

00346



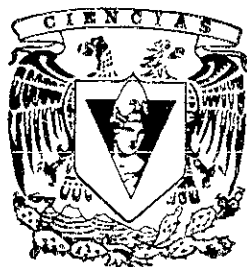
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTICIPACION DE LOS SEGUNDOS MENSAJEROS EN LA
DIVISION CELULAR, INDUCIDA POR LA HORMONA FOLICULO
ESTIMULANTE (FSH) EN GONADAS EMBRIONARIAS DE
AVES CON 13 DIAS DE DESARROLLO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR)
P R E S E N T A:
BIOL. LILIA SOLIS ARRIETA



DIRECTOR DE TESIS: DR. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RECONOCIMIENTOS.

El presente trabajo fue realizado en el Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, U.N.A.M., bajo la dirección del Dr. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ. El proyecto fue financiado parcialmente por PAPIIT-U.N.A.M. (IN224598) y CONACYT 27755-N.

AGRADECIMIENTOS.

A mi asesor de tesis el Dr. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ, por el apoyo brindado para la realización de este trabajo y por haberme dado la oportunidad de formarme profesionalmente en su laboratorio, así como por su paciencia y consejos.

A los miembros que forman parte de mi jurado:

Dr. PEDRO NICOLAS VELAZQUEZ.
Dr. EDGAR ARTURO ZENTENO GALINDO.
Dra. MARCELA ESPERANZA AGUILAR MORALES.
Dr. RENE de JESUS CARDENAS VAZQUEZ.
Dra. MARTHA ROMANO PARDO.
Dr. MARCO ANTONIO JUAREZ OROPEZA.
Dra. MARIA ELENA CALDERON SEGURA.

Por la revisión del manuscrito y las útiles aportaciones que permitieron mejorar este trabajo.

En especial al Dr. EDGAR ARTURO ZENTENO, por formar parte del Comité Tutorial y por su apoyo económico para la realización del trabajo experimental.

Al Dr. ENRIQUE PEDERNERA, por formar parte del Comité Tutorial.

Al Pasante de Biología GUILLERMO ESPINOSA VILLANUEVA, por su colaboración para el procesamiento del tejido para microscopia óptica

AGRADECIMIENTOS.

ESTE TRABAJO REPRESENTA EL FIN DE UNA ETAPA MUY IMPORTANTE DE MI VIDA, Y SE LOS DEDICO A MIS PADRES ADAN Y CRISTINA POR QUE GRACIAS A ELLOS HE PODIDO LLEGAR HASTA ESTE MOMENTO. ADEMAS QUIERO QUE SEPAN QUE EL OBJETIVO LOGRADO TAMBIEN ES SUYO Y QUE LA FUERZA QUE ME AYUDO A CONSEGUIRLO FUE SU APOYO.

A MIS HERMANOS GUADALUPE, IRMA, CARLOS, JESUS Y HECTOR POR SU GRAN CARIÑO Y APOYO DE SIEMPRE. ASI COMO A LA MEMORIA DE MI HERMANO ALBERTO.

A MIS AMIGAS DE SIEMPRE: JAINA, CLARA, MARY, GABY, ELIA, ANGELICA, DOLORES Y ALE.

A MIS COMPAÑERAS DEL LABORATORIO POR SU APOYO Y COLABORACIÓN: IRMA Y ROSARIO.

A ELLOS EN ESPECIAL.

I N D I C E.

RESUMEN	Página
I.-INTRODUCCION.....	1
A.- Diferenciación del ovario	
B.- Diferenciación del testículo	
C.- Síntesis de hormonas esteroides durante el desarrollo gonadal	
D.-Vía de señalización intracelular de la Proteína Cinasa A (PKA)	
E.-Vía de señalización intracelular de la Proteína Cinasa C (PKC)	
F.-Vía de señalización intracelular de la Proteína Tirosina Cinasa (PTK)	
G.- Funciones de la FSH durante el desarrollo embrionario	
II.-PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
III.-OBJETIVOS.....	27
IV.-MATERIALES Y METODOS.....	28
V.-RESULTADOS.....	32
VI.-DISCUSION.....	44
VII.-CONCLUSIONES.....	51
VIII.-BIBLIOGRAFIA.....	52
APENDICE.....	59

RESUMEN.

En el presente trabajo se determinó la participación de los segundos mensajeros o sus análogos en la respuesta proliferativa inducida por la hFSH en gónadas de aves con 13 días de desarrollo embrionario. Para ello se realizaron cultivos primarios de células de ovario izquierdo, ovario derecho y testículo de embriones de pollo. Las gónadas fueron disociadas con tripsina (0.025%) contadas y sembradas (500,000 células) sobre membranas de policarbonato flotando en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco, adicionado con db-AMPc (1 mM), genisteína (20 μ M), forskolín (0.2 μ M), PMA (61.7 ng/ml) y las combinaciones de estos fármacos con hFSH (0.5 UI/ml). A todos los grupos se les agregó 0.1 μ Ci de 3 H-Timidina. El agregado celular fue incubado durante 60 horas en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire, y la proliferación celular fue valorada cuantificando la timidina incorporada a los cultivos celulares.

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que las células de ovario izquierdo solo responden a la genisteína con un incremento de 38% en relación al grupo testigo. Sin embargo las mezclas del PMA con hFSH, incrementan el fenómeno proliferativo un 32% en relación al grupo control. En las células de ovario derecho la incorporación de timidina no incrementó con ninguna de las sustancias empleadas (db-AMPc, genisteína, forskolín o PMA). Al realizar las combinaciones de estas sustancias con la hFSH la respuesta proliferativa incrementó con genisteína, PMA y forskolín, un 31%, 38% y 57% respectivamente. Sin embargo, las células testiculares no respondieron a ninguno de estos fármacos. En una segunda serie de experimentos diseñados para determinar si la genisteína en el ovario izquierdo estimula la proliferación celular por unirse al receptor de 17 β -estradiol, o lo hace al inhibir la fosforilación de tirosinas cinasas, se emplearon inhibidores específicos de estas enzimas como son herbimicina A (900 nM), lavendustina A (150 μ M) y tirfostín 23 (50 μ M). En las células de ovario izquierdo de los tres inhibidores, la lavendustina A y el tirfostín 23 estimularon la división celular un 33% y 29% en relación al grupo testigo. Las combinaciones de las sustancias con la hFSH se incrementaron con los dos fármacos, siendo mayor la respuesta con lavendustina A (70%). En el ovario derecho ninguna sustancia aumentó la incorporación de timidina, pero la mezcla de lavendustina A con hFSH incrementó el estímulo proliferativo 34% y en el testículo solo la herbimicina A aumentó la división celular (40%). Con estos resultados se puede concluir que las células del ovario derecho no responden a estímulos que incrementen la replicación del DNA, debido a la atrofia del órgano. En cambio en las células del ovario izquierdo, la proliferación celular no esta regulada por las vías intracelulares de la proteína cinasa A y proteína cinasas C, pero si por la inhibición de las proteínas tirosinas cinasas. En el caso del testículo, solo la herbimicina A induce la división celular, por lo que solo alguna isoforma de las proteínas tirosinas cinasas participan modulando la proliferación celular en esta gónada.

INTRODUCCION.

DESARROLLO DEL OVARIO.

En las aves hay un desarrollo unilateral del ovario y del oviducto, en donde el ovario izquierdo continúa su crecimiento y se convierte en el ovario funcional; en cambio el ovario derecho crece hasta el día 9 de desarrollo embrionario y posteriormente inicia un proceso de regresión para convertirse en un rudimento no funcional en el nacimiento (Gilbert, 1971; Teng y Teng, 1977; Ukeshida y Fujimoto, 1991; Nakabayashi y cols, 1998).

Los mecanismos por los cuales ocurre la regresión del ovario derecho no se han definido, pero se atribuye una distribución asimétrica de las células germinales primordiales (CGP), por lo que hay una mayor cantidad de CGP en el ovario izquierdo a partir del tercer día de incubación (Jones, 1978). Se ha demostrado también que la expresión de la enzima citocromo P450 aromatasa se encuentra en la médula del ovario derecho e izquierdo, sin embargo el gen que codifica el receptor de 17β -estradiol se expresa solo en el epitelio germinal, el cual formará la corteza gonadal. En la gónada derecha se produce 17β -estradiol pero al no encontrarse receptores en la porción cortical la gónada no recibe estímulo hormonal y como consecuencia no prolifera esta región (Nakabayashi y cols, 1998).

El ovario derecho a los 13 días de desarrollo embrionario, muestra en su superficie un epitelio germinativo. Debajo de este se encuentra la médula, constituida por cordones de células esteroideogénicas, que se caracterizan por presentar abundantes gotas de lípidos en su citoplasma. Los ovocitos forman nidos dentro de la médula y algunos de ellos se encuentran alrededor de esta, sin formar la corteza gonadal. Además se encuentran los conductos lacunares, los cuales están rodeados de una capa de células epiteliales cúbicas (Fig. 1).

A diferencia del ovario derecho, el ovario izquierdo sigue su desarrollo normal, debido al crecimiento del tejido epitelial, acompañado por un incremento

del estroma y de la vascularización. Conforme avanza el desarrollo su disposición va cambiando hasta presentar dos regiones topográficas bien definidas la corteza y la médula, separadas por tejido conectivo. A los 13 días del desarrollo embrionario la corteza muestra nidos de ovocitos primarios los cuales muestran división celular, rodeados por pequeñas células que pueden ser células prefoliculares (Fig. 2).

En la porción medular hay cordones de células indiferenciadas y cordones de células esteroideogénicas (Fig. 2). Las células indiferenciadas tienen como función secretar 17β -estradiol y son las células que responden al estímulo proliferativo ante la presencia de la hormona folículo estimulante humana (hFSH) a los 18 días de incubación (Alvarez-Fernández, 1994; Velázquez y cols. 1997). En relación a las células esteroideogénicas, no forman cordones celulares y no muestran las características típicas de células secretoras de estrógenos, ya que presentan pocas gotas de lípidos en su citoplasma. En la porción más interna de la médula se encuentran los conductos lacunares rodeados de una sola capa de células epiteliales que van de cúbicas a cilíndricas. Además hay una mayor cantidad de vasos sanguíneos en comparación a la región cortical (Fig. 2).

En el nacimiento las células esteroideogénicas intersticiales se caracterizan por formar islotes de tamaño variable y forma irregular, su citoplasma presenta mitocondrias con crestas tubulares, retículo endoplasmático liso (REL) y abundantes gotas de lípidos en su citoplasma. Además se encuentran rodeadas por una lámina basal discontinua, que puede ser reemplazada por fibras de colágena y prolongaciones de fibroblastos.

Los cordones formados por las células pobremente diferenciadas, se encuentran rodeados por una lámina basal continua. Estas células tienen poco citoplasma, una forma redonda u ovoide con organelos principalmente polirribosomas y cisternas de retículo endoplasmático rugoso (RER).

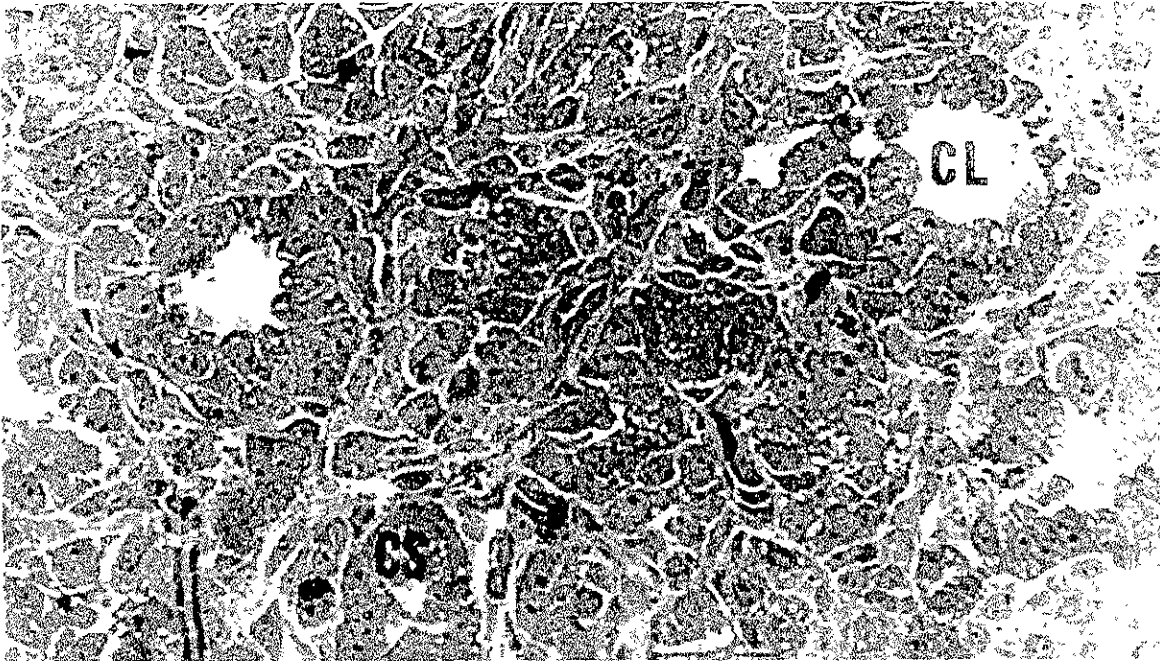


Fig 1. A Corte semifino de ovario derecho con 13 días de desarrollo embrionario, donde se observa la porción medular constituida por cordones de células esteroidogénicas(CS) y conductos lacunares (CL). 400 x

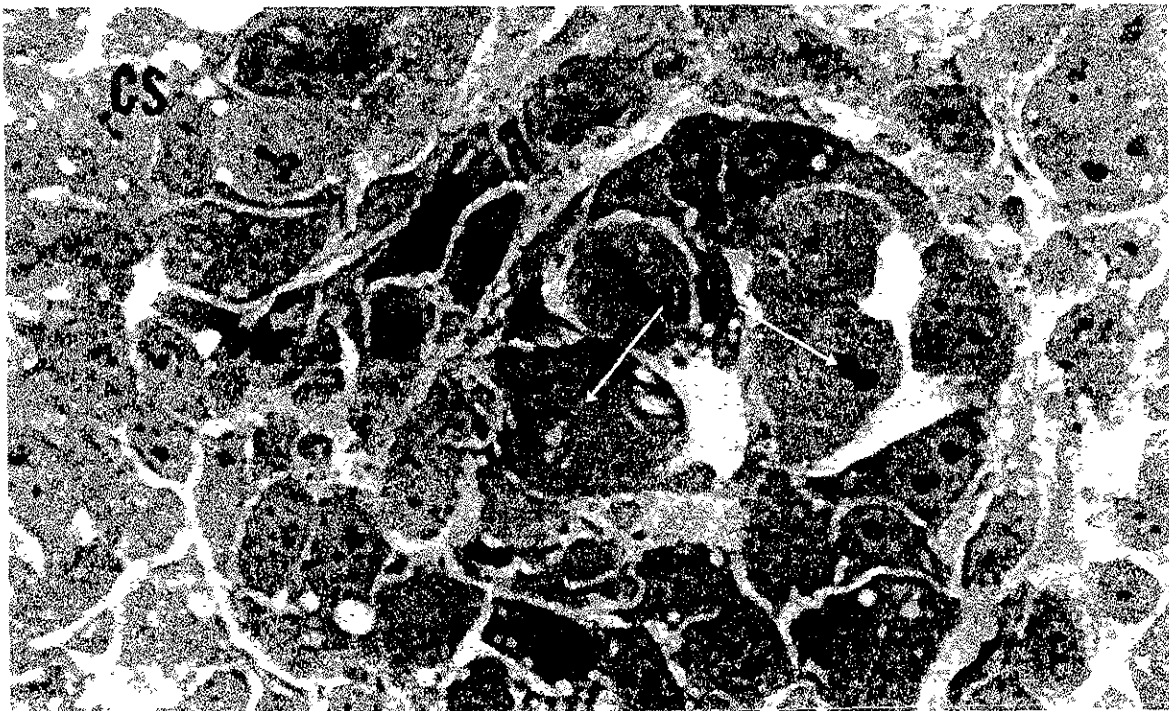


Fig. 1. B Corte semifino a mayor aumento de la porción medular con nidos de células esteroidogénicas y ovogonias (OV). 1000 x

El núcleo presenta eucromatina y un nucléolo prominente. Otra estructura epitelial observada, es el sistema lacunar rodeado de una lámina basal continua. Los organelos citoplasmáticos y las características nucleares de estas células son similares a las células pobremente diferenciadas (González del Pliego y cols, 1988). Las estructuras epiteliales no se encuentran distribuidas uniformemente en la médula ovárica. En la médula subcortical se localizan cordones de células poco diferenciadas, pequeños islotes de células esteroideogénicas y algunos canales lacunares. Mientras que en la médula interna se observan un mayor número de cordones de células esteroideogénicas y de canales lacunares, por lo tanto los cordones de células poco diferenciadas no se localizan en la médula profunda (González del Pliego y cols, 1988).

DESARROLLO DEL TESTICULO.

El primer evento que lleva a la diferenciación testicular parece ser la unión de las células germinales a las células somáticas (las futuras células de Sertoli) para formar los túbulos seminíferos. Sin embargo, diferentes experimentos donde se inducen mutaciones e irradiaciones de las células germinales primordiales indican que las células germinales no son necesarias para iniciar este proceso (Kretser y Kerr, 1988).

