

191



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

MECANISMO DE TRANSDUCCION DE SEÑAL DE LA PRL SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS EN CELULAS DE LA GRANULOSA DE RATA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
SERGIO SANCHEZ GONZALEZ



DIRECTOR DE TESIS: O.F.B. ISABEL CRISTINA MENDEZ HERNANDEZ
CODIRECTOR: DR. FERNANDO LARREA GALLO

2001



296055

FACULTAD DE CIENCIAS SECCION ESCOLAR



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. EN C. ELENA DE OTEYZA DE OTEYZA

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

"Mecanismo de transducción de señal de la PRL sobre la
esteroidogénesis en células de la granulosa de rata"
realizado por Sergio Sánchez González

con número de cuenta 9031092-8, pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

QFB. Isabel Cristina Méndez Hernández

Propietario

Dr. Fernando Larrea Galle

Propietario

Dra. Juana Alba Luis Díaz

Suplente

Dr. Guillermo Laguna Hernández

Suplente

MVZ. Agustín Carmona Castro

Consejo Departamental de Biología

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.

Dra. Patricia Ramos Morales



DEPARTAMENTO

Esta tesis se realizó en el Laboratorio de Mecanismo de Acción Hormonal del Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, bajo la tutoría de la Q.F.B. Isabel Cristina Méndez Hernández y del Dr. Fernando Larrea Gallo.

Este trabajo fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, México.

AGRADECIMIENTOS

A la Q.F.B. Isabel Cristina Méndez Hernández por su dirección y asesoramiento en las bases teóricas y prácticas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Fernando Larrea Gallo por su dirección y asesoría durante la elaboración de este trabajo.

A todas mis compañeras del Laboratorio de Mecanismos de Acción Hormonal I quienes de alguna forma estimularon mi superación personal y profesional.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Ciencias por ser fuente de formación de profesionales e investigadores.

DEDICATORIAS

A mis padres, Emilio Sánchez Reyez y Aurora González Ramírez por su apoyo y ejemplo de superación.

A mis hermanos, por su paciencia y apoyo incondicional.

A mis amigos, a los cuales no necesito mencionar, ya que han estado conmigo en los buenos y en los malos momentos como fuente de superación constante.

INDICE

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | 3 |
| OBJETIVOS | 4 |
| HIPOTESIS | 5 |
| MARCO TEORICO | 6 |
| LA PROLACTINA (PRL) | 6 |
| ESTRUCTURA DE LA PRL..... | 7 |
| ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA PRL EN LA REPRODUCCION..... | 8 |
| MECANISMO DE ACCION DE LA PRL..... | 9 |
| LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH) | 12 |
| ESTRUCTURA DE LA FSH..... | 13 |
| ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA FSH..... | 13 |
| MECANISMO DE ACCION DE LA FSH..... | 14 |
| INTERACCION DE LAS VIAS DE SEÑALIZACION DE LOS GPCR Y LOS RTK .. | 18 |
| MATERIAL Y METODOS | 20 |
| BIOENSAYO DE AROMATIZACION EN CELULAS DE LA GRANULOSA (GAB)20 | |
| DETERMINACION DE ESTRADIOL (E ₂) POR RIA..... | 22 |
| DETERMINACION DE AMPc TOTAL POR RIA..... | 24 |
| ANALISIS ESTADISTICO..... | 26 |
| RESULTADOS | 27 |
| CUANTIFICACION DE AMPc Y DE E ₂ POR RIA | 27 |
| I. SINTESIS DE AMPc Y DE E ₂ EN CELULAS DE LA GRANULOSA DE LA RATA | |
| | 28 |
| II. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS OVARICA MEDIADO | |
| POR LA ACTIVACION DE LA PKC | 29 |
| 1. <i>Síntesis de AMPc y de E₂ estimulada por la FSH y su inhibición por el TPA y la GnRH</i> | 31 |
| 2. <i>Síntesis de AMPc y de E₂ estimulada por la forskolina y su inhibición por la PRL, el TPA y la GnRH</i> | 33 |
| 3. <i>Síntesis de E₂ estimulada por el 8Br-AMPc y su inhibición por la PRL, el TPA y la GnRH</i> | 36 |
| 4. <i>Efecto de la calfastina C sobre la inhibición con la PRL y el TPA en la síntesis de AMPc y de E₂ inducida por la FSH</i> | 38 |

| | |
|---|-----------|
| III. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS OVARICA MEDIADO POR LA ACTIVACION DE PROTEINAS G | 41 |
| DISCUSION | 44 |
| CONCLUSIONES | 48 |
| APENDICE | 49 |
| BIBLIOGRAFIA | 53 |

