencia de gonadotropinas (Gráfica 7) tuvieron cifras mayores con diferencias significativas con respecto del

control, aquellas células que fueron incubadas con TC, FK y DB. Cuando las células se incubaron en presencia de FSH (Gráfica 8), todas las sustancias adicionadas mantuvieron su mayor nivel con diferencias significativas con respecto del control vehículo, la producción de estradiol se incrementó considerablemente (140%) con la adición del DB. Sin embargo la adición del IONO no produjo un cambio significativo, se mantuvo igual que el grupo control correspondiente, al igual que el grupo al que se le adicionó la TP.

En la Gráfica 9 se observan los contenidos de E_2 , en las células incubadas en presencia de hCG, los grupos de células incubadas con FK, DB y EGF presentaron cambios significativos con respecto del control vehículo.

Es importante resaltar que en los tres grupos, es decir en las células incubadas sin presencia de gonadotropinas y en las células incubadas en presencia de FSH o hCG, los contenidos de estradiol se incrementaron considerablemente cuando se les adiciona dbAMPc³⁷.

Nuestro resultado es concordante con lo que se ha reportado para el Ionóforo y el EP como potentes inhibidores de la respuesta esteroideogénica en CG con la estimulación de FSH por la vía del AMPc³⁷. Sin embargo el Ionóforo es capaz de estimular la producción de progesterona basal en CG *in vitro*¹⁸. La regulación de la esteroideogénesis por gonadotropinas es un fenómeno complejo en el cual pueden participar diferentes acciones del calcio; así el Ionóforo estimula la conversión de pregnenolona exógena a progesterona por CG *in vitro*³⁷. La TC ha sido probada para estimular la producción de AMPc en CG, y se ha demostrado que cuando se incuban en un medio libre de calcio se observa un decremento en la respuesta esteroideogénica¹⁸.

La P₄₅₀ aro fue localizada en las CG de folículos preovulatorios, tal como lo muestran los resultados, los factores que incrementaron la expresión del mRNA fueron las acciones de las gonadotropinas. En las células incubadas en presencia

de FSH (gráfica 11) el DB tuvo un papel importante en el incremento de la expresión y el EP inhibió la expresión de la enzima. Cuando las células fueron incubadas en presencia de hCG, el DB, EGF, EP y el IONO incrementaron la expresión enzimática, sin embargo, la FK inhibió esta actividad (Gráfica 12).

Los resultados encontrados no apoyan un mecanismo único en la transducción de las gonadotropinas. De tal forma que el mecanismo molecular por el cual la FSH y LH regulan la actividad de la aromatasa en CG provenientes de folículos maduros aún no es claro. Algunos estudios sugieren que el AMP está involucrado en la regulación de la FSH sobre la producción del mRNA de la p450 aro y adicionalmente demostraron que la adición de la hCG a CG estimula el crecimiento en folículos preovulatorios e incrementa la habilidad para sintetizar estradiol³⁸.

La aromatasa es inducida en CG por ambas hormonas. FSH y LH, la elevada expresión de la aromatasa en CG de folículos preovulatorios ocurre dentro de las primeras 7 horas de iniciado el estímulo, posteriormente tiene un dramático decremento. Se ha demostrado que existe una regulación a la baja en los niveles de mRNA y que implica múltiples vías de señalización, incluyendo a las proteínas cinasas A y C, que pueden disminuir la transcripción de la aromatasa o incrementar el mRNA dependiendo del estado de diferenciación de las CG. En CG de folículos preovulatorios la FSH induce la aparición de el mRNA de aromatasa³⁹. El EP es un potente inhidor del mRNA de aromatasa cuando las células son incubadas con FSH³⁹.