El epitelio celómico comienza a proliferar, la porción medular se desarrolla y lo que corresponde a la corteza se transforma en la túnica albugínea (Kofman- Alfaro y cols, 1982). Los cordones sexuales se separan del epitelio celómico por los arreglos producidos del mesénquima y de los vasos sanguíneos que inducen la compactación de los cordones testiculares. El traslado de los cordones sexuales a la región medular de la gónada es un movimiento morfogénico que implica cambios en la adhesividad de las células epiteliales y un depósito activo de las moléculas que forman la lámina basal

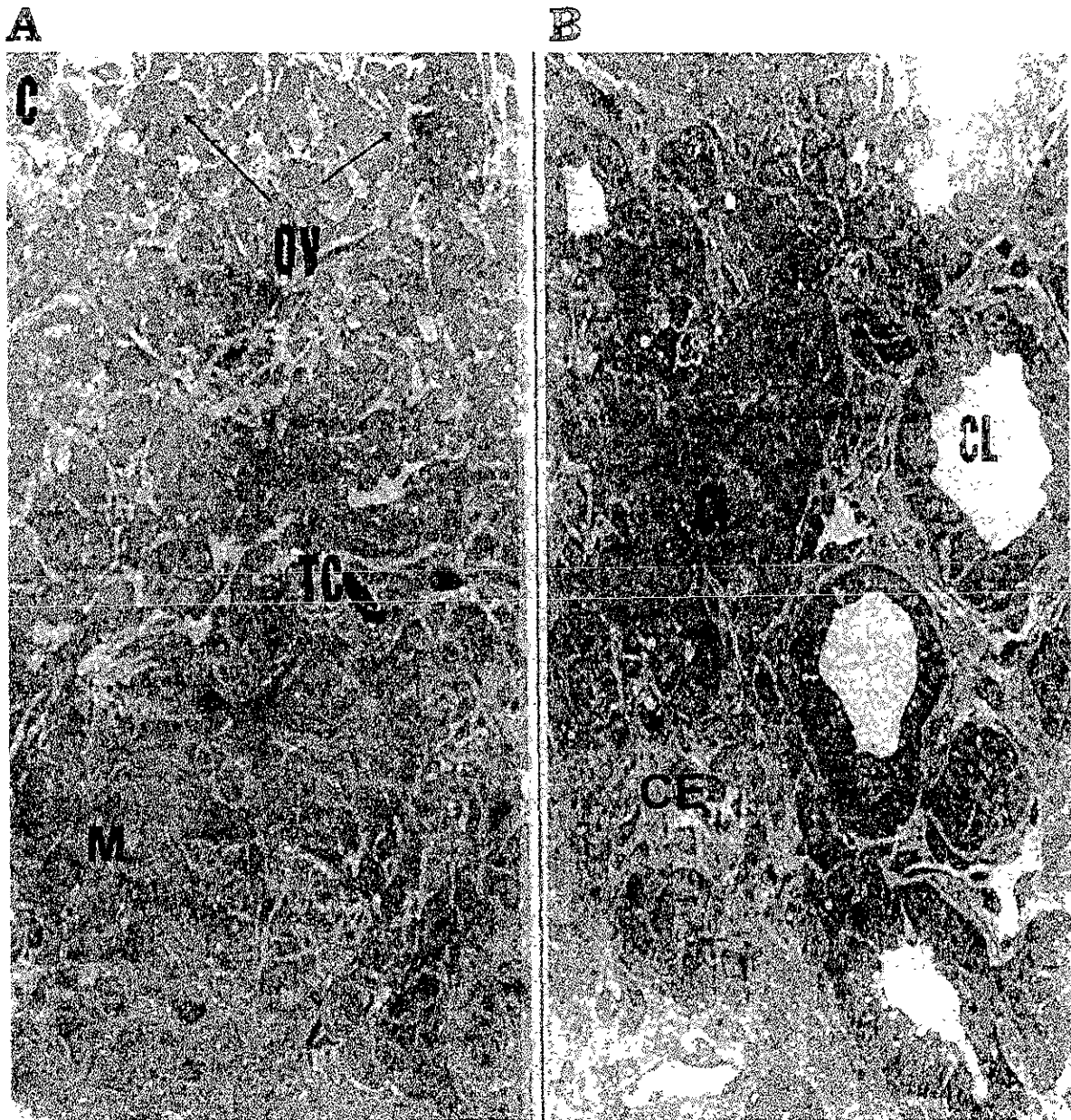


Fig. 2. A.- Corte semifino de ovario izquierdo con 13 días de incubación, donde se observan dos regiones la cortical y medular, separadas por tejido conectivo. La porción cortical (C) esta constituida de ovocitos (OV) y células prefoliculares.

B.- En la médula (M) hay nidos de células poco indiferenciadas (CI) y cordones de células esteroidogénicas (CE) con conductos lacunares (CL). 400x

(laminina y colágena principalmente) (Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, 1997).

Alrededor de los cordones testiculares se establecen las células peritubulares, de origen mesonéfrico, que se aplanan en forma paralela a la lámina basal, las cuales están en contacto con la superficie basal de las células de Sertoli. Ultraestructuralmente se caracterizan por tener retículo endoplasmático rugoso (RER) muy desarrollado y en el espacio extracelular adyacente a estas, material fibrilar como colágena y fibronectina. Las células peritubulares tienen como función proporcionar la integridad estructural de los túbulos, secretar proteínas que regulan algunas funciones de las células de Sertoli y sintetizan la matriz extracelular (colágena tipo I, proteoglicanos y fibronectina), junto con las células de Sertoli (Skynner, 1991, Merchant-Larios y cols, 1993; Saez, 1994; Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, 1997).

Las células del epitelio interno, denominadas células de Sertoli, se encuentran dentro de los cordones testiculares, su origen no se conoce sin embargo Witschi (1951) propone que derivan del mesonefros. En el testículo embrionario de rata estas células presentan un núcleo con muy poca heterocromatina en comparación a otras células somáticas, por lo cual contienen primariamente eucromatina, poseen abundantes poliribosomas, aparato de Golgi que carece de un número apreciable de vesículas o vacuolas condensadas asociadas con la síntesis de proteínas y una cantidad limitada de RER. Lo cual indica que las proteínas producidas son secretadas después de su síntesis. Presentan una forma columnar con extensiones citoplasmáticas en la porción apical y lateral. Otra característica de ellas es que forman la barrera hemato-testicular, por uniones ocluyentes entre las Proyecciones ubicadas en la región basal de las células de Sertoli.

Funcionan como células de soporte para las células germinales y sintetizan la hormona antimulleriana (HAM) que induce la regresión de los conductos de Müller evitando que se formen las

trompas de falopio, útero y la porción superior de la vagina (Gilbert, 1971; Moreno-Mendoza y Merchant-Larios, 1997). Estas células solo proliferan durante la vida fetal y neonatal, al iniciarse la espermatogénesis la mitosis se detiene (Orth, 1982, 1984; Kretser y Kerr, 1988). Tienen como función sintetizar estrógenos en el testículo inmaduro, sin embargo son incapaces de sintetizar andrógenos para aromatizarlos y liberarlos. La actividad de la enzima aromatasa es dependiente de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la edad del animal, ya que las células aisladas de ratas de 10 a 20 días de desarrollo embrionario producen 17β -estradiol con testosterona (T) exógena, sin embargo a los 30 días las células pierden la capacidad de sintetizar estrógenos en la presencia o ausencia de FSH o dibutilil AMPc (Orth, 1984; Dorrington y cols, 1993).

Alrededor de los cordones testiculares las células del estroma se diferencian para formar las células peritubulares, antes mencionadas, fibroblastos, endotelios y células de Leydig (Merchant- Larios, 1975; Kretser y Kerr, 1988). De estos tipos celulares las células productoras de esteroides en el testículo son las células de Leydig, que aparecen en el intersticio después del establecimiento de los cordones seminíferos. Su origen no ha sido aclarado, ya que algunos autores proponen que derivan del mesenquima (humanos y cerdos) o del mesonefros (conejos, humanos, ratones y ovejas) (Kretser y Kerr, 1988). Estas células solo proliferan durante etapas tempranas del desarrollo gonadal probablemente por diferenciación de las células del estroma (Saez, 1994). Sus funciones son reguladas por la hormona luteinizante (LH), que estimula la síntesis y secreción de andrógenos. Las células de Leydig presentan características morfológicas de células productoras de esteroides como son: abundante retículo endoplasmático liso (REL), mitocondrias con crestas tubulares e inclusiones lipídicas. Una vez diferenciadas presentan alta actividad de 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HDS) y fosfatasa alcalina en la membrana plasmática (Kretser y Kerr, 1988).

TESTICULO EMBRIONARIO DE AVES.

El testículo de embión de pollo con 13 días de incubación, esta rodeado por un epitelio celómico de tipo cúbico, debajo de este se encuentran los cordones testiculares constituidos por dos tipos celulares, las células de Sertoli y las espermatogonias. Las espermatogonias se caracterizan por ser grandes, redondas, de citoplasma claro, núcleo esférico y cromatina laxa. Las células de Sertoli, las cuales ocupan la mayor parte del cordón, presentan una forma irregular y un núcleo de cromatina laxa con varios nucleólos. La periferia de los cordones testiculares, esta rodeada por las células peritubulares cuya forma es alargada con un núcleo de cromatina laxa y uno o varios nucleólos. En el intersticio hay tejido conectivo laxo con fibroblastos, células de Leydig y algunos vasos sanguíneos. Las células de Leydig forman grupos de células, las cuales presentan un núcleo excéntrico con uno o más nucleólos y un citoplasma vacuolado eosinófilo, con pocas inclusiones lipídicas en el citoplasma (Fig. 3).

SINTESIS DE HORMONAS ESTEROIDES DURANTE EL DESARROLLO GONADAL.

Las funciones de las gónadas, masculina y femenina, son la producción de hormonas y de gametos viables para la fecundación. Ambas funciones son reguladas, por hormonas producidas por las propias gónadas y la hipófisis. Dentro de las hormonas sexuales sintetizadas por el ovario y testículo, se encuentran los estrógenos (17β -estradiol, estrona), andrógenos (testosterona, androstenediona) y progestágenos (progesterona, pregnenolona).

Estas hormonas son producidas por las gónadas de las aves desde etapas muy tempranas del desarrollo embrionario, ya que se les atribuye la diferenciación morfológica en hembras o machos, dependiendo de la región que proliferen (cortical o medular) en la gónada indiferenciada (Nakabayashi y cols, 1998). En los animales jóvenes determinan la expresión de los caracteres sexuales secundarios, así como el color de las plumas, la cresta, el depósito de

grasa corporal, el desarrollo de órganos accesorios y la conducta sexual (Sturky y Opel, 1976).

Por inmunofluorescencia e histoquímica se ha observado que los andrógenos como los estrógenos, son sintetizados a partir de los 3.5 días de desarrollo embrionario en las células intersticiales de la médula gonadal, lo cual indica que una diferenciación funcional precede a la diferenciación morfológica (Woods y Podczaski, 1974; Woods y Erton, 1978; Tanabe y cols, 1986).

El ovario izquierdo entre los días 7.5 y 18 de desarrollo embrionario produce principalmente 17β -estradiol y estrona (E_1). Los niveles de E_1 en plasma alcanzan un valor máximo en el día 13.5 de incubación y permanecen estables hasta el día 17.5 de desarrollo, mientras que la concentración de 17β -estradiol se incrementa gradualmente con la edad embrionaria (Woods y Brazzil, 1981). El ovario derecho al igual que el izquierdo, sintetiza 17β -estradiol y estrona, pero debido al proceso de involución presenta un pico de secreción a los 5.5 días de desarrollo y a los 13.5 días los niveles ya no son detectables. En cambio en el testículo entre los días 7.5 y 18 de incubación el testículo secreta al medio de cultivo progesterona, testosterona (T), dehidroepiandrosterona (DHEA), dehidrotestosterona (DHT) y estrona (E_1) (Guichard y cols, 1977; Woods y Erton, 1978).

También se han determinado las enzimas esteroideogénicas, con precursores radioactivos, en el ovario izquierdo y el testículo con 9 y 15 días de incubación. Se ha demostrado que la actividad de la enzima 3β hidroxisteroide deshidrogenasa (3β -HDS) es igual en ambos sexos. Sin embargo la actividad de las enzimas 17α -hidroxilasa, C-17, C-20 liasa y la aromatasa, es mayor en el ovario izquierdo durante todas las etapas embrionarias estudiadas. En el testículo la actividad de las enzimas 17α -hidroxilasa y C-17, C-20 liasa incrementa entre los días 13 y 15, además la ruta de biosíntesis de andrógenos

se efectúa por la vía Δ^5 o Δ^4 , dependiendo del sustrato pregnenolona o progesterona (Nakamura y Tanabe, 1972; Imataka y cols, 1988).

La síntesis de estas hormonas es autónoma en las primeras etapas del desarrollo embrionario, ya que al realizar una hipofisectomía las células gonadales se desarrollan de manera normal hasta el día 13. Después de esta fecha se reduce el peso gonadal y la actividad esteroideogénica disminuye, por lo que se concluye que a partir de este momento las hormonas gonadotropas (FSH y LH) son necesarias para la síntesis de hormonas esteroideas, estableciéndose así el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Woods y Weeks, 1969; Woods y Erton, 1978).

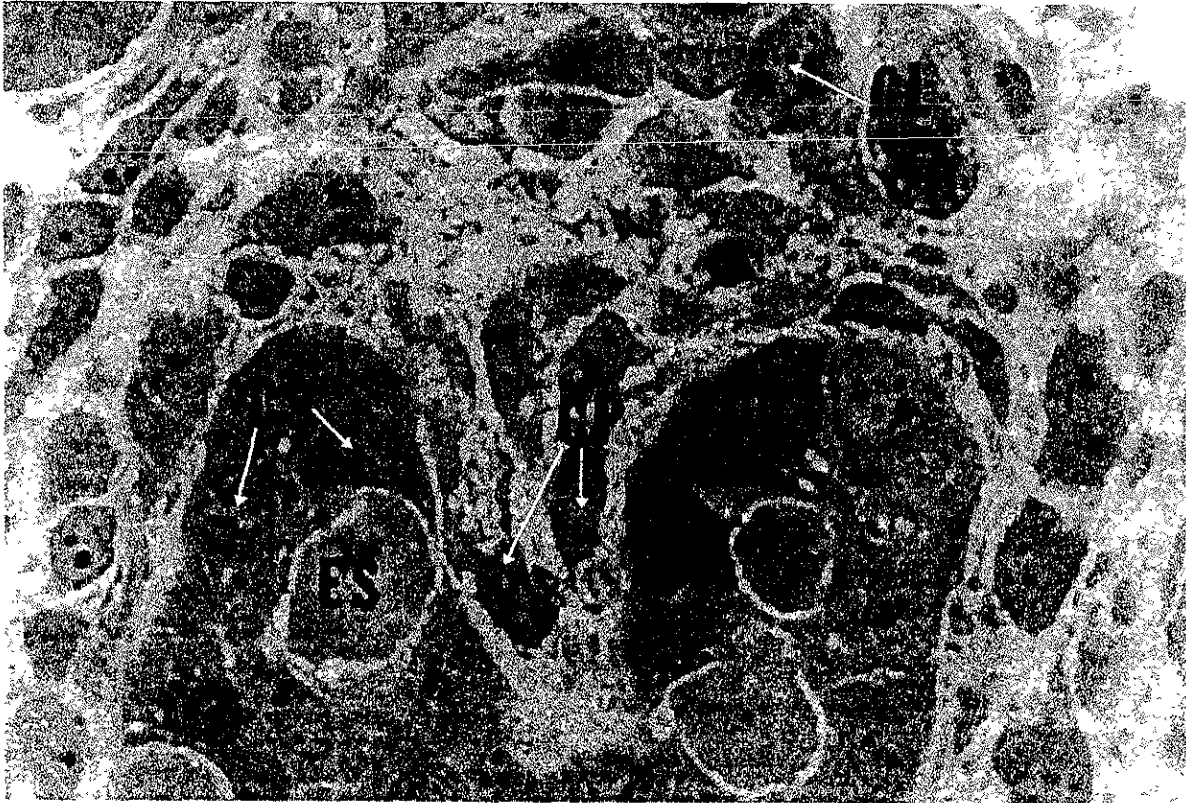


Fig. 3 Corte Semifino de testículo con 13 días de desarrollo embrionario, que muestra cordones testiculares constituidos por células de Sertoli (CS) y espermatogonias (ES). En la periferia de los cordones testiculares se localizan células peritubulares (CP) y en el tejido intersticial, grupos de células de Leydig (CL) con pocas inclusiones lipídicas. 1000 x

VIAS DE SEÑALIZACION INTRACELULAR.

Las células de los eucariontes son entidades altamente organizadas que poseen la capacidad de recibir y procesar la información presente en su micro ambiente. El flujo de información y la selectividad de la misma se debe a receptores localizados en sus células blanco. Cuando el mensaje primario es una sustancia hidrosoluble no puede atravesar la fase hidrofóbica de la membrana plasmática y en consecuencia la información debe ser traducida al interior de la célula. Esto se obtiene debido a las propiedades de los receptores, los cuales actúan como los traductores de la señal extracelular, uniendo el mensajero extracelular, y convirtiendo este fenómeno en una o más señales intracelulares que modifican la función de la célula.

A pesar de la gran diversidad de mensajeros extracelulares, las vías de señalización intracelular conocidas son muy pocas, entre ellas se encuentran la vía de activación de la proteína cinasa A (PKA), la vía de la proteína cinasa C (PKC) y la vía de las proteínas tirosinas cinasas (PTK) las cuales fosforilan a los aminoácidos serina, treonina y tirosina respectivamente, para producir una respuesta celular (Lewin, 1994; Soria y Arias, 1997).

VIA DE SEÑALIZACION INTRACELULAR DE LA PROTEINA CINASA A (PKA).

Los receptores acoplados a proteínas G son activados por diferentes ligandos (hormonas y factores de crecimiento entre otros), pero todos ellos poseen características comunes. Los receptores son proteínas que se encuentran constituidas por 450 - 600 aminoácidos, con un peso molecular de 40 000 a 50 000 daltons. Cada uno de ellos presenta siete dominios transmembranales de 20 a 25 aminoácidos cada uno (helices I - VII), lo que da lugar a la existencia de 3 asas intracelulares (i1-i3) y a tres asas extracelulares (e1-e3) (Bockaert, 1991; Hepler y Gilman, 1992).

PROTEINAS G

El receptor hormonal no interactúa directamente con el amplificador (adenilato ciclasa), lo hace indirectamente vía transductores, las proteínas G (Hepler y Gilman, 1992). Las proteínas G forman una familia de proteínas triméricas, constituidas cada una por una subunidad α (contiene el sitio de unión para el guanosín trifosfato y la actividad de GTPasa) y un complejo formado por las subunidad β y γ , fuertemente unidas entre sí y solo pueden ser separadas bajo condiciones desnaturalizantes. Se encuentran asociadas a la membrana citoplasmática a través del complejo $\beta\gamma$ o mediante ácidos grasos unidos covalentemente al extremo amino de ciertas subunidades (Alberts y cols, 1994; Lewin, 1994; Soria y Arias, 1997).

Hasta hace poco se consideraba que la subunidad α era la única responsable de la acción de las proteínas G. Sin embargo evidencias experimentales indican que el dímero $\beta\gamma$ tienen una función relevante en la transducción de señales. Entre los sistemas efectores sobre los que el dímero $\beta\gamma$ actúa se encuentran: el canal de K^+ presente en tejidos cardíacos, es activado por receptores muscarínicos, la adenilato ciclasa, la fosfolipasa C β (PLC β), la fosfolipasa A_2 (PLA₂) o bien puede actuar por medio de la proteína Ras y activar a la proteína activadora de mitógenos (MAP) (Clapham y Neer, 1993; Neer, 1995; Soria y Arias, 1997).