RESUMEN

La prolactina (PRL) regula una gran cantidad de procesos fisiológicos relacionados con el crecimiento y desarrollo, la regulación del sistema inmunológico, la osmoregulación, y el sistema reproductor^{72-29,66}. Esta hormona hipofisaria ejerce sus efectos a través de la activación de receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células blanco. La activación del receptor de la PRL (RPRL) inducida por el agonista, conduce a la fosforilación en residuos de tirosina de substratos celulares, incluyendo al propio receptor, por medio de la activación de la tirosina cinasa (TK) asociada, Jak2^{9,29}. La PRL actúa sobre las funciones reproductivas de los mamíferos, incluyendo al hombre, ejerciendo principalmente un efecto inhibitorio directo sobre la esteroidogénesis testicular y ovárica^{43,44}. La esteroidogénesis inducida por la hormona folículo estimulante (FSH) en el ovario implica la participación de su receptor acoplado a proteínas G⁷⁰ (GPCR) y la expresión del gen de la citocromo P450 (CYP450) aromatasas mediada por el AMPc^{21,71}. Estudios previos en el laboratorio han demostrado el efecto inhibitorio de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la FSH, en células de la granulosa de la rata (cepa Wistar), a través de un mecanismo de señalización que media la activación de TK y de la proteína cinasa C (PKC)⁸⁰. El RPRL no tiene ninguna relación estructural o funcional directa con los GPCR y su señalización; sin embargo, existen evidencias que sugieren que las proteínas G puedan participar en el mecanismo de acción de la PRL, además de un mecanismo mediado por TK y la PKC^{82,75,45,74}.

Los resultados del presente trabajo sugieren que en las células de la granulosa de la rata en cultivo la PRL inhibe la actividad de la aromatasas inducida por la FSH probablemente a través de un mecanismo mediado por las proteínas G y a la activación de la PKC, previo y posterior a la generación de AMPc. En conclusión, el efecto inhibitorio de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica implica la participación de las proteínas G sensibles a la toxina pertusis, y es independiente de la contribución de la PKC en la vía de señalización de esta hormona. Evidenciando una comunicación intracelular entre las vías de señalización de la PRL y los GPCR.

OBJETIVOS

Objetivo general.

Estudiar el mecanismo de transducción de señal mediante el cual la PRL afecta la esteroidogénesis inducida por la FSH en las células de la granulosa de la rata en cultivo.

Objetivos particulares:

1. Evaluar la participación de las proteínas G sensibles a la toxina pertusis en el efecto de la PRL sobre la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis inducida por la FSH en las células de la granulosa de la rata en cultivo.
2. Estudiar el mecanismo de transducción de señal de la PRL a través de la activación de la PKC sobre la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis inducida por la FSH en las células de la granulosa de la rata en cultivo.

HIPOTESIS

El efecto inhibitorio de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica inducida por la FSH implica la participación de las proteínas G y de la PKC, sugiriendo la intercomunicación del RPRL con los intermediarios de la vía de transducción de señal de la FSH en las células de la granulosa de la rata.

MARCO TEORICO

LA PROLACTINA (PRL)

La PRL, la hormona del crecimiento (GH) y el lactógeno placentario (LP) comparten características estructurales (pesos moleculares y estructuras bioquímicas similares) que las incluyen dentro de una familia de hormonas que posiblemente son resultado de la duplicación de un gen ancestral común^{72,5,13}.