El control de la proliferación y diferenciación en CG por FSH y LH es complejo. En folículos maduros la FSH estimula la diferenciación y expresión de genes específicos tales como el de aromatasa y el del receptor de la LH. El surgimiento de la LH termina con la proliferación de las CG y las reprograma para que lleguen a formar el cuerpo lúteo, con la síntesis preferencial de progesterona, sin perder la característica síntesis de estradiol. Los eventos de señalización

celular que son llevados a cabo por LH no son claros, pero parecen requerir al AMPc como un segundo mensajero. La importancia central de una cinasa A en la mediación de muchos de los efectos de AMPc ha sido confirmada por González y colaboradores¹⁷, en las que utilizan inhibidores de proteína cinasa A, sin embargo, parece que ésta tiene una función crítica en la CG, pero además proporcionan evidencia de que las FSH/T, FK y el 8-bromo-cAMP estimulan la fosforilación de tres distintas cinasas: la proteína cinasa B, Sgk y p38MAPk, por mecanismos independientes de la proteína cinasa A.

VIII. CONCLUSIONES

1.-El tiempo de incubación para que las CG provenientes de folículos preovulatorios de ratas maduras proporcionen una respuesta óptima a diferentes estímulos es a las 6 horas.

2.- Los resultados muestran que la vía de síntesis de T en las CG es dependiente de AMPc, ya que cuando se adicionó directamente el análogo de AMPc los incrementos fueron significativos, sin embargo el hecho de que los agentes adicionados como toxina de cólera y forskolina, no aumentaran el contenido de T con respecto del control sugiere que múltiples vías de señalización pudieran estar estimuladas.

3.- La magnitud de la disminución en cuanto al contenido de T cuando las células son incubadas con FSH indica que esta hormona no participa directamente en la producción de T pero posiblemente si en favorecer su utilización.

4.- Los incrementos en el contenido de estradiol cuando se adicionó a las CG incubadas con hCG el DB, sugiere que la hCG puede regular a la adenilato ciclasa.

5.- Las CG provenientes de folículos preovulatorios de ratas maduras son capaces de responder a la hCG para producir estradiol.

6.- La P450 aromatasasa es inducida por las hormonas FSH y hCG y la expresión máxima esta dada cuando se adicionan a las CG los agentes DB y el IONO.

7.- Los resultados demuestran que la principal vía de señalización es dependiente del AMPc pero pueden haber una regulación a la baja que envuelve múltiples vías de señalización en las que están incluidas las proteínas cinasas A y C.

IX. BIBLIOGRAFIA

¹ Wilson, J. D., Foster, D.W. Williams Textbook of Endocrinology. 8th Edition, W.B. Saunders. 1992.

² Richards, J. Hormonal Control of Gene Expression in the ovario. Endocrine Reviews. 15:725-751, 1994.

³ Erickson, G., Wang, C., Hsueh, A. FSH Induction of Functional LH Receptors in Granulosa Cells Cultured in a Chemically Defined Medium, Nature, 279-336, 1979.

⁴ Albertini D., Anderson. E. The Appearance and Structure of Intercellular Connections During the Ontogeny of the Rabbit Ovarian Follicle With Particular Reference to Gap Junctions. J. Cell. Biol. 63:234-245, 1974.

⁵ Adashi E., Hsueh J.W. Hormonal Induction of receptors During Ovarian Granulosa Cell Differentiation. Molecular and cellular Endocrinology. 99:153-159, 1994.

⁶ Reichert, L., Dattatreya Murty, M. The Follicle Stimulating Hormone (FSH) receptor in Ovary: Interaction with Mechanism of Signal Transduction and Properties of the Purified Receptor. Biol. Reprod. 40:13-16, 1989.

⁷ Alberts, B., Bray, D., Lewis, J. Martin, F. And Watson, D. Molecular Biology of the Cell. 3rd. Ed. Garland Publishing. Inc. MY. pp 690-712, 1989.

⁸ Gilman, A. G Protein and Dual Control of Adenylate Cyclase. Cell 36:577-579, 1984.