En la vía de la PKA participan dos tipos de proteínas G, una estimuladora (Gs) y otra inhibidora (Gi). Cada una de ellas presenta un ciclo de activación, en el cual el GDP (guanosín difosfato) que está unido a la subunidad α es sustituido por guanosín trifosfato (GTP), lo que induce a Gs a una nueva conformación, que a su vez le permite activar la adenilato ciclasa (AC) y provocar la formación de AMPc (Fig. 4). La actividad del complejo Gs-GTP termina con la hidrólisis del GTP en GDP, lo que constituye la reacción de cierre. La enzima GTPasa cataliza esa hidrólisis. La actividad de la GTPasa se inhibe ante la toxina

producida por el bacilo del cólera *Vibrio cholerae*, la cual prolonga la vida del complejo Gs-GTP de modo que la célula produce AMPcíclico sin cesar, incluso en la ausencia de una señal externa que induzca su producción. El otro tipo de proteína G actúa de mediador en una transducción de tipo inhibitor, la cual es activada igual que la Gs, pero inhibe a la adenilato ciclasa (Alberts y cols, 1994; Lewin, 1994).

ACTIVACION DEL AMPc.

En el siguiente paso de la señalización, la proteína G activa a la adenilato ciclasa (AC), una proteína transmembranal que se compone de dos dominios de seis regiones transmembranales cada uno, con los extremos amino y carboxilo en el interior de la célula.

Se han demostrado la existencia de ocho tipos, de los cuales la AC-I se localiza solo en tejidos neurales, el tipo II en el pulmón, el tipo III se encuentra en mayor abundancia en el epitelio olfatorio y en menor densidad en otros tejidos. El tipo IV en el cerebro. Los tipos V y VI se encuentran en casi todos los tejidos. Los tipos VII y VIII han sido aislados de células de linfoma de ratón y de cerebro humano (Lyengar, 1993).

Su función es catalizar la conversión de moléculas de ATP en AMPc. Esto puede ocurrir a una elevada velocidad debido a la caída de energía libre que tiene lugar cuando el ATP rico en energía es convertido en AMPc. Por lo tanto, una molécula de hormona unida a un receptor por un breve periodo de tiempo puede determinar la generación de cientos de moléculas de AMPc (Fig. 4). Una vez formado el AMPc es rápida y continuamente destruido por una o más fosfodiesterasas, que lo convierten a 5-AMP (Alberts y cols, 1994).

Los diversos efectos del AMPc son mediados por la proteína cinasa A (PKA), la cual modifica la actividad de enzimas específicas en diferentes tipos celulares. La proteína cinasa transfiere un fosfato al grupo hidroxilo de los

residuos serina y treonina. La unión de dichos grupos fosfato regula la función de las proteínas blanco, los cuales pueden ser canales iónicos y enzimas reguladoras de la expresión de genes entre otras.

La PKA dependiente de AMPc es un tetrámero, constituido de dos subunidades catalíticas (C) y dos reguladoras (R). La unión del AMPc a la subunidad R causa que se disocie de la subunidad C, la cual puede fosforilar proteínas específicas o que estas subunidades catalíticas sean translocadas al núcleo donde fosforila a una serie de proteínas nucleares que estimula la transcripción de genes como c-fos (Alberts y cols, 1994).

VIA DE SEÑALIZACION INTRACELULAR DE LA PROTEINA CINASA C (PKC).

En este caso, al igual que en otras vías de señalización intracelular, ocurre la formación del complejo agonista-receptor. Dentro de los agonistas se encuentran: la serotonina, la noradrenalina, la acetilcolina, la oxitocina, la hormona folículo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH), entre otros (Alberts y cols, 1994; Soria y Arias, 1997). Después de esta unión el receptor sufre un cambio conformacional para activar a una proteína G, Gq, que a su vez activa a la enzima fosfolipasa C β (PLC β) y la activación se debe exclusivamente a la subunidad α de la proteína G, para producir la hidrólisis de fosfolípidos (Fig. 5).

El fosfatidilinositol se encuentra en la parte interna de la bicapa lipídica, el cual es convertido a fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP $_2$) un fosfolípido inusual que tiene tres fosfatos en lugar de uno. Los fosfatos adicionales derivan del ATP y son añadidos en la posición 4 y 5 del anillo del inositol (Neer, 1995). La hidrólisis del PIP $_2$ origina al 1,2 diacilglicerol (DAG) un compuesto hidrófobico, que permanece en la membrana plasmática y al inositol 1,4,5-trisfosfato (IP $_3$) una molécula hidrosoluble (Fig. 5). Estos segundos mensajeros

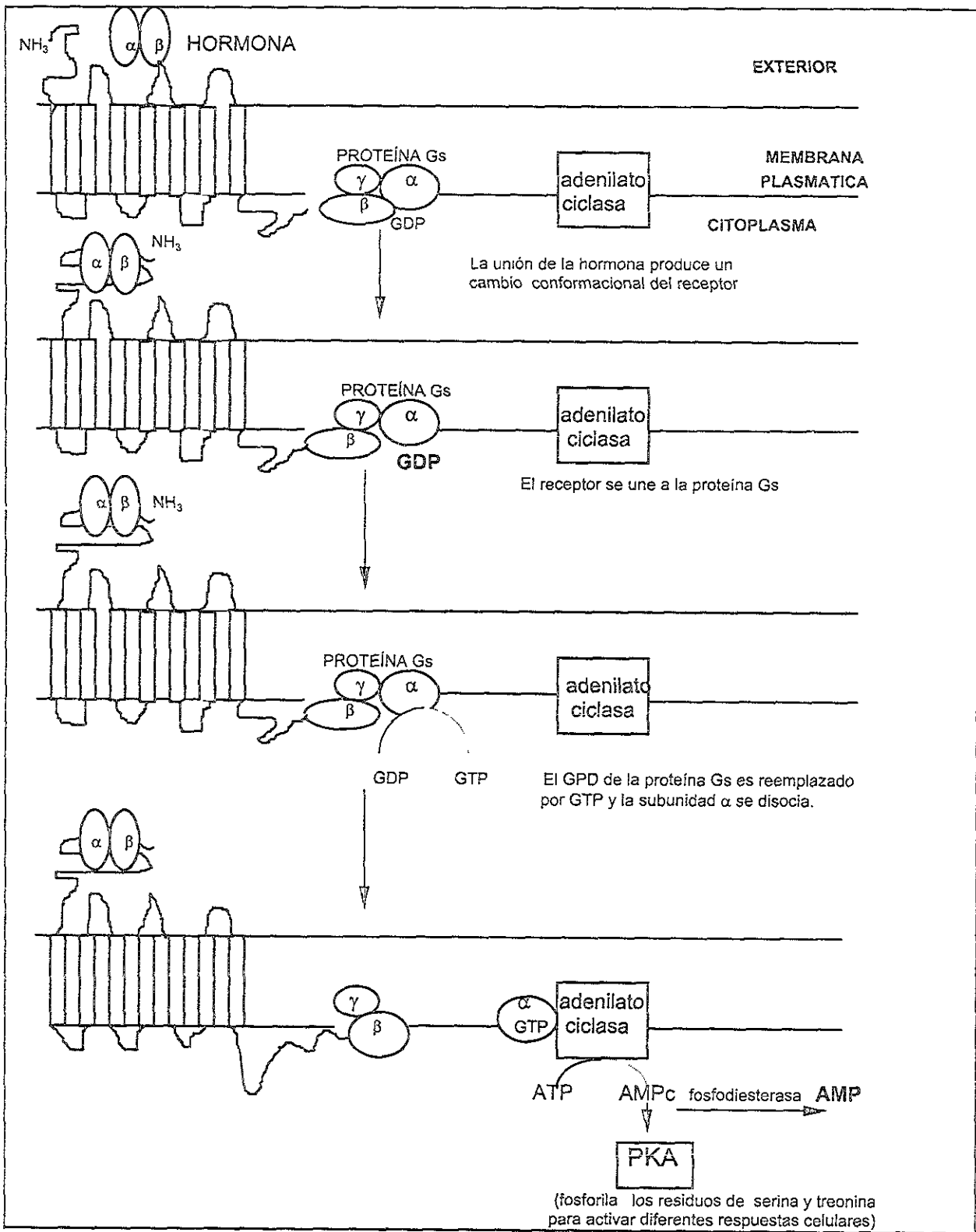


Fig. 4. Resumen de los principales eventos de activación de la vía de señalización intracelular de la PKA (Tomado de Darnell y cols, 1994).

también se producen en respuesta a la activación de los receptores de las vía de las proteínas tirosinas cinasas (PTK) por la acción de la PLC- γ 1 (Berridge, 1993, 1997).

También el DAG, puede ser generado por la hidrólisis de fosfatidilcolina (PC), fosfatidiletanol (PE) e inositol contenido en glicolípidos. Estas reacciones son catalizadas por otras formas de fosfolipasa C (PLC) y fosfolipasa D (PLD).

INOSITOL TRISFOSFATO (IP₃).

El IP₃ difunde al citoplasma y se une a porciones modificadas del retículo endoplasmático, denominado calciosoma en células no musculares, en donde se encuentra su receptor (Fig. 5).

El receptor es un canal iónico formado por cuatro subunidades protéicas cuyos extremos carboxilo forman la pared del canal. Cuando el IP₃ se une a sus receptores estos experimentan un cambio conformacional que origina la apertura del canal. Dado que la concentración de Ca⁺⁺ en reposo corresponde a 100 - 200 nM para el citoplasma y aproximadamente 1 mM para el interior del depósito, la apertura del canal conduce a la salida rápida de iones Ca⁺⁺ a favor del gradiente de concentración (Berridge, 1993, 1997).

ACTIVACION DE LA PROTEINA CINASA C (PKC).

El DAG, permanece asociado a la membrana plasmática, y su principal función es activar una familia de proteínas cinasas en la membrana plasmática, las proteínas cinasas C (PKC) (Fig. 5).

Las PKC están constituidas por una sola cadena polipeptídica cuyo extremo carboxilo corresponde al dominio catalítico, con sitios de unión para el sustrato y para ATP. La otra mitad corresponde al extremo amino, el dominio regulador que contiene sitios de unión para el Ca⁺⁺, Zn⁺⁺, fosfolípidos y DAG / éster de forbol.

La familia de las proteínas Cinasas C (PKC) se subdividen dentro de tres grupos: (1) Los miembros clásicos (α , β y γ) que son dependientes del Ca^{++} y del diacilglicerol, (2) las PKC (δ , ϵ , η y ϕ) dependientes de Ca^{++} pero no de diacilglicerol y (3) las atípicas (ζ) que no son activadas por el Ca^{++} y el diacilglicerol. La activación de la proteína cinasa C requiere la asociación de la enzima con fosfolípidos de la membrana plasmática, en particular la fosfatidilserina (PS). La unión de la PKC y los fosfolípidos es por interacción electrostática, es altamente cooperativa y es aumentada en la presencia de Ca^{++} de una manera dependiente de su concentración. Cuando está completamente activa la PKC forma un complejo cuaternario formado por: fosfolípidos, Ca^{++} , DAG y la enzima (Alberts y cols, 1994; Jun-Ping, 1996).

Hay moléculas homólogas al DAG, que tienen la capacidad de activar a la PKC, un ejemplo de estas son los ésteres de forbol que inducen tumores. El forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) puede sustituir al DAG y activar directamente la PKC *in vitro* e *in vivo*, también parece que incrementa la afinidad de la PKC por el Ca^{++} resultando su completa activación a concentraciones fisiológicas de Ca^{++} . Sin embargo los ésteres de forbol son lentamente metabolizados, por lo que persisten en el tejido por largos periodos de tiempo en comparación al DAG y causan la activación prolongada de la PKC (Jun-Ping, 1996; Berridge, 1997).

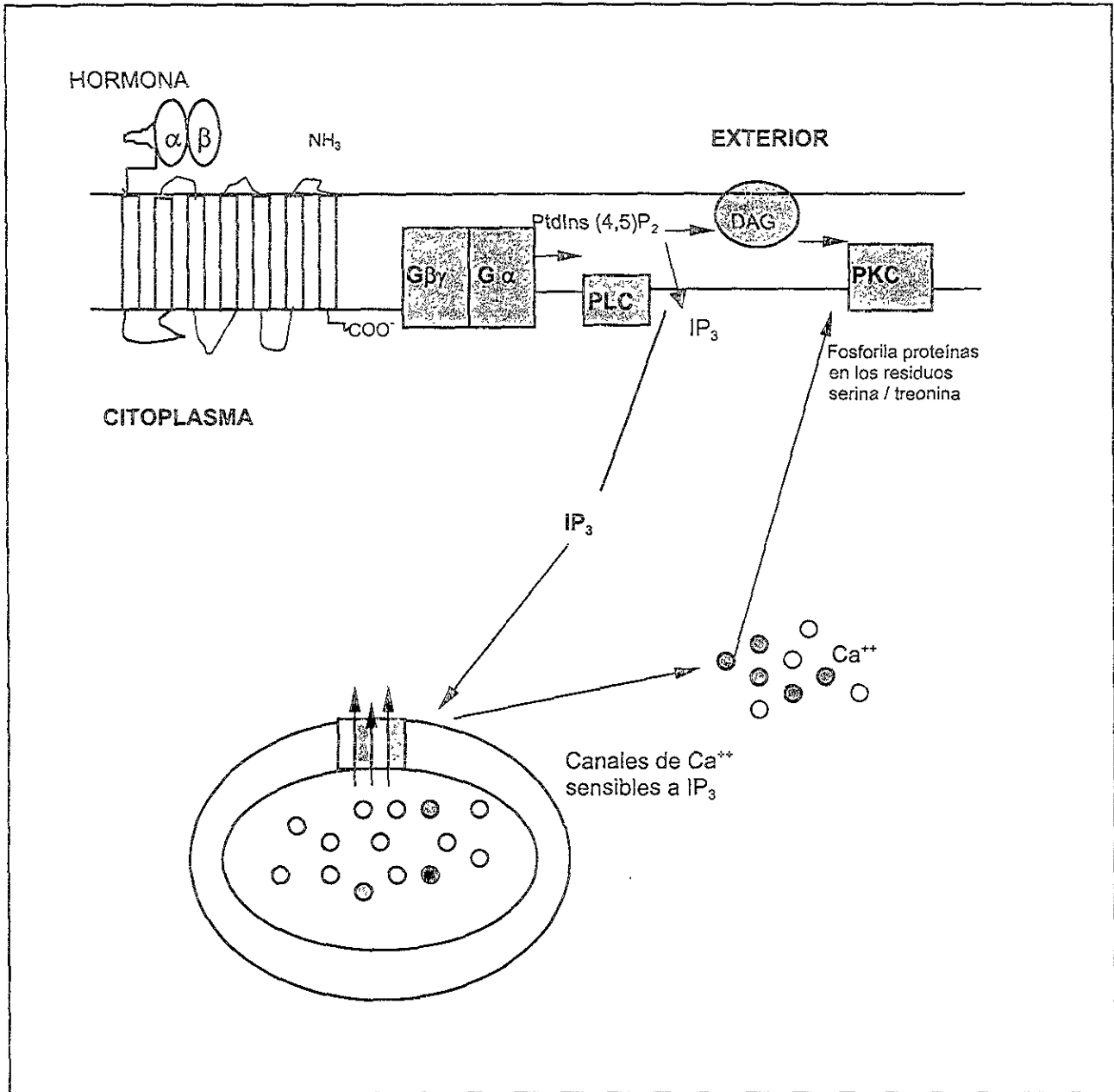


Fig. 5. Vía de señalización intracelular de la proteína cinasa C (PKC). El complejo agonista-receptor activa a la proteína G_q , que estimula a la fosfolipasa C (PLC). La PLC cataliza la hidrólisis del PIP_2 a IP_3 y DAG. El IP_3 sale a citoplasma para inducir la liberación de iones Ca^{++} del retículo endoplasmático, en cambio el DAG permanece en la membrana celular donde activa a la PKC (Tomado de Darnell y cols, 1994).

VIA DE SEÑALIZACION INTRACELULAR DE LAS PROTEINAS TIROSINAS CINASAS (PTK).

Las proteínas tirosinas cinasas (PTK) catalizan la fosforilación de proteínas con residuos de tirosina y se dividen en dos grupos, el primero de ellos se caracteriza por presentar un dominio de unión extracelular al que se unen factores de crecimiento. El segundo grupo de proteínas tirosinas cinasas, no están asociadas a receptores membranales por lo que carecen de un sitio de unión al ligando y su actividad esta asociada a la cara citoplasmática de la membrana plasmática (Hunter y Cooper, 1985; Srivastava, 1990).

PROTEINAS CINASAS ASOCIADAS A RECEPTORES.

Los receptores de tirosinas cinasas (RTK) forman una larga e importante clase de receptores en la superficie celular a los cuales pueden unirse ligandos solubles, hormonas proteicas incluyendo insulina y factores de crecimiento (EGF, PDGF, IGF-I). Todos estos receptores muestran tres regiones, un dominio extracelular con el sitio de unión al ligando, una α -hélice transmembranal constituida por aminoácidos hidrofóbicos, y la parte intracelular que es el dominio catalítico ya que es el sitio de unión del ATP, en donde ocurre la transferencia del γ -fosfato a proteínas que tengan residuos de tirosina, así como a receptores vecinos por medio de la autofosforilación (Panyotou y Waterfield, 1993).

Dentro de la familia de receptores de tirosinas cinasas, hay cuatro subclases las cuales muestran diferencias en sus dominios intra y extracelulares. La primera subclase es del prototipo del receptor del factor de crecimiento fibroblástico (EGF), el cuál se caracteriza por presentar dos regiones ricas en cisteína en la parte externa y una extensión c-terminal en el dominio catalítico el cual tiene los sitios para que ocurra la autofosforilación. La subclase II (receptores para Insulina y el receptor del factor de crecimiento parecido a la insulina tipo -I) presenta una estructura heterotetramérica ($\alpha_2\beta_2$) unida por

puentes disulfuro para formar un receptor dimérico. La tercera subclase es representada por los dos tipos de receptores del factor de crecimiento derivado de las plaquetas (α y β) los cuales en el dominio extracelular presentan 5 estructuras repetidas parecidas a inmunoglobulinas y una región con actividad de tirosina cinasa en el dominio citoplasmático, a la subclase IV pertenece el receptor del factor de crecimiento fibroblástico (FGF), estos muestran las mismas características que los del tercer tipo pero solamente tienen 3 unidades repetidas parecidas a inmunoglobulinas (Ullrich y Schlessinger, 1990; Panyotou y Waterfield, 1993).

ACTIVACION INTRACELULAR DE LAS TIROSINAS CINASAS.

Para que continúe la vía de señalización hay dos tipos de proteínas asociadas con el receptor. (1) La proteína adaptadora Grb2, que acopla la actividad del receptor a otras moléculas de señalización y (2) proteínas que tienen como función fosforilar residuos de tirosina, serina y treonina de diferentes proteínas.