La PRL es una hormona proteínica de cadena simple (PM de 23 kda) codificada por un gen compuesto de cinco exones y cuatro intrones⁷². Esta hormona es principalmente sintetizada y secretada por las células lactotrópicas de la hipófisis anterior, aunque la expresión del gen de la PRL también se ha confirmado en otros tejidos tales como el cerebro, la decidua, glándula lagrimal, timo, bazo, linfocitos circulantes y células linfoides de la médula ósea, células epiteliales, tumores mamarios, fibroblastos de la piel y glándulas sudoríparas⁵. La PRL hipofisaria actúa por la clásica vía endocrina, es decir, es secretada por la hipófisis y transportada por el sistema circulatorio para actuar sobre células blanco en sitios periféricos vía receptores específicos localizados en la membrana plasmática⁹. La PRL que es producida por muchos tipos celulares puede actuar como factor de crecimiento, neurotransmisor, o inmunomodulador, de una manera autocrina o paracrina⁵.

Los procesos de síntesis y secreción de la PRL hipofisaria son principalmente regulados por la dopamina^{44,6}. Este neurotransmisor de origen hipotalámico es considerado como el inhibidor fisiológico más importante de la PRL. Otros factores hipotalámicos implicados en este proceso son GnRH-GAP, GABA y las endotelinas 1 y 2. El hipotálamo expresa también otros factores que han sido implicados en la estimulación de la secreción de la prolactina tales como la hormona liberadora de tirotrópina (TRH), la colecistoquinina y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Otros factores

relacionados con la liberación de esta hormona son los opioides, la neurotensina, la histamina, la sustancia P y la oxitocina⁶. Los estrógenos, producto de la esteroidogénesis en las gónadas y en las glándulas suprarrenales, actúan a nivel hipotálamo-hipofisis estimulando la síntesis y la secreción de la PRL, así como el crecimiento de las células productoras de esta hormona⁴⁴. Además, la PRL por sí misma modifica la actividad dopaminérgica del hipotálamo constituyendo un mecanismo de autorregulación⁷².

ESTRUCTURA DE LA PRL

La PRL es una proteína polimórfica con múltiples acciones biológicas. La versátil participación de esta hormona en diversos sistemas se deriva de tres componentes: polimorfismo estructural, producción y procesamiento local, y vías de señalización intracelular divergentes^{72,43,5}.

La PRL humana está formada por 199 residuos de aminoácidos y es estabilizada por tres puentes disulfuro intramoleculares (residuos 4-11, 58-174 y 191-199) que forman tres asas a lo largo de la estructura de la molécula¹³. La estructura tridimensional de la molécula, basada en el modelo tridimensional de la GH, consiste de cuatro α -hélices organizadas a manera de un complejo^{72,5}.

Durante los procesos de síntesis y secreción, la PRL está sujeta a modificaciones postranscripcionales y postraduccionales que dan origen a variantes estructurales y funcionales⁷². El gen de la PRL tiene varios sitios para la posible generación de empalmes alternativos que dan origen a variantes de la molécula (PRL de 21 y 28 kda). Las modificaciones postraduccionales contribuyen a la generación de formas heterogéneas de la hormona que difieren en tamaño y grupos funcionales adicionales. La hidrólisis del péptido señal, el procesamiento enzimático (formas de 16 y 22 kda de la PRL), la glicosilación, la fosforilación, la deaminación, la

generación de formas de la PRL de alto peso molecular que representan dímeros, polímeros y agregados de la PRL, y la conjugación con otras proteínas (inmunoglobulinas) son modificaciones de la PRL después de su síntesis^{72,43}.

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA PRL EN LA REPRODUCCIÓN

Dentro de las múltiples acciones descritas para la PRL, los efectos relacionados a los procesos de reproducción representan la función más conocida de esta hormona⁴⁴. A este respecto, esta hormona ejerce acciones importantes sobre el desarrollo de la glándula mamaria²⁹, en este órgano la PRL, los estrógenos, la progesterona, la insulina, los glucocorticoides y la GH, controlan el desarrollo de esta glándula durante el embarazo. El desarrollo de la glándula mamaria y el crecimiento lobuloalveolar en la etapa terminal del crecimiento de esta glándula es regulado directamente por la PRL y es la hormona responsable de la síntesis de los componentes esenciales de la leche (proteínas, lactosa y lípidos)^{5,29}.