- ⁹ Dattatreyamurty, B., Ssehneyer, A., reichert, E. Physical and Functional Association of Follitropin Receptor With Cholera Toxin-Sensitive Guanine Nucleotide-Binding Protein. *J. Biol. Chem.* 262:11737-45, 1986.
- ¹⁰ Warrent, D. Development of the Inhibitory Guanine Nucleotide-Binding Regulatory Protein in Rat. *Biol. Reprod.* 40:1208-14, 1989.
- ¹¹ Rodbell, M., Birnbaumer, S., Pohl, H. Krans, S. Kinetics of Cytosolic Calcium and Aldosterone Responses in Rat Adrenal Glomerulosa Cells. *Endocrinology* 129:2431-2441, 1983.
- ¹² Cassel, D., Selinger, E. Basement Membrane Increased G-Protein Levels and Follicle-Stimulating Hormone Responsiveness of Sertoli Cell Adenylyl Cyclase Activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 252:538-551, 1986.
- ¹³ Berridge, M. Inositol Thiphosphate and Calcium Signalling. *Nature.* 361:315-325, 1993.
- ¹⁴ Taylor, C. The Role of G Proteins in Transmembrane Singnalling. *Biochem.* 272:1-13. 1995.
- ¹⁵ Choi, M., Cooke, B. Evidence for Two Independent Pathways in Stimulation of Steroidogenesis by Luteinizing Hormone Involving Chloride Channels and Cyclic AMP. *FEBS Lett.* 261:402-404, 1991.
- ¹⁶ Peter, C., Leung, K., Wang, J. The Role of Lipid Metabolism in the Ovary. *Biol. Reprod.* 40:703-708, 1989.
- ¹⁷ Gonzalez-Robayna, I., Falender, A., Ochsner,S., Firestone,G., Richards, J. Follicle-Stimulating Hormone (FSH) Stimulates Phosphorylation and Activation of protein Kinase B and Serum and Glucocorticoid-Induced Kinase-Independent

Signaling by FSH in Granulosa Cell. *Molecular Endocrinology* 14(8):1283-1300, 2000.

¹⁸ Flores, J., Aguirre, C., Sharma, P., Veldhuis, J. Luteinizing Hormone (LH) Stimulates Both Intracellular Calcium Ion (Ca^{2+}) Mobilization and transmembrane Cation Influx in Single Ovarian (Granulosa) Cells: Recruitment as a Cellular Mechanism of LH- (Ca^{2+}) Dose Response. *Endocrinology* 139:3606-3612, 1998.

¹⁹ Davis, J. Modulation of Luteinizing Hormone-Stimulated Inositol Phosphate Accumulation by Phorbol Esters in Bovine luteal Cells. *Endocrinology*: 131:749-757, 1992.

²⁰ Hunter, T. Karin, M. The Regulation of Transcription by Phosphorilation. *Cell*. 70:375-387, 1992.

²¹ Tsang B., Armstrong, D. Whitfield, J. Steroid Biosynthesis by Isolated Human Ovarian Follicular Cells in Vitro. *J. Clin. Endocrinol.* 51:1407-1413, 1980.

²² Risbridger, G. Local Regulation of Granulosa Cell Function by Inhibitors of Steroidogenic Activity. *Cell. Biol. Int. Rep.* 16: 399- 405, 1992.

²³ Fitzpatrick, S., Richards. J., Regulation of Cytochrome P450 Aromatase Messenger Ribonucleic Acid and Activity by Steroids and Gonadotropins in Rat Granulosa Cells. *Endocrinology* 129:1452-1462, 1991.

²⁴ Fishman, J., Goto, J. Mechanism of Strogen, Biosynthesis: Participation of Multiple Enzyme Sites in Placental Aromatasa Hidroxilations. *J. Biol. Chem.* 256:4466-4475, 1981.

²⁵ Erickson, G., Hsueh, J. Stimulation of Aromatase Activity by Follicle Stimulating Hormone in Rat Granulosa Cells *in Vivo* and *in Vitro*. *Endocrinology*, 102:1275-1282, 1978.