La proteína GRB2 esta constituida por dos dominios, SH2 y el SH3, los cuales no tienen actividad catalítica. El dominio SH2 presenta una secuencia de 100 aminoácidos, tiene como función regular las interacciones receptor - proteína activadora, ya que reconoce secuencias peptídicas que rodean el sitio de fosforilación de las tirosinas. El dominio SH3 es una cadena de 45 aminoácidos, ha sido identificada en una variedad de proteínas asociadas con el citoesqueleto (α -espectrina, miosina) y la membrana plasmática (Koch y cols, 1991), pero unicamente actúa como proteína adaptadora cuando se une a SH2. Por lo tanto SH2 se une al receptor y los dominios SH3 se unen a la proteína SOS, lo cual permite la relocalización de la proteína SOS del citoplasma a la membrana plasmática llevándola cerca de su sustrato, la proteína Ras (Fig. 6).

ACTIVACION DE LA PROTEINA Ras.

La proteína Ras es una GTPasa, por lo tanto cuando Ras se une al guanosín trifosfato (GTP), se activa y forma un complejo con sus moléculas blanco. Las proteínas que controlan la conversión entre el estado activo (GTP) e inactivo (guanosín difosfato, GDP) de esta proteína son:

- La proteína GAP (proteína de activación de la GTPasa) hidroliza el GTP a GDP, por lo tanto actúa como un regulador negativo ya que retorna a Ras de un estado activo a un estado inactivo (Koch y cols, 1991).
- SOS es un factor de liberación del nucleótido de guanina (GNRF) que estimula el reemplazamiento de GDP por GTP. Además SOS es la molécula blanco de Grb2 en respuesta a la fosforilación del receptor de tirosina cinasa.

La reacción de desplazamiento puede ser bloqueada por un inhibidor de la disociación de guanina (GDI), por lo tanto mantiene a la proteína en estado inactivo. La proteína Ras activa, se une al dominio amino terminal de Raf-1 para activarla (Koch y cols, 1991; Lewin, 1994).

ACTIVACION DE LA PROTEINA Raf-1.

La proteína Raf-1 es una proteína citoplasmática con actividad intrínseca de cinasa serina/treonina. Muestra tres regiones CR1, CR2 y CR3, la región CR1 se localiza en la porción NH₃ terminal, la cual es rica en residuos de cisteína y contiene regiones de unión con el Zinc; el CR2 también se localiza en la porción NH₃, con una secuencia de solo 14 residuos principalmente serina/treonina, y el CR3 se encuentra en la porción COOH, el cual presenta la actividad de cinasa (Wood y cols, 1992). Los sitios de fosforilación de estos dominios son la Ser43, Ser259 y Ser62. La Ser43 se encuentra en la región CR-1 tiene como función afectar la interacción de la proteína Raf-1 con Ras

(Morrison, 1995).

La Ser259 es el sitio de fosforilación localizado en la región CR2. al no estar fosforilado induce la maduración meiótica del ovocito de *Xenopus* por lo tanto la fosforilación de este sitio suprime la actividad de la proteína. La Ser621 se localiza al final del dominio CR3, el cual parece ser importante en la conformación estructural del dominio catalítico, sin embargo una mutación en este sitio inactiva la enzima (Morrison, 1995).

EL PAPEL DE Ras PARA ACTIVAR A Raf-1.

La proteína Ras-GTP interactúa con Raf-1, lo cual permite la translocación de Raf-1 a la membrana plasmática. Sin embargo la unión de Ras a Raf-1 no estimula la actividad de la proteína Raf-1, pero parece que incrementa la accesibilidad de esta proteína a su molécula activadora. Los activadores de Raf-1 son varios, entre ellos se encuentra la proteína cinasa C, proteínas serinas/ treoninas aún no identificadas y fosfatasa. La función del activador es liberar el dominio cinasa de la supresión ejercida por el dominio amino y de esta manera la proteína Raf-1 puede activar a su sustrato, la proteína MAPKK (Morrison, 1995).

ACTIVACION DE LA PROTEINA ACTIVADORA DE MITOGENOS (MAP).

Las MAPK cinasas son fosforiladas sobre los residuos de tirosina/ treonina catalizados por la proteína MAP cinasa cinasa (MAPKK también conocida como MEK). Estas cinasas forman una vía lineal llamada la cascada MAPK, la cual es una vía de señalización intracelular central que controla la proliferación, diferenciación y el desarrollo embrionario temprano, por la expresión de factores de transcripción y proto-oncogenes como c-myc, c-jun y c-fos (Davis, 1993; Darnell y cols, 1994).

De estas proteínas solo las MAPK sufren reacciones de fosforilación en el

citoplasma y son translocadas al núcleo (Fig.6). La translocación ocurre por dos mecanismos, difusión pasiva y transporte activo, por lo que proporcionan una unión física de las vías de señalización intracelular entre el núcleo y el citoplasma (Fukuda y cols, 1997; Adachi y cols, 1999).

FUNCIONES DE LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH) DURANTE EL DESARROLLO EMBRIONARIO.

El ovario y el testículo son homólogos en estructura y función, en la producción de gametos y en la regulación de la esteroidogénesis. Ambos se caracterizan por depender de las gonadotropinas producidas en la hipófisis (LH y FSH) para llevar a cabo sus funciones. La hormona folículo estimulante (FSH) es esencial para el desarrollo sexual normal, en el ovario de los mamíferos así como el de las aves, regula la secreción hormonal y la maduración de las células somáticas asociadas a la gametogénesis (células de Sertoli y células granulosas). Estimula la actividad de la enzima aromatasa permitiendo la conversión de andrógenos a estrógenos (Dorrington y Armstrong, 1979; Yoshimura y Tamura, 1988). Sin embargo, la FSH requiere la interacción de múltiples factores de crecimiento (factor de crecimiento de insulina tipo I (IGF-I), el factor de crecimiento transformante tipo β (TGF- β), factor de crecimiento transformante tipo α (TGF- α) y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF)) así como moduladores autocrinos o paracrinos, los cuales pueden inhibir o actuar de manera sinérgica con la FSH para potenciar sus efectos (Dorrington y cols, 1988, 1993). Durante algunas etapas del desarrollo embrionario de las aves (8, 10, 13, 15 y 18 días) la hFSH induce la proliferación celular de cultivos primarios de células de ovario izquierdo, ovario derecho y testículo; sin embargo, la respuesta en cada gónada es diferente. El ovario derecho sólo responde en los días 8, 10 y 13 de incubación, lo cual concuerda con la regresión del órgano. El ovario izquierdo, es la gónada que presenta mayor proliferación celular entre los días

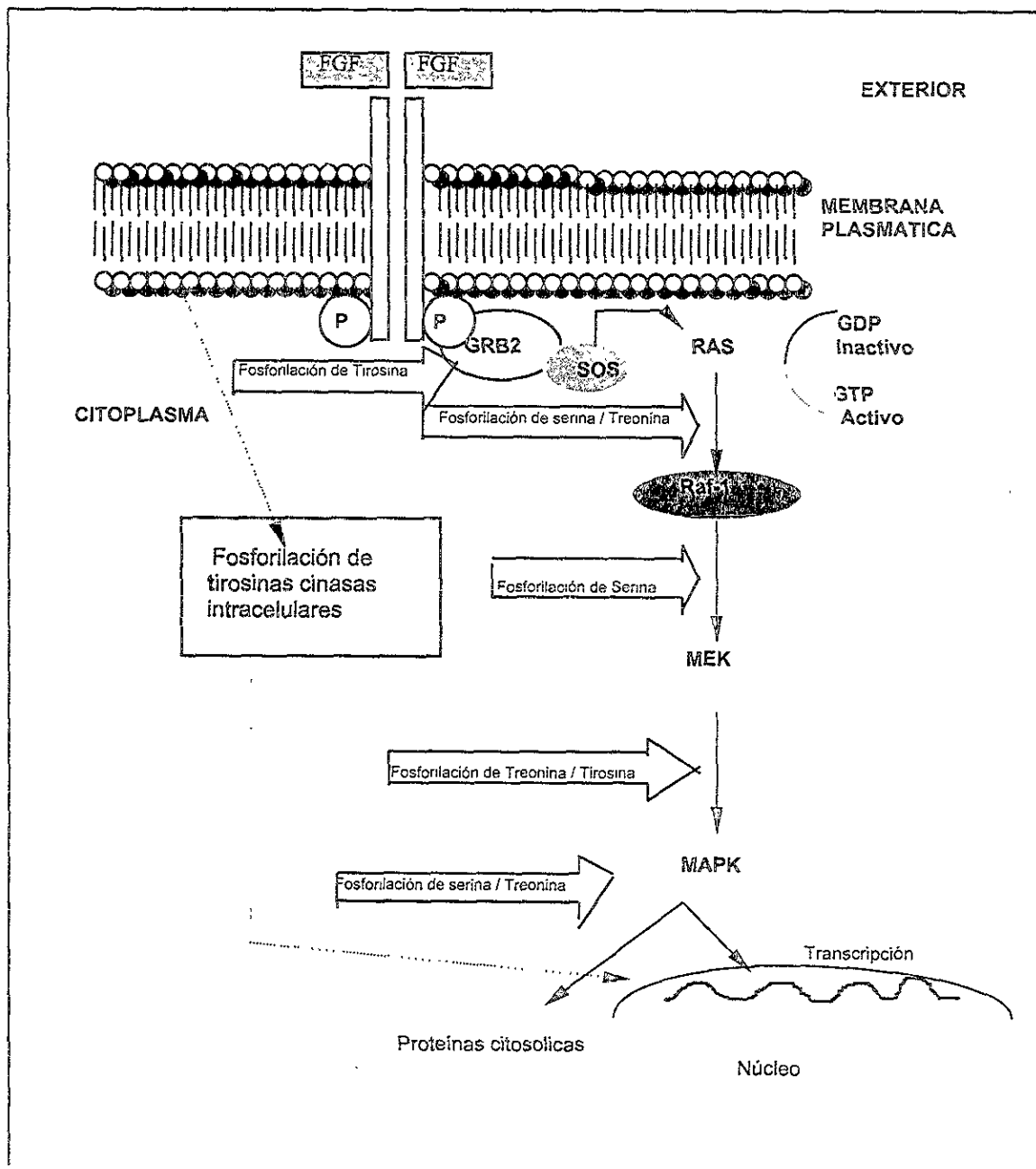


Fig. 6. Vía de señalización intracelular de las proteínas tirocínas cinasas (PTK) (Modificado de Darnell y cols, 1994).

8, 10 y 13, sin embargo no responde al tratamiento hormonal. En el caso del testículo siempre existe respuesta al tratamiento hormonal, presentandose dos picos de proliferación a los 8 y 18 días. Así mismo la hFSH estimula la secreción de hormonas esteroides al medio de cultivo, con una secreción preferencial de testosterona y 17β -estradiol por el ovario izquierdo en todas las edades estudiadas (Solis, 1996; Pedernera y cols, 1999).

Al realizar gradientes continuos de metrizamida, en el ovario izquierdo de 18 días de desarrollo embrionario se obtienen cuatro subpoblaciones celulares, de las cuales la única que responde a la hFSH con un incremento en la incorporación de timidina fue la fracción F4 (densidad 1.071 g/ml). En el ovario de pollo recién nacido esta fracción esta constituida por células pregranulosas y células epiteliales pobremente diferenciadas, las cuales secretan 17β -estradiol y tienen actividad de aromataasa (Pedernera y cols, 1988; Alvarez-Fernández y cols, 1994; Velázquez y cols, 1997).

En el testículo de los mamíferos la FSH induce la maduración de los tubos seminíferos y la espermatogénesis. Sin embargo, el mantenimiento de la espermatogénesis requiere de la participación de andrógenos los cuales son sintetizados en las células de Leydig ante el estímulo de la hormona luteinizante (LH) (Dorrington y Armstrong, 1979; Orth, 1982, 1984).

La utilización de la FSH *in vivo*, durante el desarrollo embrionario de las aves, produce un incremento en el número de células de Sertoli así como una mayor densidad de los túbulos seminíferos, esto concuerda con el efecto que la FSH produce en el desarrollo gonadal de los mamíferos (Orth, 1982; González-Morán, 1997). La FSH también actúa indirectamente sobre las células de Leydig, ya que al cocultivar célula de Leydig con células de Sertoli se produce un incremento en el número de receptores a LH y se aumentan los niveles del RNAm para el receptor de la hormona luteinizante (Lecerf y cols, 1993; Saez, 1994).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

En los mamíferos se ha demostrado que las gonadotropinas (LH y FSH), para llevar a cabo la esteroidogénesis, estimulan la proteína adenilato ciclasa lo que lleva a un incremento intracelular de 3'-5' adenosin monofosfato cíclico y de la proteína cinasa A, además aumenta la acción de algunas vías alternas como son la movilización de Ca^{++} y los segundos mensajeros derivados de la hidrólisis de los fosfoinosítidos (1,2-diacilglicerol y el inositol trisfosfato) (Davis y cols, 1987; Leung y Steele, 1992; Peluso y cols, 1993; Richards, 1994; He y cols, 1995).

En las gónadas de las aves durante el desarrollo embrionario hay poca información sobre cuales son los mecanismos intracelulares que se activan cuando la FSH se une a su receptor membranar, ya que al presentar desarrollo unilateral del ovario y oviducto, el ovario izquierdo presenta mayor proliferación celular en cultivos de población mixta; sin embargo, no responde en los días 8, 10 y 13 al tratamiento hormonal (hFSH). En cambio, el ovario derecho incrementa la incorporación de timidina hasta el día 13 y en los días subsecuentes (15 y 18) no responde a la hormona debido a la atrofia del órgano. A diferencia de los ovarios, el testículo presenta un estímulo proliferativo inducido por la hFSH hasta de un 50% en todas las edades estudiadas (8, 10, 13, 15 y 18 días de desarrollo embrionario) (Solis, 1996; Pedernera y cols, 1999) .

Por lo cual es importante determinar si son diferentes las vías de señalización intracelulares que modulan la proliferación celular en el ovario izquierdo, ovario derecho y testículo a los 13 días del desarrollo embrionario, momento en el cual no se ha establecido aún el eje hipotálamo - hipófisis - gónada. Sin embargo es probable que en esta etapa del desarrollo las células esteroidogénicas ováricas posean receptores para hFSH, ya que se ha demostrado un incremento en la secreción de 17β -estradiol y testosterona inducido por esta hormona gonadotropa (Pedernera y cols, 1999).

OBJETIVOS.

- Determinar la participación de los segundos mensajeros y/o sus análogos, así como la posible vía de señalización intracelular que es utilizada en la división celular modulada por la FSH en el ovario derecho y testículo de embrión de pollo con 13 días de desarrollo embrionario.
- Determinar si la ausencia de la respuesta proliferativa inducida por hFSH en el ovario izquierdo esta regulada por la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y/o proteína tirosina cinasa (PTK).

MATERIALES Y METODOS.

MATERIAL BIOLÓGICO.

Los huevos fértiles de pollo de la clase Leghorn blanca Babcock B-300 fueron adquiridos de la granja avícola Alpes II S.A. (Tehuacan, Puebla) e incubados a 37.8°C durante 13 días. Se determinó la edad exacta de los embriones por medio de las tablas de Hamburger y Hamilton (1951).

REACTIVOS.

Se utilizaron ácido acético concentrado (CH_3COOH), ácido tricloroacético (CCL_3COOH), carbonato de sodio (NaHCO_3), cloruro de sodio (NaCl), cloruro de potasio (KCl) y metanol adquiridos de Merck, México S.A. El dodesil sulfato de sodio y el fosfato de potasio (K_2HPO_4) se obtuvieron de Baker S.A. de C.V. México. La albúmina sérica bovina, el azul tripano, el dimetil sulfóxido (DMSO) y el inhibidor de tripsina se obtuvieron de Sigma Chemical CO (St. Louis MO USA). La Hormona Folículo Estimulante humana (hFSH) Fertinorm HP se obtuvo de Serono de México. S.A, 1 mUI es equivalente a 14 ng de hFSH con 2 pg de hLH (Ulloa - Aguirre y cols, 1995) y la Hormona Folículo Estimulante recombinante humana (hFSHr) se obtuvo de Organon Kloosterstrat. Holanda. N. V. El líquido de centelleo (Aquasol-2) y la ^3H Metil-Timidina se obtuvieron de NEN Research Products (Boston, MA). Las cajas de cultivo y las membranas de policarbonato con poro de 1.0 μm y 35 mm de diámetro se obtuvieron de Costar (Cambridge, MA). El Medio Mínimo Esencial Modificado por Dulbencco (DMEM) y la tripsina se compraron a Gibco BRL. Grand Island. N.Y. USA.

INHIBIDORES DE PROTEINAS CINASAS Y SEGUNDOS MENSAJEROS.

El N^6 , 2'-O- dibutiril 3': 5'adenosín monofosfato cíclico (db-AMPC), el forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), el forskolín, la genisteína, la herbimicina

A, la lavendustina A y el tirfostín 23 se compraron a Sigma St Louis MO USA.

METODOS.

Se utilizó el ovario izquierdo, ovario derecho y los testículos de embriones de pollo con 13 días de desarrollo embrionario para realizar cultivos de población mixta. Una vez que las gónadas tenían la edad requerida se realizó la disección y obtención de éstas, de manera estéril en una campana de flujo laminar. Las gónadas se colocaron empleando una pipeta serológica en una caja de petri con medio de cultivo y se lavaron con esta misma solución.

Posteriormente, las gónadas se colocaron en un tubo cónico con tripsina (0.25%) disuelta en solución salina balanceada libre de Ca^{++} y Mg^{++} (SSB) (ver apéndice) durante 15 minutos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO_2 y 95% de aire para realizar una disociación mecánico-enzimática. Después de este tiempo, se resuspendió el tejido y se agregó a la suspensión celular inhibidor de tripsina (0.50%) disuelto en medio mínimo esencial modificado por Dulbecco suplementado con albúmina sérica bovina (1.0 mg/ml) (DMEM - BSA).

Las células obtenidas fueron centrifugadas por 10 minutos a 200 x g, se eliminó el sobrenadante y el botón celular fue resuspendido y lavado dos veces más con DMEM-BSA, entre cada lavado se eliminó el sobrenadante.