En el ovario la PRL ejerce acciones luteotrópicas, formación y mantenimiento del cuerpo lúteo, y luteolíticas, destrucción del cuerpo lúteo. En general, las acciones luteotrópicas de la PRL involucran la estimulación de la producción de progesterona por el cuerpo lúteo. La síntesis de progesterona, en el ovario, es necesaria para la implantación del cigoto, para el mantenimiento del embarazo y para la inhibición de la ovulación⁴⁴. Este proceso es regulado por un complejo luteotrópico, en el cual la PRL actúa en coordinación con la hormona luteinizante (LH)/gonadotropina coriónica (CG) y quizás con otros factores. En los mamíferos la PRL ejerce efectos luteolíticos que dependen de la etapa del ciclo reproductivo. En las células de la granulosa, la PRL inhibe la síntesis de estrógenos y la expresión del gen CYP450 aromatasa^{42,80}. Además, la PRL tiene una gran importancia en la modulación de las etapas fisiológicas del embarazo y la lactancia^{43,9}.

En el útero, la PRL incrementa el número de receptores de la progesterona, y en consecuencia todas las acciones asociadas con esta hormona esteroide. Además, también aumenta el número de receptores estrogénicos y en conjunción con los estrógenos estimula la actividad secretora general del endometrio^{44,9}.

MECANISMO DE ACCION DE LA PRL

El paso inicial en las acciones de la PRL, como el de otras hormonas, es la unión a receptores específicos de membrana. El RPRL pertenece a la familia de receptores para citocinas clase 1, que incluye al receptor de la GH, al de varias citocinas y de algunos factores de crecimiento. Se caracterizan por presentar un dominio transmembranal simple, un dominio extracelular y un dominio citoplásmico⁹. El RPRL de rata existe en tres isoformas (resultado de empalmes alternativos del mensajero primario), que difieren en la secuencia y longitud del dominio intracelular: la isoforma larga de 591 residuos de amino ácidos, la isoforma corta de 291 residuos y la isoforma encontrada sólo en una línea celular derivada del linfoma de la rata (Nb2) con 393 residuos y que representa una forma truncada del receptor largo^{9,7,58}. Las tres isoformas se han identificado en la rata, mientras que en el humano sólo se ha identificado la isoforma larga, aunque hay evidencia de la presencia de más de una isoforma. Además, se han identificado formas solubles del receptor aunque su origen aún se desconoce⁹.

La interacción de la PRL con su receptor conduce a la activación de una cascada de eventos intracelulares caracterizados por la fosforilación de proteínas intracelulares incluyendo al propio receptor (*Figura A*). La señalización de la PRL es mediada a través de la TK asociada al RPRL conocida como Jak2. La dimerización del receptor inducida por la unión del ligando causa la autofosforilación, en residuos de tirosina, de Jak2 y la fosforilación del dominio intracelular del receptor. La cinasa activada, fosforila a otras proteínas conocidas como transductores de señal y activadores de la transcripción (Stat). De estas proteínas, Stat 1, 3 y 5 a/b son activadas

por la prolactina. Las proteínas Stat fosforiladas son translocadas hacia el núcleo donde inducen la transcripción de genes blanco al unirse a elementos de respuesta específicos llamados GAS (sitios de activación interferon- γ) en su región promotora^{43,9}.