225718

²⁶ Bermúdez, J., Mendieta, E., Herrera, J. Evaluación de los Métodos de Aislamiento y Purificación de Células de Leydig y Sertoli. *Arch. Inv. Med.* 19:291. 1988.

²⁷ Bermúdez, J., León, C. Herrera, J. Fundamento y Estudio Comparativo de Dos Métodos de Análisis por Saturación. *Rev Med. IMSS.* 101:639-642. 1973.

²⁸ Zambrano, E., Barrios de Tomasi, J., Cardenas, M. Ulloa-Aguirre, A. Studies on the Relative *in Vitro* Biological Potency of the Naturally-Occurring isoforms of Intrapituitary Follicle-Stimulating Hormone. *Mol. Hum. Reprod.* 2:563-571, 1996.

²⁹ Chomczynski, P. Sacchi, N. Single Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidium Thiocyanate-Phenol Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* 162:156-159, 1993.

³⁰ Rappaport, M., Smith, E. Insulin-Like Growth Factor I Inhibits Aromatization Induced by Follicle-Stimulating Hormone in Rat Sertoli Cell Culture. *Biol. Reprod.* 54:446-452, 1996.

³¹ Becú-Villalobos D, Lacau-Mengido. Control Hormonal del Desarrollo Puberal en la Rata Hembra. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.* 40:1-17, 1990.

³² Gräs, S., Hannibal, J., Fahrenkrug, J: Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide Is an Auto/Paracrine Stimulator of Acute Progesterone Accumulation and Subsequent Luteinization in Cultured Periovarian Granulosa/Lutein Cells. *Endocrinology* 140:2199-2205, 1999.

³³ Natraj, U., Richards, J., Hormonal Regulation, Localization, and Functional Activity of the Progesterone Receptor in Granulosa Cells of Rat Preovulatory Follicles. *Endocrinology* 133:761-768, 1993.

³⁴ Richards, J. New Signaling Pathways for Hormones and Cycling Adenosine 3', 5'-Monophosphate Action in Endocrine Cells. *Molecular Endocrinology* 15(2): 209-218, 2001.

³⁵ Shiyou, C., Hong, S., Xuebo, L., Segaloff, D., Multiple Elements and Protein Factors Coordinate the Basal and Cyclic Adenosine 3',5' -Monophosphate-Induced Transcription of the Lutropin Receptor gene in Rat Granulosa Cells. *Endocrinology* , 140:2100-2109. 1999.

³⁶ Cooke, B. Is Cyclic AMP an Obligatory Second Messenger for Luteinizing Hormone? *Molecular and Cellular Endocrinology*, 69:C11-C15, 1990.

³⁷ Richards, J. Russell, D. Robker, R. Dajee, M. Alliston, T. Molecular mechanisms of ovulation and luteinization. *Molecular and Cellular Endocrinology* 145:47-54, 1998.

³⁸ Hickey, G., Chen, S., Besman, M., Shively, J., Hall, P., Gaddy-kurten, D., Richards, J., Hormonal Regulation, Tissue Distribution, and Content of Aromatase Cytochrome P450 Messenger Ribonucleic Acid and Enzyme in Rat Ovarian Follicles and Corpora Lutea: Relationship to Estradiol Biosynthesis. *Endocrinology* 122: 1426-1436, 1998.

³⁹ Fitzpatrick, S., Carlone, D., Robker, R., Richards J. Expression of Aromatase in the Ovary: Down-Regulation of mRNA by the Ovulatory Luteinizing Hormone Surge. *Steroids* 62:197-206, 1997.

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa aprobó la presente tesis el día 27 de Abril del 2001.



M. en C. Joaquín Herrera Muñoz



Dr. Pablo Damian Matsumura



Dr. Carlos M. Timossi Baldi



Dr. Efrain Mercado Pichardo