Al botón celular se le agregó de 3 a 5 ml de medio de cultivo según la cantidad de tejido, y se determinó la viabilidad celular por medio de la técnica de exclusión de azul tripano el cual mostró un 90% de viabilidad después de la disgregación celular (Tennant, 1960). Posteriormente, las células se sembraron en membranas de policarbonato (1 μ m de diámetro de poro y 13 mm de diámetro) flotando sobre 2 ml de DMEM en cajas de cultivo estériles de 35 x 10 mm. Al medio de cultivo se le agregó los segundos mensajeros o sus análogos: Dibutiril 3'-5'Adenosín Monofosfato cíclico (dibutiril-AMPC) que estimula la proteína

cinasa A (PKA), forskolín que activa a la adenilato ciclasa, el éster de forbol PMA un compuesto homólogo al diacilglicerol (DAG) que activa a la proteína Cinasa C (PKC) y la genisteína, un fitoestrógeno que se une al receptor de estradiol e inhibe a la proteína tirosina cinasa (PTK). Como inhibidores específicos de las PTK se emplearon: herbimicina A, lavendustina A y tirfostín 23. Los grupos formados con las células del ovario derecho, ovario izquierdo y testículo se distribuyeron de la siguiente manera:

GRUPOS	MEDIO CULTIVO	DE NUMERO DE CELULAS	DE hFSH	SEGUNDOS MENSAJEROS
BASAL	DMEM + BSA	500 000 células		
TRATADOS	DMEM + BSA	500 000 células	hFSH (0.5 UI/ml)	
	DMEM + BSA	500 000 células	hFSHr (0.5 UI/ml)	
	DMEM+BSA	500 000 células		Dibutiril-AMPC (1mM)
	DMEM + BSA	500 000 células	hFSH(0.5 UI/ml)	Dibutiril-AMPC (1mM)
	DMEM + BSA	500 000 células		genisteína (20 µM)
	DMEM + BSA	500 000 células	hFSH(0.5 UI/ml)	genisteína (20 µM)
	DMEM + BSA	500 000 células		PMA (61.7 ng)
	DMEM + BSA	500 000 células	hFSH(0.5 UI/ml)	PMA (61.7 ng)
	DMEM + BSA	500 000 células		forskolin (0.2µM)
	DMEM + BSA	500 000 células	hFSH(0.5 UI/ml)	forskolin (0.2µM)
	DMEM + BSA	500 000 células		lavendustinaA (150µM)
	DMEM + BSA	500 000 células	hFSH(0.5 UI/ml)	lavendustinaA (150µM)
	DMEM + BSA	500 000 células		herbimicina A (900nM)
	DMEM + BSA	500 000 células	hFSH(0.5 UI/ml)	herbimicina A (900nM)
	DMEM + BSA	500 000 células		tirfostín 23 (50 µM)
DMEM + BSA	500 000 células	hFSH(0.5 UI/ml)	tirfostín 23 (50 µM)	

A todos los grupos se les agregó 0.1 µCi de ³H-Timidina y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. Después de 60 horas de cultivo

se valoró la división celular por medio de la técnica de incorporación de timidina.

TECNICA DE INCORPORACION DE TIMIDINA.

- 1) Se colocó la membrana de policarbonato con el botón celular en un vial.
- 2) Se agregó sobre la membrana de policarbonato 3 ml de metanol - ácido acético 3:1 (v/v) y se dejó durante 15 minutos a temperatura ambiente.
- 3) Se eliminó el fijador y se les agregó 3 ml de ácido tricloro acético (TCA) frío al 10%, colocándose una hora a 4°C.
- 4) Se eliminó el TCA.
- 5) Se agregó 400 µl de dodesil sulfato de sodio (SDS) al 2% se taparon los viales y se incubaron a 60°C durante 30 minutos.
- 6) Se sacaron los viales del baño, se dejó que alcanzaran la temperatura ambiente y a cada vial se le agregó 5 ml de líquido de centelleo, se taparon, se agitaron con un vórtex y se limpiaron con alcohol.
- 7) Se cuantificó la timidina tritiada incorporada a las células en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 6500).

ESTADISTICA.

A los resultados se les realizó un análisis de varianza de un factor y las pruebas de Tukey y Duncan ($P < 0.05$), para determinar las diferencias significativas entre los grupos testigo con respecto a los tratados, en cada una de las gónadas estudiadas.

RESULTADOS.

En este trabajo se determinó la participación de dibutiril-AMPc, forskolín, PMA e inhibidores de tirosinas cinasas (lavendustina A, herbimicina A, tirfostin 23 y genisteína) como posibles moduladores de las vías de señalización intracelular utilizadas por la hFSH, en la proliferación celular de gónadas de aves con 13 días de desarrollo embrionario.

OVARIO IZQUIERDO.

Las células de ovario izquierdo cultivadas por 60 horas mostraron la mayor incorporación de ^3H -Timidina en comparación con el ovario derecho y el testículo. Las células al ser tratadas con los fármacos dibutiril-AMPc, PMA y forskolín, no incrementaron la división celular con respecto al grupo control. Sin embargo la proliferación se incrementó significativamente (38%) cuando la genisteína se agregó en el medio de cultivo.

La hormona folículo estimulante humana (hFSH) no aumento la proliferación celular. Sin embargo, al mezclar PMA con hFSH se potenció el fenómeno proliferativo un 32% en relación al grupo control. Las células tratadas con genisteína y hFSH, incrementaron su proliferación un 3% con respecto a las células tratadas solo con genisteína, lo cual indica que no ocurre una potenciación de la proliferación celular cuando el fármaco se mezcla con la hFSH (Fig. 7).

OVARIO DERECHO.

El ovario derecho presento la menor incorporación de ^3H -timidina en comparación a las celulas de ovario izquierdo y testículo. Las células al ser tratadas con dibutiril-AMPc, genisteína, PMA y forskolín no presentaron diferencias significativas con respecto al grupo testigo. En cambio la hFSH potenció la proliferación un 50% en relación al grupo control.

Los fármacos genisteína, PMA y forskolín mezclados con hFSH incrementan la incorporación de ^3H -Timidina 31%, 38% y 57% en comparación a las células tratadas con hFSH (Fig. 8).

TESTICULO.

Los cultivos de agregados testiculares sembrados por 60 horas, no incrementaron su proliferación celular al ser tratados con genisteína, PMA, dibutilil-AMPC o forskolín. Sin embargo cuando se trataron las células con hFSH fue evidente un estímulo en la proliferación celular hasta de un 40%, en respuesta al tratamiento hormonal.

La combinación de los tratamientos (fármacos y hFSH) potenció la proliferación celular, con respecto al testigo (dibutilil-AMPC con FSH 18%, genisteína con hFSH 31%, forskolín con FSH 30% y PMA más hFSH 23.6%) pero no con respecto a la hFSH sola (Fig. 9).

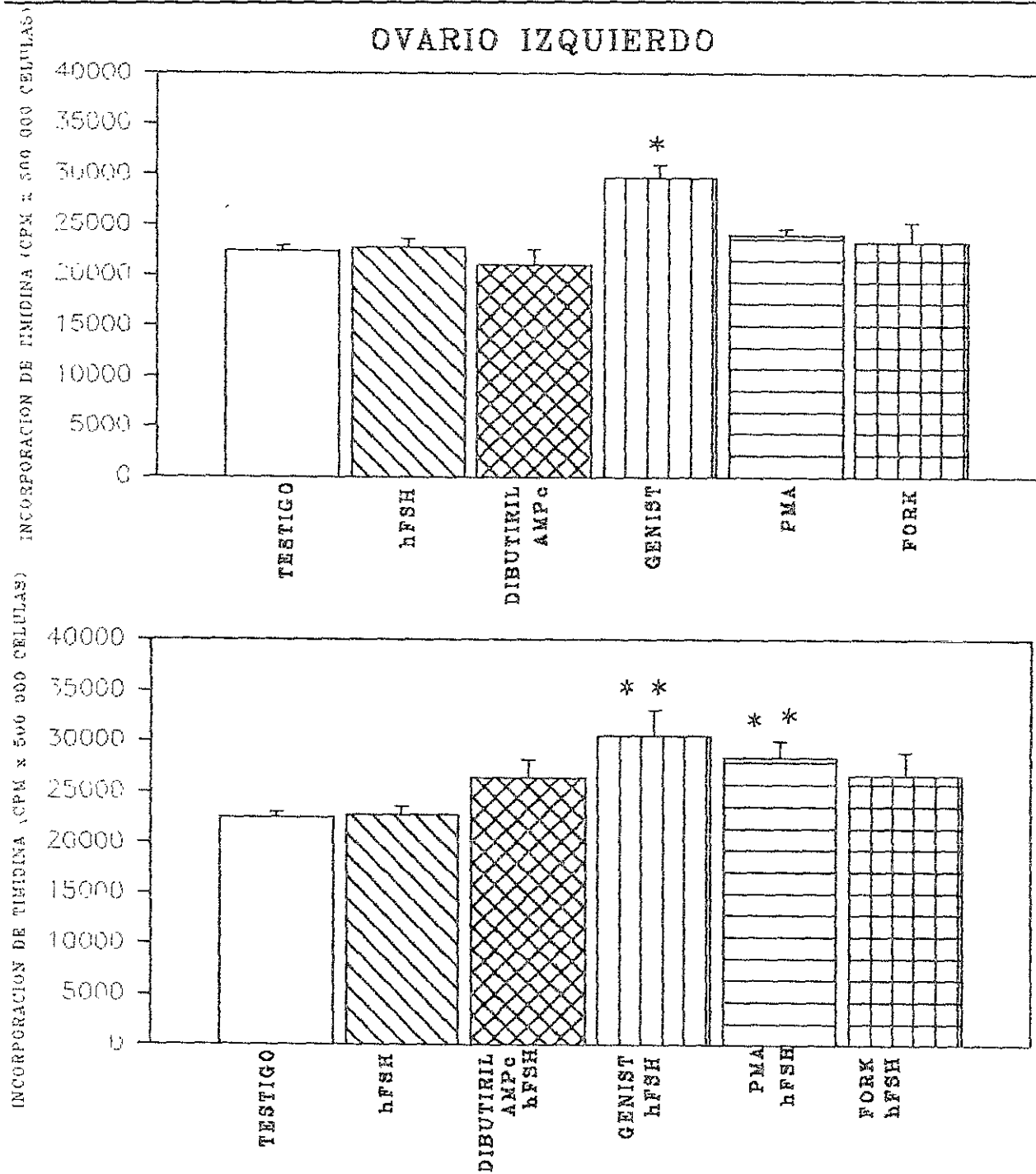


Fig. 7. Gráficas que indican la cantidad de ³H-Timidina incorporada al cultivo de células de ovario izquierdo tratadas con hFSH y segundos mensajeros. De estos fármacos el único que indujo proliferación celular fue la genisteína. Sin embargo la combinación de los fármacos con la hFSH se potencio solo con PMA. La barra representa la media ± ES de 6 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado. (* indica diferencia significativa en relación al grupo testigo y ** indican diferencia significativa con respecto al grupo tratado con hFSH (P < 0.05).

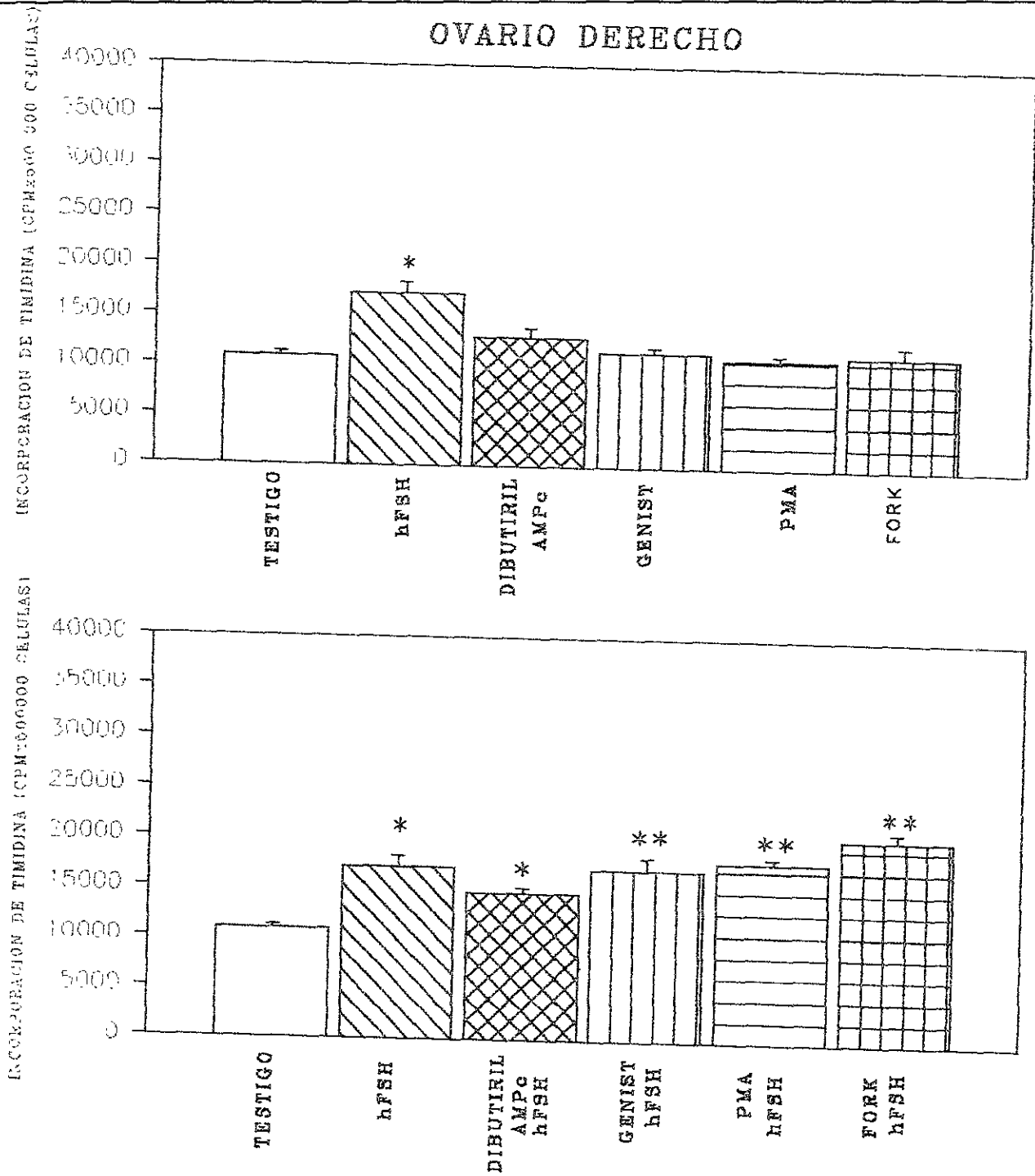


Fig. 8. Gráficas de incorporación de ³H-Timidina en cultivos primarios de ovario derecho con 13 días de desarrollo embrionario. En las cuales se puede observar que la hormona (hFSH) incrementa la proliferación celular, pero los fármacos dibutiril-AMPC, genisteína, PMA y forskolín no aumentaron la proliferación celular. La barra representa la media ± ES de 5 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado (* indica diferencia significativa en relación al grupo testigo y ** indican diferencia significativa con respecto al grupo tratado con hFSH (P < 0.05).

TESTICULO

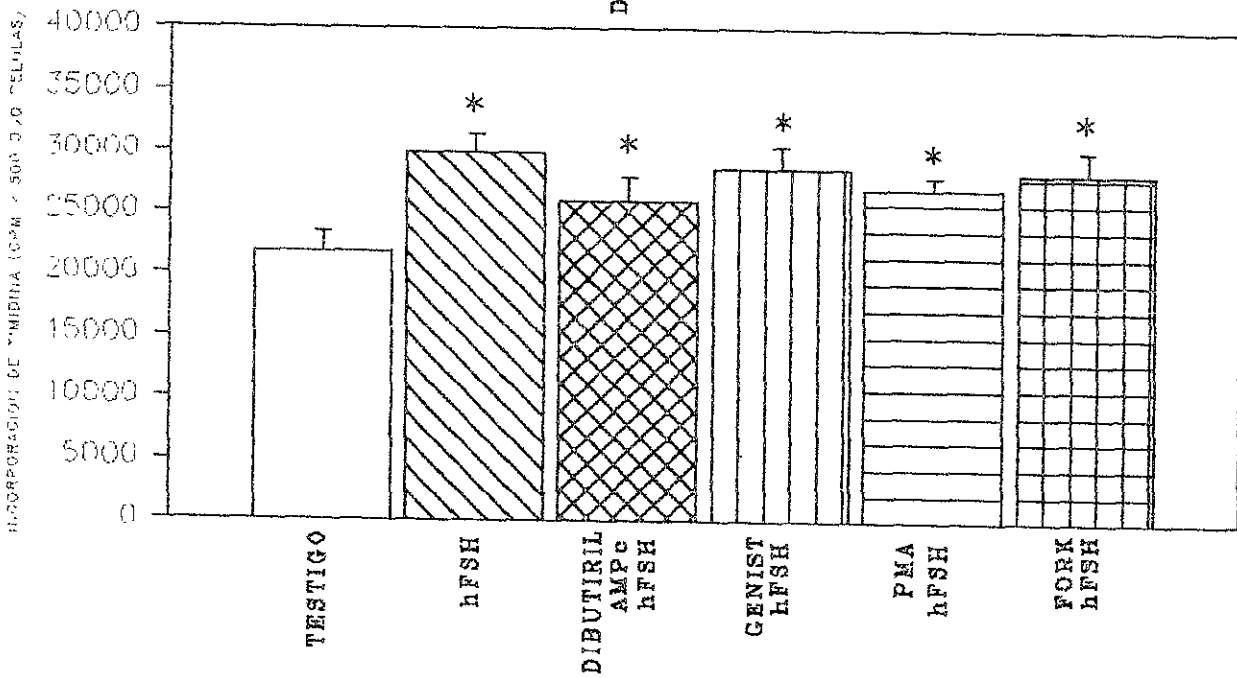
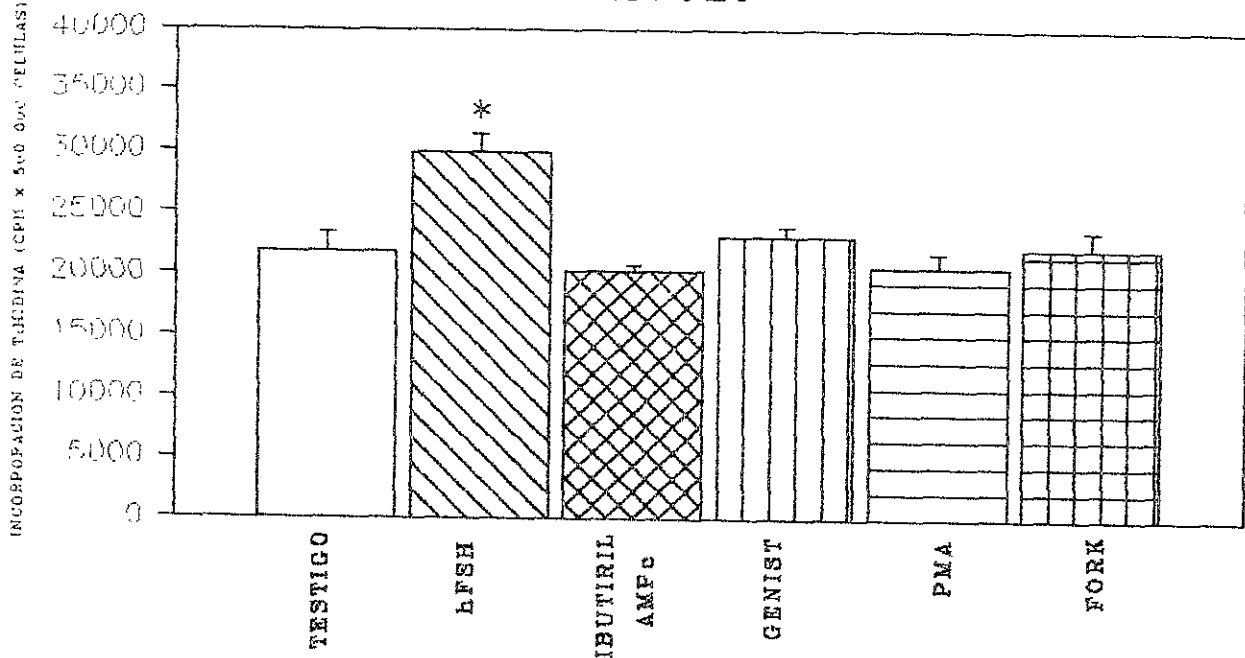


Fig. 9. Gráficas de incorporación de timidina en cultivos primarios de testículo cultivados por 60 horas, que muestran un incremento en la proliferación celular inducida por hFSH. Sin embargo la proliferación celular no es evidente con ninguno de los fármacos empleados (dibutiril-AMPC, genisteína, PMA, forskolin). La barra representa la media \pm ES de 6 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado. El asterisco indica la significancia estadística ($P < 0.05$).