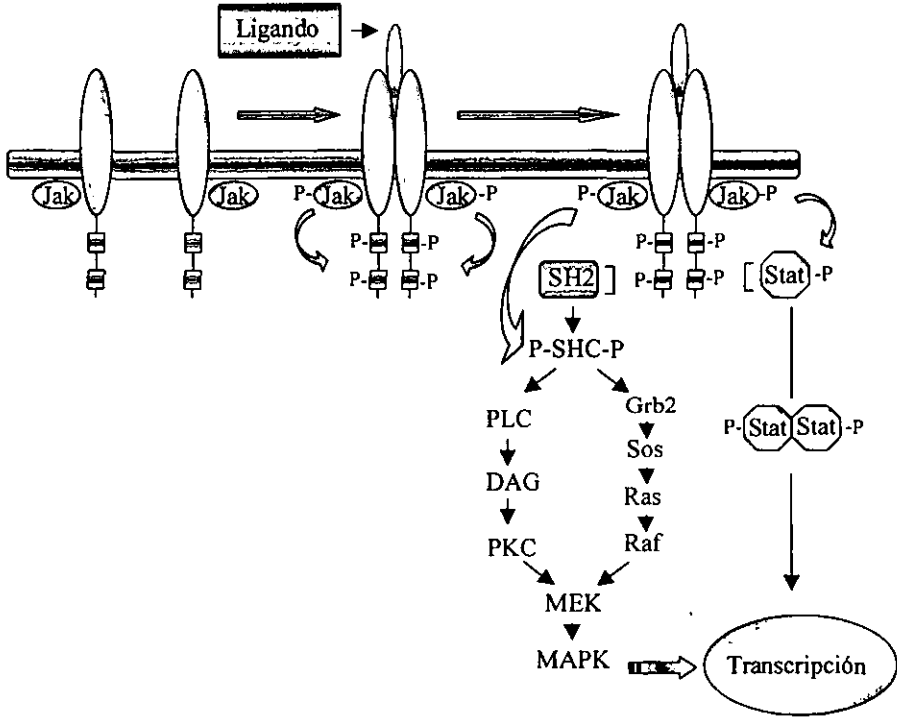


Fig. A. Vía de transducción de señal de receptores para citocinas clase 1 con actividad de TK asociada.

Además de la vía Jak-Stat otros mecanismos están también involucrados en la transducción de señal de esta proteína. La PRL activa la vía de las cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que inducen la cascada

Grb2/Sos/Ras/Raf/MAPK^{9,60}. El rol de las cinasas Src en la transducción de señal del RPRL aun no se conoce, aunque se ha sugerido su participación en la promoción del crecimiento celular⁹.

La participación de la fosfolipasa C γ (PLC γ) y de la proteína cinasa C (PKC) dependiente de fosfolípidos y activada por Ca²⁺ también se ha sugerido, aunque el significado de estas enzimas en la señalización del RPRL y sus substratos son poco entendidos⁹. La activación de la PKC conduce a la fosforilación en residuos de serina y/o treonina de múltiples blancos intracelulares iniciando varias cascadas de señalización⁵³. Esta cinasa activada actúa sobre miembros de las vías de señalización de los receptores asociados a TK (RTK) y de los GPCR y también se haya implicada en una variedad de procesos celulares tales como la diferenciación y mitogénesis, la regulación a la baja de receptores, modulación de canales iónicos, liberación de hormonas y neurotransmisores y exocitosis, así como la regulación de la expresión de genes de respuesta inmediata (genes de las familias *fos* y *jun*)⁵⁴. La activación de la PKC también puede conducir a la disminución del aumento del Ca²⁺ intracelular inducido por el inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), resultado de la activación de la vía de señalización de los fosfolípidos de inositol. La movilización de Ca²⁺ es inhibida por la PKC bloqueando la hidrólisis de fosfolípidos de inositol y la producción de IP₃ y diacilglicerol (DG). Alternativamente, la PKC estimula la liberación de calcio intracelular activando a la ATPasa transportadora de Ca²⁺ y a la proteína intercambiadora de sodio/calcio⁹.

La PRL induce la rápida fosforilación en residuos de tirosina de IRS-1 y de la subunidad de 85 kda de la fosfatidil inositol-3' cinasa (PI3K), eventos dependientes de la unión del ligando a su receptor. La activación de la PI3K puede ser mediada por Fyn en células Nb2⁹. Finalmente, se ha propuesto que la PRL induce la activación de las proteínas G heterotriméricas en células Nb2^{75,74}, en células de Leydig MA-10⁸², y sobre los mecanismos de lactogénesis de esta hormona⁴¹.

LA HORMONA FOLICULO ESTIMULANTE (FSH)

La FSH es una hormona glicoproteica de origen hipofisario que participa en la regulación de las funciones reproductivas de los mamíferos. Esta proteína es necesaria para el desarrollo gonadal en la pubertad y para la producción de gametos durante la fase fértil de la vida^{79,17,48}.

La FSH pertenece a una familia de gonadotropinas que incluye a la hormona luteinizante (LH), a la hormona estimulante de la tiroides (TSH) y a la gonadotropina coriónica (CG)^{59,65}. La FSH, al igual que la LH, es sintetizada y secretada por las células de la adenohipófisis conocidas como gonadotropos¹⁵. La síntesis y secreción de la FSH es regulada por la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) de origen hipotalámico^{85,2}. La actividad de la GnRH es regulada por factores gonadales de naturaleza esteroidea (estrógenos, progestágenos y andrógenos) influyendo directamente sobre la síntesis y secreción de la FSH^{85,83}.

Otros factores relacionados con el control de la producción y liberación de esta gonadotropina son las proteínas diméricas inhibina y activina¹⁵. La inhibina suprime selectivamente la síntesis y secreción de la FSH, mientras que la activina ejerce un efecto opuesto a la inhibina⁶³. Otro péptido supresor de la FSH es la folistatina que actúa indirectamente uniéndose y neutralizando los efectos de la activina. La inhibina, la activina y la folistatina son producidas por las gónadas y por una variedad de tejidos extragonadales como la hipófisis y el riñón, la placenta y la médula ósea (inhibina y activina), las glándulas suprarrenales, el cerebro (inhibina) y el hipotálamo. Debido a que la hipófisis tiene el potencial para sintetizar estas proteínas gonadales, es probable que puedan actuar como agentes autócrinos en la regulación de la producción de la FSH¹⁵.

ESTRUCTURA DE LA FSH

Al igual que la LH, la CG y la TSH, la FSH es una glicoproteína heterodimérica (PM de 33 kda) formada de dos subunidades, α y β ⁵⁹. La subunidad α común a otras hormonas hipofisarias y placentarias se asocia por enlaces no covalentes a la subunidad β , que es estructuralmente única en su secuencia peptídica para cada miembro de la familia de gonadotropinas. De hecho, en una misma especie animal, las subunidades α son codificadas por un mismo gen mientras que las subunidades β son originadas de diferentes genes, confiriéndole a cada hormona un alto grado de especificidad bioquímica y biológica^{23,51,27,22,38}.

La FSH es sintetizada y secretada en múltiples formas moleculares⁷⁷. Las variaciones en la estructura y distribución de los carbohidratos internos y terminales que constituyen a la molécula, así como la cantidad de ácido siálico y grupos sulfato que son unidos a la proteína madura, constituyen la base química más importante de las diferencias entre sus isoformas y son las responsables de la extensa heterogeneidad por carga que las caracteriza^{86,65,77,49}.

ACCIONES BIOLÓGICAS DE LA FSH

En el ovario la FSH, a través de sus efectos mitogénicos y esteroideogénicos, regula y mantiene procesos esenciales tales como la gametogénesis, el crecimiento y la selección de los folículos, la maduración del ovocito y la ovulación^{46,1,56,10}.

La maduración de los folículos ováricos implica una serie de estadios secuenciales: iniciación, crecimiento, selección, ovulación y luteinización. En este proceso, caracterizado por una serie de efectos regulados por diversas hormonas hipofisarias y gonadales, el folículo seleccionado (destinado a

ovular) se transforma de un folículo primordial a un folículo primario, preantral, antral y finalmente preovulatorio¹.

En la iniciación del crecimiento folicular el evento hormonal más importante es el incremento en la concentración plasmática de la FSH. Durante el desarrollo folicular la respuesta de las células de la granulosa a los estímulos hormonales cambia progresivamente¹. En las células de la granulosa de los folículos primarios la FSH regula su proliferación al modular la expresión de la molécula reguladora del ciclo celular, la ciclina D2. Cuando la maduración del folículo avanza hacia la etapa preovulatoria, la FSH induce la expresión de genes específicos de la diferenciación que codifican para la citocromo P450 aromatasa^{20,31,36,21,11,16,32,71} y para el receptor de la hormona luteinizante^{56,10}. Estos efectos pueden ser aumentados por los esteroides (estradiol, testosterona y dihidrotestosterona) y por el factor de crecimiento similar a insulina (IGF-I)¹. En la etapa antral, la FSH aumenta la síntesis de la enzima aromatasa que cataliza la conversión de andrógenos a estrógenos. La biosíntesis de estrógenos es un proceso dependiente de la acción coordinada de la FSH y la LH. La LH actúa en células de la teca regulando la producción de andrógenos, los cuales son transformados a estrógenos en las células de la granulosa mediante el proceso de la aromatización, modelo de las dos células-dos gonadotropinas¹⁸. Por otra parte, la aparición de la LH detiene la proliferación de las células de la granulosa reduciendo la expresión del mensajero para la ciclina D2, la aromatasa y el receptor de la LH, y estimula su diferenciación terminal hacia células lúteas. Aunque la LH regula a la baja la expresión de estos genes asociados con el desarrollo folicular, esta hormona induce la expresión de genes involucrados en la ovulación y luteinización^{56,10,28}.