INHIBIDORES DE PROTEINAS TIROSINAS CINASAS (PTK).

En una segunda serie de experimentos para determinar si la genistéina en el ovario izquierdo de embrión de pollo con 13 días de incubación, estimula la proliferación celular por unirse al receptor de estradiol o lo hace al inhibir la fosforilación de proteínas tirosinas cinasas (PTK), se emplearon inhibidores específicos de las PTK: la herbimicina A, la lavendustina A y el tirfostín 23.

De estos fármacos se realizó una curva dosis respuesta de tirfostín 23 con una concentración de 50, 25 y 12.5 μM en las células del ovario izquierdo, ya que la dosis reportada en la bibliografía (100 μM) induce la muerte celular en el modelo experimental utilizado en el presente trabajo, con un efecto máximo a una concentración de 50 μM y una dosis efectiva (ED_{50}) de 28.3 $\mu\text{M}/\text{ml}$ (Fig. 10).

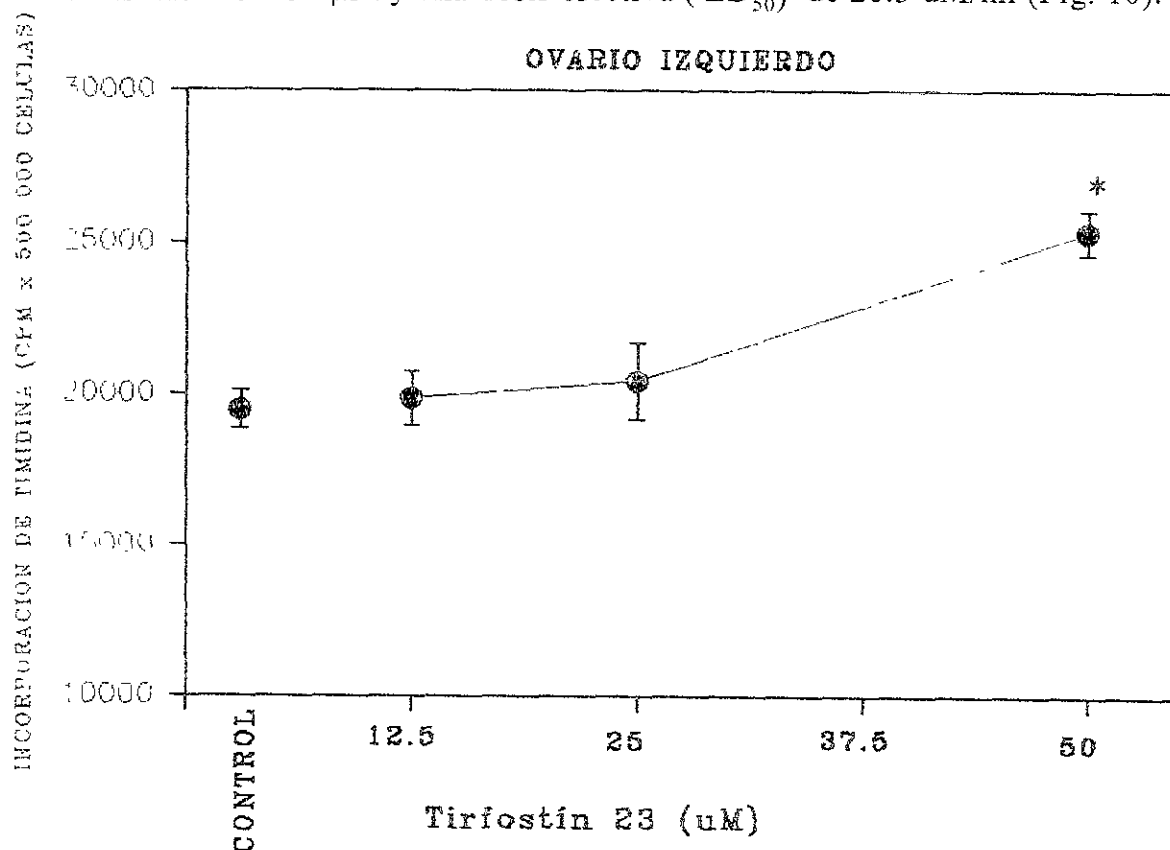


Fig. 10. Curva dosis-respuesta de tirfostín 23 (50, 25 y 12.5 μM) en células de ovario izquierdo cultivadas por 60 horas. El efecto máximo se encontró a una concentración de 50 μM con una dosis efectiva (DE_{50}) de 28.3 $\mu\text{M}/\text{ml}$. Cada punto representa la media \pm ES de 3 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado.

Además, se realizó una curva temporal en células de ovario izquierdo, para determinar la toxicidad del tirfostín 23, encontrándose que el tirfostín solo necesita 12 horas en el medio de cultivo para incrementar la incorporación de Timidina, induciendo la muerte celular a las 60 horas de cultivo ($P < 0.005$) (Fig. 11).

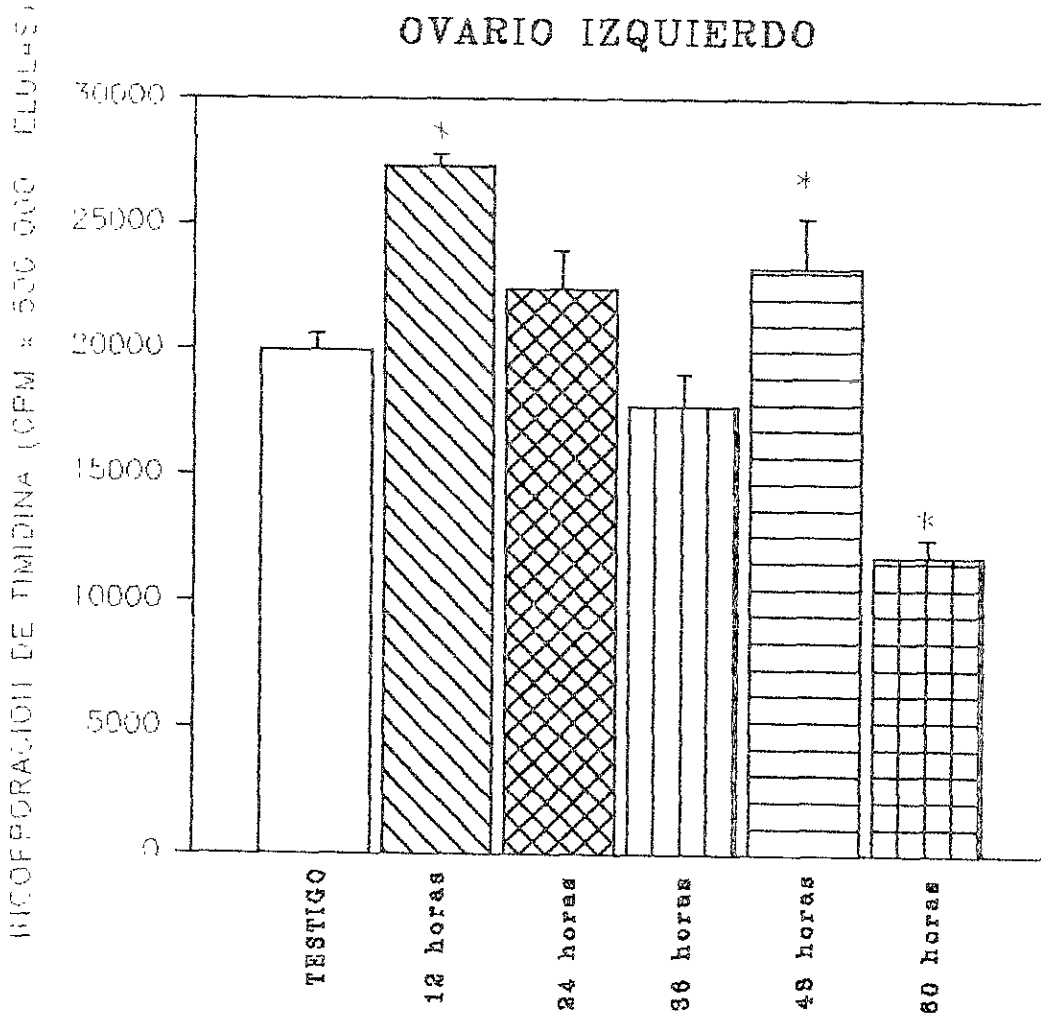


Fig. 11. Curva temporal de tirfostín 23 (50 $\mu\text{M}/\text{ml}$) en células de población mixta de ovario izquierdo. En la que se puede observar que 12 horas después de agregado el fármaco ocurrió un aumento de la proliferación celular. Se encontró además que a las 60 horas el tirfostín 23 es tóxico para las células de nuestro modelo. Cada punto representa la media \pm ES de 3 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado. El asterisco indica la significancia estadística ($P < 0.05$).

OVARIO IZQUIERDO

Los inhibidores de PTK incrementaron la incorporación de timidina con respecto al grupo control (tirfostín 23 (20%), genisteína (23%) y lavendustina A (33%).

La hFSH HP (Serono) y la hFSHr (Organon), no incrementaron la incorporación de timidina con respecto al grupo testigo.

Al realizar las combinaciones de los inhibidores con hFSH se potenció la proliferación celular con lavendustina A (70%), genisteína (58%) y tirfostín 23 (23%), en relación a las células tratadas con hFSH HP (Fig. 12).

OVARIO DERECHO.

En el ovario derecho ninguno de los inhibidores de proteínas tirosinas cinasas (lavendustina A y herbimicina A) indujeron división celular. En cambio la mezcla de lavendustina A adicionada con hFSH incrementó la proliferación celular (34%), con respecto al grupo tratado con hFSH solamente.

Sin embargo la herbimicina A y la genisteína al ser mezcladas con la hFSH solo producen diferencias significativas cuando se compararon con el grupo control ($P < 0.05$) y no con el grupo que recibió solo hFSH (Fig. 13).

TESTICULO

En el testículo el único inhibidor de PTK que indujo un incremento en la incorporación de timidina fue herbimicina A (40%).

Las células tratadas con hFSH HP (Serono) y hFSHr (Organon) incrementaron la división celular comportándose de la misma manera las dos ($P < 0.05$).

Al realizar las mezclas de los inhibidores (lavendustina A y herbimicina A) con hFSH se incrementó la incorporación de timidina (30% y 47% respectivamente) en relación a los grupos tratados solo con hFSH.

Cuando las células fueron tratadas con genisteína y hFSH aumentó la proliferación celular. Sin embargo el incremento fue casi igual al observado cuando las células fueron tratadas solo con hFSH, y por lo tanto las diferencias fueron significativas solo cuando estos grupos se compararon con el grupo control (Fig. 14).

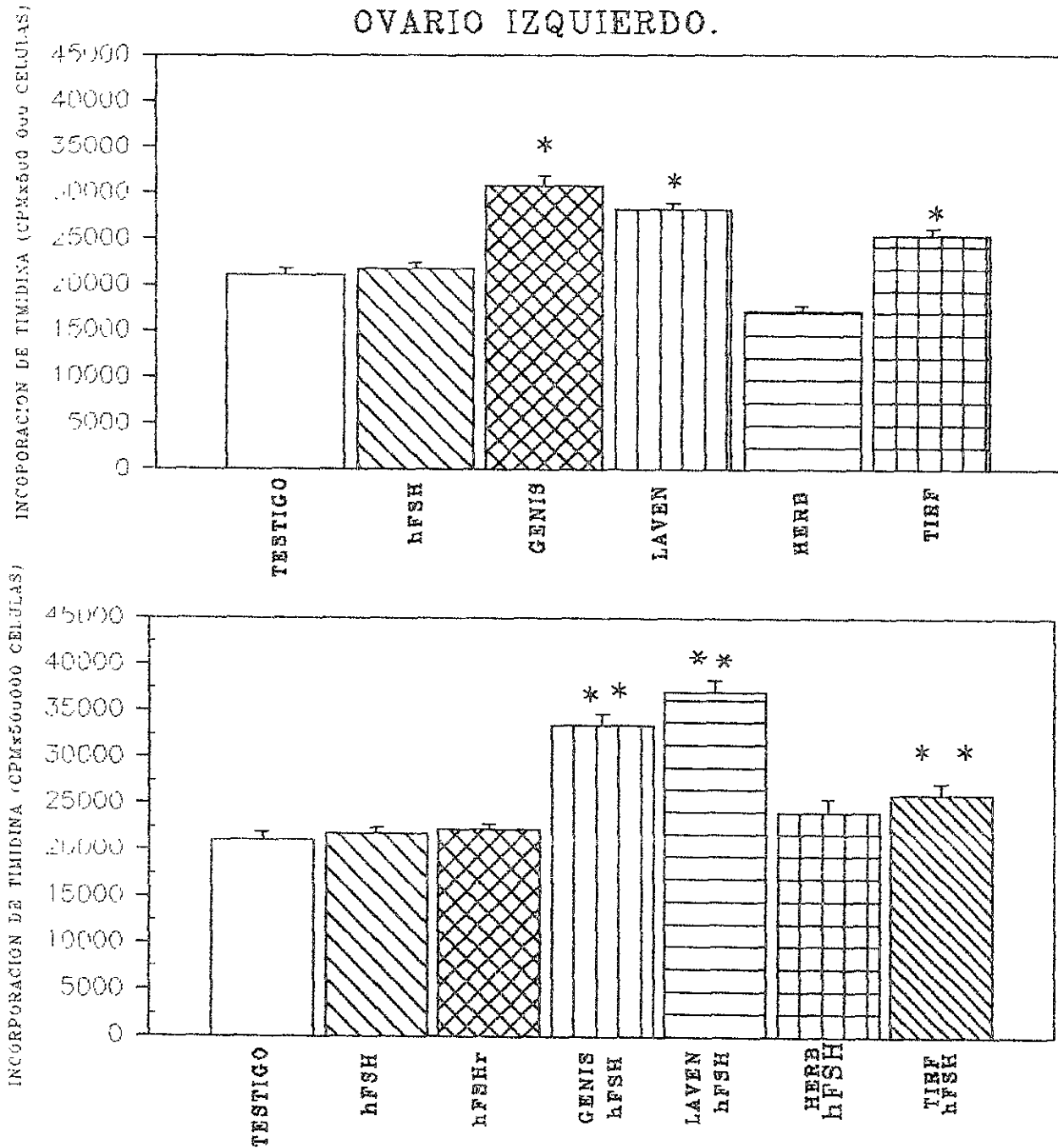


Fig. 12. Gráficas de incorporación de ³H-Timidina en agregados de células de ovario izquierdo cultivadas por 60 horas, tratadas con inhibidores específicos de proteínas tirosinas cinasas (PTK) y la combinación de éstas con hFSH. De estos fármacos la genisteína, la lavendustina A y el tirfostín 23 incrementaron la proliferación celular. Al realizar las combinaciones de las sustancias con la hFSH se incremento la división celular. La barra representa la media ± ES de 4 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado. (*diferencia significancia en relación al grupo testigo y ** diferencia significancia con respecto al grupo tratado con hFSH, P< 0.05).

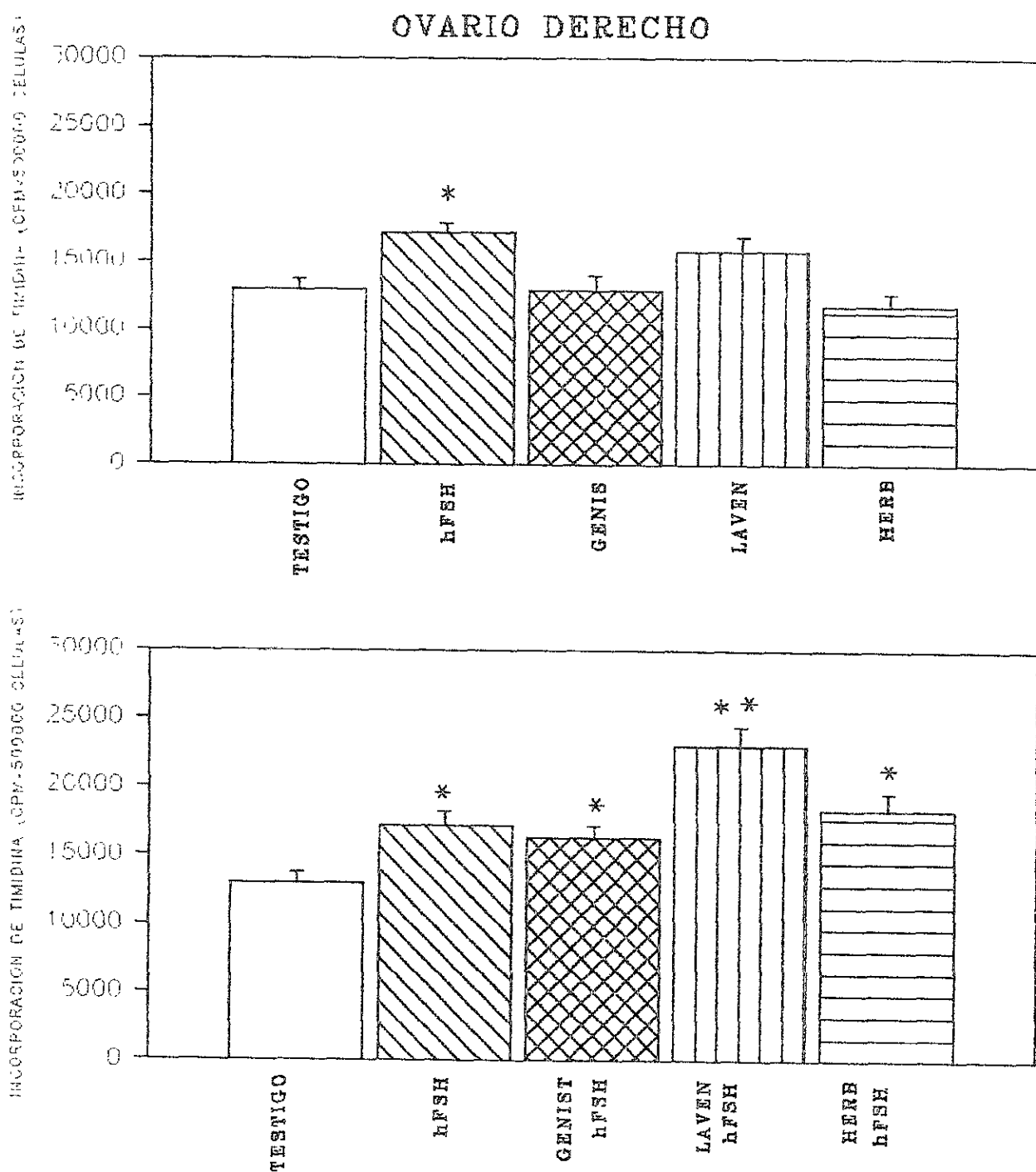


Fig. 13. Gráficas que muestran la división celular, valorada por la técnica de incorporación de timidina, en células de ovario derecho tratadas con inhibidores específicos de PTK (lavendustina A y herbimicina A) y las mezclas de éstas con hFSH. Las mezclas de genisteína, lavendustina A o herbimicina A con hFSH produjeron un aumento de la proliferación celular. La barra representa la media \pm ES de 4 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado. (*diferencia significativa en relación al grupo testigo y ** diferencia significativa con respecto al grupo tratado con hFSH, $P < 0.05$).