MECANISMO DE ACCION DE LA FSH

Las acciones de la FSH son mediadas por receptores específicos localizados en la membrana plasmática de las células blanco (células de la granulosa en el ovario y células de Leydig en el testículo)^{70,79}. El receptor para

la FSH (RFSH) pertenece a la superfamilia de los GPCR⁵⁰ (Figura B). Los receptores de esta superfamilia se forman de una simple cadena polipeptídica de longitud variable caracterizada por un dominio transmembranal, formado por siete hélices- α hidrofóbicas, y por dominios intra y extracelulares de dimensiones variables según el tipo de ligando^{12,64}.

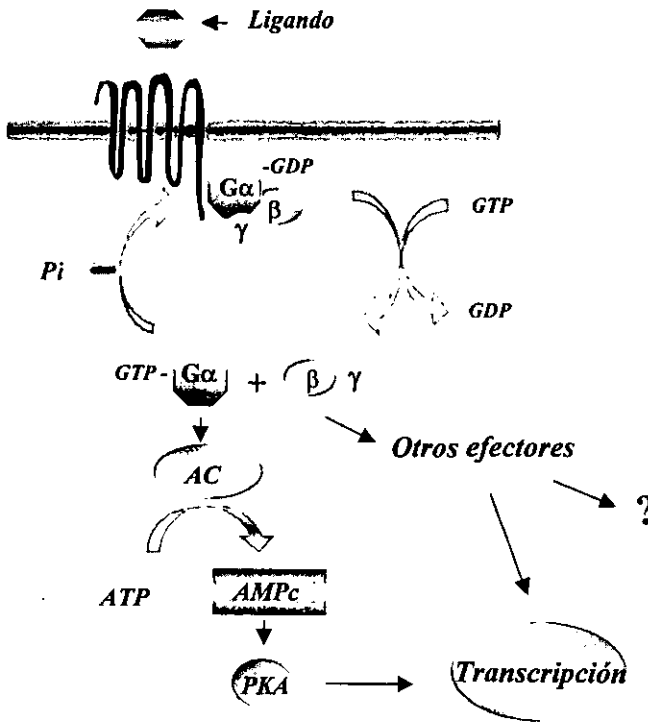


Fig. B. Vía de transducción de señal de los receptores asociados a las proteínas G heterotriméricas.

Las proteínas G son una subfamilia dentro de la superfamilia de proteínas enlazadoras de nucleótidos de guanina. Estas proteínas son moléculas

transductoras de señal, reguladas por nucleótidos de guanina, que llevan la información recibida por el receptor a efectores celulares específicos tales como enzimas y canales iónicos. Las proteínas G están formadas por tres subunidades: α , β y γ , cada una es producto de distintos genes. La subunidad α es la que muestra homología estructural y funcional con otros miembros de la superfamilia. Esta subunidad une a los nucleótidos de guanina GDP (guanosin difosfato) y GTP (guanosin trifosfato) con alta afinidad y especificidad, y posee actividad intrínseca de GTPasa. Las subunidades β y γ se encuentran asociadas (no covalentemente) formando el complejo $\beta\gamma$ funcional. La subunidad α y el complejo $\beta\gamma$ se asocian establemente sólo en el estado inactivo, cuando está unida a GDP. La interacción no covalente entre la proteína G y el receptor activado (ocupado por el agonista) conduce al intercambio de GDP por GTP en la subunidad α y la subsecuente disociación del dímero $\beta\gamma$, resultando en la generación de dos unidades capaces de regular la señalización intracelular, $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$. La actividad intrínseca de GTPasa de la subunidad $G\alpha$ media la hidrólisis de GTP a GDP y la subsecuente reasociación del complejo $G\alpha\beta\gamma$, inactivando a la proteína G^{70,73,55}.