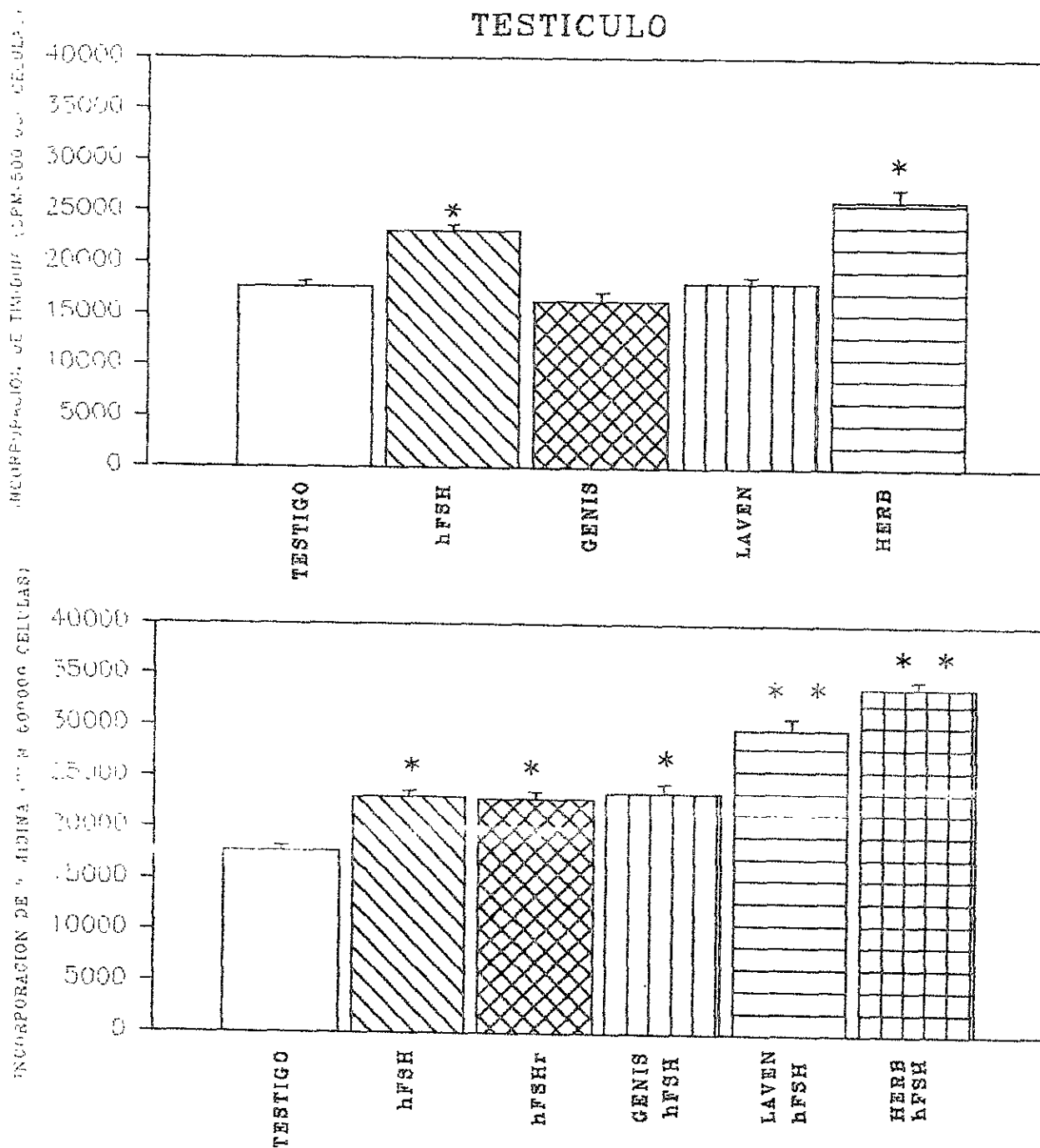


Fig. 14. Gráficas de incorporación de ³H-Timidina en células de testículo embrionario, estimulados con inhibidores de PTK. De estas sustancias solo la herbimicina A indujo proliferación celular. Sin embargo al realizar las mezclas de los fármacos con la hFSH ocurrió un incremento en la división celular en todos los casos. La barra representa la media ± ES de 4 experimentos separados, cada uno por cuadruplicado. (*diferencia significativa en relación al grupo testigo y ** diferencia significativa con respecto al grupo tratado con hFSH (P< 0.05).

DISCUSIÓN.

En este estudio se trató de identificar los mecanismos de señalización intracelular que utiliza la hFSH para inducir división celular, para lo cual se utilizaron fármacos que modifican la actividad de los segundos mensajeros y de las proteínas cinasas (PTK, PKC y PKA) en células de ovario izquierdo, ovario derecho y testículo con 13 días de incubación. Para ello, se realizaron cultivos primarios de células gonadales de aves, sembradas en membranas de policarbonato por 60 horas en medio de cultivo (DMEM-BSA). Al final del cultivo las células mostraron una reasociación celular y por lo tanto, llevaron a cabo las interacciones entre las diferentes poblaciones celulares. Además las células no presentaron muerte celular, ya que anteriormente se ha demostrado un incremento en la incorporación de ³H-timidina y en el número total de células cultivadas con hFSH, lo que confirma que la fisiología de las células no fue alterada durante los cultivos celulares (Velázquez y cols, 1997; Pedernera y cols, 1999).

De acuerdo con los resultados que obtuvimos la respuesta a los moduladores de la división celular en ambos ovarios es diferente, lo que indica diferentes condiciones fisiológicas para ambas gónadas. En el caso de las células de ovario derecho al ser tratadas con activadores o inhibidores de las proteínas cinasas A (AMPC y forskolín), proteínas cinasas C (PMA) y de las proteínas tirosinas cinasas (genisteína, herbimicina A y lavendustina A) no aumentó la división celular probablemente por la involución del órgano, que se inicia en el noveno día de desarrollo embrionario (Teng y Teng, 1977). Cuando las células fueron tratadas con las mezclas de los fármacos y la hFSH se incrementó la división celular, pero este efecto se debe posiblemente a la hormona.

Esta gónada, estimulada *in vitro* con hFSH después de los 13 días de desarrollo embrionario ya no prolifera (Solis, 1996; Pedernera y cols, 1999) y la síntesis de

17 β -estradiol disminuye, hasta ser no cuantificable en el nacimiento (Woods y Erton, 1978; Nakabayashi y cols, 1998). Nuestros resultados pueden ser comparados con los encontrados en las células granulosas y las células de la teca de los folículos que sufren apoptosis (muerte celular programada) en las cuales disminuye la síntesis de DNA y se reduce la producción de estrógenos al disminuir la actividad del citocromo P450 aromatasa (Teng y Teng, 1977; Tilly y cols, 1992). También estos folículos muestran una disminución en el número de receptores membranales para las gonadotropinas (FSH y LH), lo cual lleva a la disminución intracelular de la adenilato ciclasa y del AMPc (Ritzhaupt y Bahr, 1987).

Las células de ovario izquierdo no respondieron al estímulo proliferativo inducido por la hFSH posiblemente (1) debido a que en esta edad exista un pico proliferativo que evita una respuesta hormonal, (2) a que se forme el complejo hormona-receptor en la membrana pero no dispare una señal intracelular ó (3) que algunos de los pasos utilizados en la cascada intracelular estén inhibidos. Sin embargo, con los resultados en este trabajo nosotros apoyamos la tercera opción ya que al utilizar PMA, AMPc y forskolín las células no se dividieron. Pero al emplear la genisteína (un inhibidor de las proteínas tirosinas cinasas) ocurrió un incremento de la proliferación de las células ováricas cultivadas, aunque no podemos descartar las otras dos alternativas.

De estos fármacos el dibutiril-AMPc activa a la PKA en el citoplasma y el forskolín induce la activación de la adenilato ciclasa en la membrana plasmática, por lo que son utilizados como análogos de la FSH para activar la vía de señalización intracelular de la PKA, la cual se ha demostrado que es la vía utilizada en las células granulosas para inducir diferenciación celular (Peluso y cols, 1993). En cuanto al efecto del AMPc como modulador de la división celular varia, ya que depende del tipo celular y del modelo experimental,

utilizado para que se encuentre una respuesta mitógenica. En el caso de las células foliculares en el hámster el Br-AMPC. incrementa la síntesis del DNA. lo cual indica que la replicación inducida por la FSH es regulada por una cadena de eventos que implica la unión de la hormona a su receptor membranal, así como la activación subsecuente de la adenilato ciclasa y del AMPC (Shyamal y Greenwald, 1991). En cambio Lavranos y cols (1994) indican que el db-AMPC (1mM) inhibe el efecto mitogénico e induce diferenciación celular de las células granulosas de bovino, lo cual concuerda con los resultados del presente trabajo. Además, las bajas concentraciones intracelulares de AMPC permiten la expresión de las ciclina E y D2 en la fase G₁ del ciclo celular para que la célula entre a la fase de síntesis del DNA (Peluso y cols, 1993; Robker y Richards, 1998).

El éster de forbol PMA es un cancerígeno que activa a la PKC, ya que actúa igual que el DAG, a una concentración de 10 ng/ml. Sin embargo, el DAG esta presente solo de manera transitoria en la membrana, en cambio el PMA es degradado lentamente, por lo tanto la exposición prolongada a altas dosis puede inducir el agotamiento de la PKC (Nishizuka, 1986; He y cols, 1995) y hacer que esta vía ya no responda para inducir proliferación celular. Probablemente este hecho ocurrió en el caso del ovario izquierdo ya que las células no presentaron muerte celular durante la exposición al fármaco, lo cual fue demostrado por la incorporación de ³H-Timidina. Otro fármaco utilizado en este trabajo fue la genisteína, pero el mecanismo intracelular por el cual ejerce su acción es poco conocido, ya que presenta un doble efecto. Por un lado estimula la proliferación celular en células de cáncer mamario (MCF-7) a bajas concentraciones (10 µM) a través del receptor de 17β-estradiol, formando en el citoplasma el complejo receptor - fitoestrógeno que es procesado de manera análoga al estradiol (Martin y cols, 1978; Wang y cols, 1996). También puede

actuar como un anticancerígeno. inhibiendo la proliferación celular, a altas concentraciones (20 μM) debido a la inhibición de la fosforilación de las tirosinas cinasas; pero este efecto es independiente del receptor de estradiol (Gomberg y cols, 1993; Brown y cols. 1998). En este trabajo es poco probable que la genisteína actúe de manera análoga al 17β -estradiol, ya que se ha demostrado que esta hormona estimula la proliferación celular de las células granulosas *in vivo* (Dorrington y cols, 1993). Sin embargo, cuando las células granulosas son aisladas y sembradas en presencia de 17β -estradiol no se estimula la proliferación celular (Dorrington y cols, 1993; Luciano y Peluso, 1995).

En una segunda serie de experimentos llevados a cabo en el ovario izquierdo para descartar el efecto fitoestrógeno de la genisteína se emplearon inhibidores específicos de las proteínas tirosinas cinasas: lavendustina A, herbimicina A y tirfostín 23, los cuales son además potentes inhibidores de la proliferación celular y son sustancias que atraviesan la membrana plasmática. De estos compuestos la herbimicina A bloquea de manera irreversible al receptor del EGF y algunas tirosinas cinasas intracelulares (Levitzki y Gazit, 1995). La lavendustina A es un inhibidor competitivo del ATP y el tirfostín 23 es un inhibidor competitivo de la proteína sustrato (Gomberg y cols, 1993; Levitzki y Gazit. 1995).

La participación que tienen las PTK como moduladoras de la proliferación celular, se ha demostrado con algunos factores de crecimiento como son el EGF, FGF y PDGF, los cuales se unen a sus receptores membranales que presentan actividad de tirosina cinasa. Sin embargo, al emplear inhibidores de PTK se abate la división celular. En nuestro caso las células de ovario izquierdo responden de manera contraria ya que por un lado la FSH no estimula la replicación del DNA, cuando agregamos los inhibidores específicos de las tirosinas cinasas se incrementa la proliferación, lo cual

indica que la división celular del ovario izquierdo a los 13 días del desarrollo embrionario esta bloqueada cuando las tirosinas cinasas están activas. Asimismo nuestros resultados concuerdan con los de otros autores que han reportado que en las células granulosa de rata, la esteroidogénesis es bloqueada por el tirfostín AG18, un inhibidor de las tirosinas cinasas (Gomberg-Maool y cols, 1993). Además en las células foliculares de cerdo, la producción de estrógenos es aumentada por el TGF- α . Pero la genisteína atenúa este efecto, lo cual sugiere que la esteroidogenesis es un evento dependiente de las tirosinas cinasas (Gandrade y cols, 1991), así como la proliferación celular en nuestro caso.

En las células testiculares de aves, encontramos que ninguna de las sustancias empleadas en la primera fase experimental induce incorporación de timidina (AMPc, genisteína, PMA y forskolín). Al emplear los inhibidores específicos de PTK (lavendustina A y herbimicina A), solo la herbimicina A produce un incremento en la respuesta proliferativa en comparación al grupo basal y al estimulado con hFSH. Por lo tanto las vías de señalización intracelular PKA y PKC, posiblemente no son utilizadas como moduladoras de la proliferación en las células testiculares. Aunque se ha demostrado que la hormona produce un incremento en los niveles intracelulares de AMPc en las células de Sertoli (Dorrington y Fritz, 1973; Leung y Steele, 1992). Sin embargo, como en este trabajo solo se utilizaron algunos fármacos que activan esta vía, se requiere utilizar en estudios posteriores inhibidores y así descartar su participación. En cambio la vía de la PTK regula la proliferación celular ya que se ha demostrado que el TGF- β al unirse a su receptor membranal, el cual presenta actividad de tirosina cinasa, promueve la división celular en las células de Sertoli de cerdos inmaduros. Además el TGF- β , actúa de manera conjunta con la FSH en los mamíferos para promover la incorporación de timidina en el DNA (Dorrington y cols, 1993).

Al comparar la respuesta en el ovario izquierdo y testículo a los inhibidores de PTK es diferente, ya que en el testículo la herbimicina A es el único que promueve la división celular lo cual se debe a que alguna de las isoformas de las proteínas tirosinas cinasas deben de ser inhibidas (Levitzki y Gazit, 1995).

En testículo el incremento en la incorporación de ^3H -Timidina inducido por la hFSH probablemente se deba a la proliferación de las células de Sertoli, ya que se ha demostrado que estas presentan un incremento importante en la división celular durante el desarrollo embrionario del testículo fetal y neonatal en rata (Orth, 1982, 1984); asimismo son las células efectoras para la FSH en mamíferos (Dorrington y Amstrong, 1979; Means y cols, 1980; y Dorrington y cols, 1993). En el caso de las aves la hFSH *in vivo* induce un aumento en el número de células de Sertoli, un incremento en el diámetro de los túbulos seminíferos (González-Morán, 1997). También promueve la hipertrofia e hiperplasia de las células de Leydig y aumenta la respuesta estereidogénica de las células de Leydig (Saez, 1994; Lecerf y cols, 1993). De acuerdo con lo antes mencionado nosotros esperaríamos que la proliferación celular se deba a las células de Sertoli. Pero como tenemos una mezcla de todas las poblaciones testiculares. no podemos asegurar que las células que responden son estas.

En las células de ovario izquierdo y testículo se utilizaron dos tipos diferentes de hormona folículo estimulante, la hFSH HP (Serono) y hFSH recombinante, para descartar que el efecto proliferativo observado se deba a la contaminación de LH, ya que la hFSH de Serono 1mUI es equivalente a 14 ng de hFSH con 2 pg de hLH (Ulloa-Aguirre y cols, 1995). Llevando a la posibilidad que la LH actúe en las células para inducir incorporación de timidina. A pesar de ello, encontramos una misma respuesta celular en ambos tratamientos lo cual demuestra la especificidad de la hFSH para inducir

proliferación celular.

Aún cuando la hFSH no produce respuesta proliferativa en las células de ovario izquierdo de 13 días de desarrollo embrionario, es importante caracterizar las subpoblaciones celulares que presentan un alto índice proliferativo para determinar si son los mismos tipos celulares los que responden a los inhibidores y a la FSH en la misma gónada a los 18 días de desarrollo embrionario y en pollitas recién nacidas (Pedrera y cols, 1988; Alvarez-Fernández, 1994; Velázquez y cols, 1997).

Para poder demostrar cuales son las células blanco de la hormona y de los inhibidores de tirosinas cinasas en las células gonadales, las técnicas que resultarían adecuadas son gradientes de densidad, autoradiografía y Dibromodeoxiuridina (BrDu). El realizar gradientes de densidad tiene ventajas ya que nos permite obtener las subpoblaciones celulares puras para ambas gónadas, pero debido al pequeño volumen de tejido otra alternativa serian las técnicas de autoradiografía o BrDu complementadas con estudios de microscopía electrónica para caracterizar la ultraestructura celular.

También se necesitan realizar más estudios que nos permitan demostrar a que nivel de la vía de señalización de las proteínas tirosinas cinasas ocurre la inhibición de la proliferación celular. Al mismo tiempo, demostrar si la ausencia de respuesta a la FSH se debe a la activación de la PKA y/o PKC, para lo cual seria apropiado utilizar inhibidores de estas vías y determinar si hay una interacción de las vías PTK, PKA y PKC para frenar o estimular el efecto mitogénico.

CONCLUSIONES.

- Los mecanismos que regulan la proliferación celular en el ovario izquierdo y derecho son diferentes, ya que en el ovario derecho la hFSH produce un incremento en la incorporación de timidina. Sin embargo, no responden a ninguna de las sustancias utilizadas como moduladoras de las vías de señalización intracelular (PKA, PKC y PTK), lo cual puede estar asociado a la apoptosis.
- Las células de ovario izquierdo no respondieron al estímulo inducido por la hFSH. Pero la falta de respuesta hormonal no se debe a la ausencia de receptores, ya que las gonadotropinas en esta edad incrementan la secreción de 17β -estradiol y testosterona al medio de cultivo. Además, estas células solo incrementaron la replicación del DNA con los inhibidores de las tirosinas cinasas (genisteína, lavendustina y tirfostín 23), lo que indica que las PTK pueden ser uno de los posibles moduladores que controlan el efecto mitogénico de la hFSH a los 13 días de desarrollo embrionario.
- Las vías de señalización intracelular PKA y PKC no son utilizadas para inducir la proliferación celular en las células testiculares. En cuanto, al efecto de las PTK se demostró que participan en la proliferación celular, pero debido a que las células solo respondieron a la herbimicina A, consideramos que alguna isoforma de PTK intracelular se inhibe en estas células.

BIBLIOGRAFIA.

- Adachi, M; Fukuda, M. and Nishida, E. (1999). Two co-existing mechanisms for nuclear import of MAP kinase: passive diffusion of a monomer and active transport of a dimer. *EMBO. J.* 18: 5347-5358.
- Alberts, B. D; Lewis, J; Raff. M. and Watson, J.D. (1994). *Molecular Biology of the Cell.* Garland, New York and London, 3a. Edición. 721-785.
- Alvarez-Fernández, G. (1994). Caracterización de la actividad esteroidogénica en diferentes poblaciones celulares del ovario de pollo recién nacido. Tesis de Maestría. Facultad de Ciencias. UNAM. 63 p.
- Berridge M. (1993). Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature.* 361: 315-325
- Berridge M. (1997). Elementary and global aspects of calcium signalling. *J. Physiol.* 499: 291-306.
- Bockaert J. (1991). G proteins and G-protein-coupled receptors: structure, functions and interactions. *Curr. Opin. Neurobiol.* 1:32-42.
- Brown, A., Jolly, P. and Wei, H. (1998). Genistein neuroblastoma cell proliferation and differentiation through induction of apoptosis and regulation of tyrosine Kinase activity and C-myc expression. *Carcinogenesis.* Vol. 19: 991-997.
- Clapham, D.E. and Neer, J.E. (1993). New roles for G-protein $\beta\gamma$ -dimers in transmembrane signalling. *Nature.* 365:403-406.
- Darnell, J; Lodish, H. and Baltimore, D. (1994). *Molecular cell biology.* (Freeman and Compañy, Editor) 3era. Edición. New York. 709-759.
- Davis, J.S; Weakland, L; Farese, R.V. and West, L.A. (1987). Luteinizing hormone increases inositol trisphosphate and cytosolic free Ca^{++} in isolated bovine luteal cells. *J. Biol. Chem.* 262: 8515-8521.
- Davis, J.R. (1993). The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.* 268: 14553-14556.
- Dorrington, J.H. and Fritz, B. Y. (1973). Effects of gonadotropins on cyclic AMP production by isolated seminiferous tubule and interstitial cell preparations. *Endocrinology.* 94: 395- 403.

- Dorrington, J.H. and Armstrong, D.T. (1979). Effects of FSH on gonadal functions. *Recent Prog. Horm. Res.* 35: 300-333.
- Dorrington, J.H; Chuma, A.V. and Bendell, J.J. (1988). Transforming growth factor β and follicle-stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. *Endocrinology.* 123: 353-359.
- Dorrington, J.H; Bendell, J.J. and Khan, S.A. (1993). Interactions between FSH, estradiol-17 and transforming growth factor regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 44: 441-447.
- Fukuda, M; Gotoh, Y; Adachi, M. and Nishida, E. (1997). A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade. *J. Biol. Chem.* 272: 32642-32648.
- Gandrade, B. K; Davis, J.S. and May, J.V. (1991). A novel mechanism for the induction of aromatase in ovarian cells *in vitro*: role of transforming growth factor alpha-induced protein tyrosine kinase. *Endocrinology.* 129:2790-2792.
- Gilbert, A.B. (1971). The ovary. In physiology and biochemistry of the Domestic Fowl. (Bell, D. J. and Freeman, Editores). Academic Press, London and New York. 3: 1163-1208.
- Gomberg-Malool, S; Rei, Z; Levitzki, A; Posner, I. and Orly, J. (1993). Tyrphostin inhibit follicle-stimulating hormone-mediated functions in cultured rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology.* 132: 362-370.
- González-Morán, G. (1997). A stereological study of the different cell populations in chicken testes treated with follicle-stimulating hormone during embryonic development. *Anat. Histol. Embriol.* 26: 311-317.
- González del Pliego, M; González-Morán, G. and Pedernera. E. (1988). Ultrastructure of the ovarian medulla newly hatched chick treated with human chorionic gonadotropin. *Cell. Tissue Res.* 253: 665-670.
- Guichard, A; Cedard, L; Mignot, TH-M, Scheib, D. and Haffen, K. (1977). radioimmunoassay of steroids by cultured chick embryonic gonads: Differences according to age, sex and side. *Gen. Comp. Endocrinol.* 32: 255-265.
- Hamburger, V. and Hamilton, H.L. (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.* 88:49-92.

- Hepler, J.R and Gilman, A.G. (1992). G proteins. *TIBS*. 17:383-389.
- He, H; Herington, A.C. and Roupas, P (1995). Effect of protein kinase C modulation on gonadotrophin-induced granulosa cell steroidogenesis. *Reprod. Fertil. Dev.* 7: 83-95.
- Hunter, T. and Cooper, J.A. (1985). Protein-tyrosine kinases. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 897-930.
- Imataka, H; Suzuki, K; Inano, H; Kohmoto, K. and Tamaoki, B. (1988). Developmental changes of steroidogenic enzyme activities in the embryonic gonads of the chicken: The sexual difference. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 413-418.
- Jones, R.E. (1978). Evolution of the Vertebrate ovary: An overview. En *The Vertebrate Ovary Comparative Biology and Evolution*. (Richard E. J. Editor). Plenum Press, New York and London. 837-840.
- Jun-Ping, L (1996). Protein Kinase C and its substrates. *Mol. Cell. Endocrinol.* 116: 1-29.
- Koch, A; Anderson, D; Moran, M. and Pawson, T. (1991). SH2 and SH3 Domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling protein. *Science*. 252: 668-673.
- Kofman-Alfaro, S; Merchant-Larios, H. y Pérez-Palacios, G. (1982). Diferenciación sexual. I. Bases biológicas del dimorfismo sexual. *Rev. Invest. Clin.* 34: 349-359
- Kretser, D.M. and Kerr, J.B. (1988). The cytology of the testis. The physiology of reproduction. (Knobil, E. and Neill, D.L. Editores) Raven Press. New York. 837-932.
- Lavranos, C. T; Rodgers, F.H; Bertoncello, Y. and Rodgers, R. J. (1994). Anchorage-independent culture of bovine granulosa cells: The effects of basic fibroblast growth factor and dibutyryl cAMP on cell division and differentiation. *Exp. Cell. Res.* 211:245-251.
- Lecerf, L; Roviller-Fabre, V. and Habert, R. (1993). Stimulatory effect of follicle-stimulating hormone on basal and luteinizing hormone-stimulated testosterone secretions by the fetal rat testis in vitro. *Endocrinology*. 133: 2313-2318.
- Lewin, B. (1994). *Genes V*. Oxford. University Press. 319-336.

- Levitzki, A. and Gazit, A. (1995). Tyrosine kinase inhibition: An approach to drug development. *Science*. 297:1782-1787.
- Leung, C.K. and Steele, L.G. (1992). Intracellular signaling in the gonads. *Endocr. Rev.* 13: 476-491.
- Luciano, A.M. and Peluso, J.J. (1995). Effect of *in vivo* gonadotropin treatment on the ability of progesterone, estrogen and cyclic Adenosine 5' monophosphate to inhibit insulin dependent granulosa cell mitosis *in vitro*. *Biol. Reprod.* . 53, 664-669.
- Lyengar, R. (1993). Multiple families of Gs-regulated adenylyl cyclases. Advances in second messenger and protein phosphoprotein research. (Brown B.L. and Dobson P. R. Editores) Raven, New York., 27-36.
- Martin, P.M; Horwitz, B. and Willia, L. (1978). Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology*. 103: 1860-1867.
- Means, A. R; Dedman, J. S; Tash, J. S; Tindall, D. J; Sicklevan, M. and Welsh, M. J. (1980). Regulation of the testis Sertoli cell by follicle stimulating hormone. *Annu. Rev. Physiol.* 42: 59-70.
- Merchant-Larios, H. (1975). The onset of testicular differentiation in the rat: an ultrastructural study. *Am. J. Anat.* 145: 319-330.
- Merchant- Larios, H; Moreno- Mendoza, N. and Buehr, M. (1993). The role of the mesonephros in cell differentiation and morphogenesis of the mouse fetal testis. *Int. J. Dev. Biol.* 37: 407-415.
- Moreno-Mendoza, N. y Merchant-Larios, H. (1997). Desarrollo embrionario de las gónadas. En actualización Fisiología. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas . A C. México. 255-269.
- Morrison, K. H. (1995). Mechanisms Regulating Raf-1 activity in signal transduction pathways. *Mol. Reprod. Dev.* 42: 507-524.
- Nakabayashi, O; Kikuchi, H; Kikuchi, T. and Mizuno, S. (1998). Differential expresion of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinol.* 20: 193-202.
- Nakamura, T. and Tanabe Y. (1972). In vitro steroidogenesis by testes of the chicken (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 19: 432-440.

- Neer, J. E. (1995). Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 80: 249-257.
- Nishizuka, Y. (1986). Studies and perspectives of protein kinase C. *Science*. 233: 305-312.
- Orth, J. (1982). Proliferation of Sertoli cell in fetal and postnatal rats: A quantitative autoradiographic study. *Anat. Rec.* 203: 485-492.
- Orth, J. (1984). The role of Follicle-stimulating hormone in controlling Sertoli cell proliferation in testes of fetal rats. *Endocrinology*. 127: 1248-1255.
- Panyotou, G. and Waterfield, D (1993). The assembly of complexes by receptor tyrosine kinases. *BioEssays*. 15: 171-177.
- Pedernera, E; Gómez, Y; Velázquez, P; Juárez-Oropeza, M.A. and González del Pliego, M. (1988). Identification of steroidogenic cell subpoblations in the ovary of the newly hatched chicken. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 1534-162.
- Pedernera, E; Solis, A.L; Peralta, D.I. and Velázquez, P. (1999). Proliferative and steroidogenic effects of follicle - stimulating hormone chick embryo gonadal development. *Gen. Comp. Endocrinol.* 116: 213-220.
- Peluso, J.J; Pappalardo, A. and White, B.A. (1993). Control of rat granulosa cell mitosis by phorbol ester-, cyclic AMP- and estradiol 17 β -dependent pathways. *Biol. Reprod.* 49: 416-422.
- Richards, J.S. (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocr. Rev.* 15: 725-751.
- Ritzhaupt, L.K. and Bahr, J.M. (1987). A decrease in FSH receptors of granulosa cells during follicular maturation in the domestic hen. *J. Endocr.* 115: 303-310.
- Robker, R. and Richards, S.J. (1998). Hormonal control of cell cycle in ovarian cells: proliferation versus differentiation. *Biol. Reprod.* 59: 476-482
- Saez, M.J. (1994). Leydig cells: endocrines, paracrine and autocrine regulation. *Endocr. Rev.* 15: 574-635.
- Shyamal, R. and Greenwald, G. S. (1991) Mediation of follicle-stimulating hormone action on follicular deoxyribonucleic acid synthesis by epidermal growth factor. *Endocrinology*. 129: 1903-1908.

- Skyenner, K. M. (1991). Cell-cell interactions in the testis. *Endocr. Rev.* 12: 45-76
- Srivastava, A.K. (1990). Non-Receptor protein tyrosine kinase of normal tissues. *Int. J. Biochem.* 22: 1229-1234
- Solis, A. L. (1996). Efecto de la hormona folículo estimulante (FSH) sobre la división celular en gónadas de ave durante el desarrollo embrionario. Tesis de Licenciatura. Facultad de Ciencias. UNAM.
- Soria, J.E. y Arias, M. A. (1997). Señalización Intracelular por segundos mensajeros. En actualización Fisiología. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas. A C. México. 255-269.
- Sturky, P.D. and Opel, H. (1976). Reproduction in the male fertilization and early embryonic development. Avian Physiology. (Sturky, P. D. Editor) 3 era. Edic. Springer-Verlag , New York .331-374
- Tanabe , Y; Noburo, T. and Nakamura, T. (1986). Ontogenetic Steroidogenesis by testes, ovary and adrenals of embryonic and Postembryonic chickens (Gallus domesticus). *Gen. Comp. Endocrinol.* 63:456-463.
- Teng, T.C. and Teng, S.C. (1977). The hormonal regulation of steroidogenesis and Adenosine 3:5 cyclic monophosphate in embryonic chick ovary. *J. Biochem.* 162:123-134.
- Tennant, J.R. (1960). Evaluation of trypan blue technique for the determination of cell viability. *Transplantation.* 2: 685-694.
- Tilly, J.L; Kowalski, K.I; Schomberg, W.D. and Hsueh, J. W. (1992). Apoptosis in atretic ovarian follicle is associated with selective decreases in messenger ribonucleic acid transcripts for gonadotropin receptors and cytochrome P450 aromatase. *Endocrinology.* 131: 1670-1675.
- Ukeshida, A. and Fujimoto, T. (1991). A fine morphological study of germ cells in asymmetrically developing right and left ovaries of the chick. *Anat. Rec.* 230: 378-386.
- Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1990). Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity. *Cell.* 61: 203-212.
- Ulloa-Aguirre, A; Zambrano, E; Timossi, C; Olivares, E; Quintanar, A; Aguinara, M; Díaz-Cueto, L. and Méndez, J.P. (1995). On the nature of the follicle stimulating signal delivered to the ovary during exogenously controlled follicular maturation. *Arch. Med. Res.* 26 (Suppl): S219-S230.

- Velázquez, P.N; Peralta, D.I. and Pedernera, E. (1997). Proliferative effect in vitro of follicle-stimulating hormone on the left ovary of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 105: 40-49.
- Wang, T. Y; Sathyamoorthy, N. and Phang, J. M. (1996). Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathway. *Carcinogenesis.* 17: 270-275.
- Witschi, E. (1951). Embryogenesis of the adrenal and the reproductive glands. *Recent. Prog. Horm. Res.* 5: 1-23.
- Woods, J.E. and Brazzil, D.M. (1981). Plasma 17β -stradiol levels in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 44: 37-43.
- Woods, J.E. and Erton, H.L. (1978). The synthesis of estrogens in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 36: 360-370.
- Woods, J. E. and Podczaski, E. S. (1974) Androgen synthesis in the gonads of the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 24: 413-424.
- Woods, J.E. and Weeks, R.L. (1969). Ontogenesis of the pituitary-gonadal axis in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* 13: 242-254.
- Yoshimura, Y. and Tamura, Y. (1988). Effects of gonadotrophins, steroid hormones and epidermal grow factor on the *in vitro* proliferation of chicken granulosa cells. *Poultry Science.* 67: 814-818.

APENDICE.

MEDIO DE CULTIVO

Agua Bidestilada..... 10000
 DMEM..... 10 gr
 Albúmina bovina. 0.1 gr

Se ajusta el pH a 7.4 con bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 5% y se afora a 1000 ml.

SOLUCIÓN SALINA BALANCEADA (SSB) libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺.

NaCL..... 8.0 gr
 KH₂PO₄ 0.2 gr
 KCL..... 0.2 gr
 Na₂HPO₂ 1.15 gr
 Agua bidestilada..... 1000 ml
 Rojo fenol..... 4 - 5 gotas

SOLUCION DE AZUL TRIPANO

Agua bidestilada 100 ml
 Azul tripano..... 400 mg
 NaCl 0.81 gr
 K₂HPO₄ 0.60 gr
 Metil - p-OH benzoato..... 0.50 gr

TRIPSINA.

0.025 gr por cada 10 ml de Solución Salina Balanceada libre de Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺

INHIBIDOR DE TRIPSINA.

0.050 gr por cada 10 ml de DMEM+BSA

SOLUCION DE TCA 10%

TCA.....10.0 gr
 Agua Bidestilada.....100 ml

SOLUCION DE SDS 2%

SDS.....2.0 gr
 Agua bidestilada.....100 ml

RECIBIDO EN EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS Y TECNOLÓGICAS DEL IICA

APENDICE.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

AC : adenilato ciclasa
 AMPc: 3' 5' Adenosín Monofosfato cíclico
 ATP. Adenosín trifosfato
 BSA: Albúmina sérica bovina
 Dibutiril-AMPc: db-AMPc
 DAG: 1,2-Diacilglicerol
 DMEM: Medio mínimo esencial modificado por Dulbecco
 EGF: Factor de Crecimiento Epidermico
 FGF: Factor de Crecimiento Fibroblástico
 FSH: Hormona Folículo Estimulante
 GAP: Proteína de activación de la GTPasa
 GDP: Guanosín difosfato
 GDI: Inhibidor de la disociación de guanina
 GTP: Guanosín trifosfato
 hCG: Hormona gonadotropina coriónica
 IGF-I: Factor de Crecimiento semejante a la Insulina -I
 IP₃: Inositol trifosfato
 LH: Hormona Luteinizante
 MAP: Proteína activadora de mitógenos
 MAPK: Proteína activadora de mitógenos cinasa
 MAPKK: Proteína activadora de mitógenos cinasa cinasa
 PC: fosfatidilcolina
 PDGF: Factor de Crecimiento Derivado de las Plaquetas
 PE: fosfatidiletanol
 PIP₂ : Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato
 PKC: Proteína Cinasa C.
 PLA₂ : Fosfolipasa A
 PLCβ: Fosfolipasa C β
 PLD : Fosfolipasa D

PMA: Formol 12-Miristato 13-Acetato

PKA: Proteína Cinasa A.

PS: fosfatidilserina

PTK: Proteína Tirosina Cinasa

RTK: Receptor de Tirosinas Cinasas

SOS= GNRG: Factor liberador del nucleótido de guanina

SSB: Solución Salina Balanceada libre de Ca^{++} y Mg^{++}

TGF- β : Factor de Crecimiento Transformante tipo β

TGF- α : Factor de Crecimiento Transformante tipo α