La naturaleza de las vías de segundos mensajeros activados en respuesta a la unión del agonista con su receptor acoplado a proteínas G es esencialmente determinada por el tipo de proteína(s) G acoplada a cada receptor particular⁷³. El RFSH preferentemente se acopla a proteínas $G\alpha_s$ estimuladoras de la enzima adenilato ciclasa (AC), que induce el aumento de la síntesis de AMPc⁷⁰. El incremento intracelular del segundo mensajero generado media la activación de la cinasa dependiente de AMPc (PKA), la cual fosforila residuos de serina y/o treonina de proteínas estructurales, enzimas y activadores de la transcripción. Entre los últimos, las proteínas de unión (CREB) a elementos de respuesta a AMPc (CRE) y moduladores (CREM), conducen a la activación o represión de genes portadores de una secuencia CRE en su región promotora^{24,55}. A través de este mecanismo la FSH incrementa la expresión de genes ováricos tales como la aromatasa, la inhibina α y el receptor para la LH^{56,10,20}. Sin embargo, existen genes inducidos por la FSH en células de la granulosa que no contienen CREs en su región promotora y que son inducidos por otros factores de transcripción y elementos de respuesta. Por lo tanto

múltiples cascadas de señalización celular, además de la vía PKA, coordinan las respuestas celulares del RFSH^{70,79}.

El acoplamiento del RFSH a proteínas G α i/o (inhiben la activación de adenilato ciclasa) se ha sugerido en varios estudios, indicando que la actividad inhibitoria de estas proteínas puede negativamente modular la transducción de señal a través de la vía PKA^{70,19,67,84}.

Aunque el AMPc es el principal segundo mensajero de las acciones de la FSH, también se ha reportado un incremento en el flujo de iones de Ca²⁺ y la generación de inositol trifosfato (IP₃)^{70,81,61,26}. La generación de fosfatos de inositol estimulada por el RFSH sugiere su acoplamiento a proteínas Gq (activa PLC β). Sugiriendo la activación de la vía PLC β por el RFSH a través de un mecanismo que induce la participación del dímero G $\beta\gamma$ liberado de G α i (como ha sido demostrado para el receptor de LH/CG)^{70,30,621}.

El AMPc incrementa el Ca²⁺ intracelular movilizándolo de fuentes internas posiblemente por mecanismos que involucran cambios en los potenciales de membrana, vía canales de calcio dependientes e independientes de voltaje y mediados por el ligando, independientes de la activación de la PKC. El Ca²⁺ podría amplificar o modular la transducción de señal vía AMPc²⁶. Además, la vía de las MAPK es activada en respuesta a la FSH en las células de la granulosa de la rata de manera dependiente de la PKA⁴⁷.

Los eventos intracelulares que ocurren después de la activación del RFSH son primariamente la regulación de la función metabólica a través de la inducción/supresión de la transcripción de genes que portan una secuencia CRE en su región promotora⁷⁰.

INTERACCION DE LAS VIAS DE SEÑALIZACION DE LOS GPCR Y LOS RTK

Las proteínas cinasas y el sistema de proteínas G son mecanismos importantes de propagación y regulación de la señalización intracelular. La interacción entre los mecanismos de señalización de los GPCR y los receptores con actividad de TK asociada o intrínseca, se origina de la posibilidad de que los GPCR puedan inducir cascadas de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y de que la señalización de los RTK pueda activar a las proteínas G heterotriméricas^{45,8}.

Los mecanismos de señalización empleados por cada GPCR son determinados por la proteína ó las proteínas G con la cual interactúan y los efectores disponibles en un tipo celular particular¹². Varios ligandos que señalizan vía GPCR muestran respuestas mitogénicas, incluyendo: la estimulación de la síntesis de DNA, la expresión de oncogenes nucleares, y la proliferación celular⁸. La participación de proteínas G sensibles e insensibles a la toxina pertusis, TP ($G_{\alpha i/o}$ y $G_{\alpha s}$, $G_{\alpha q}$ respectivamente), se ha sugerido en la activación de cascadas de fosforilación por proteínas cinasas que fosforilan moléculas blanco en residuos de serina y/o treonina (activación de la vía de las cinasas reguladas por señales extracelulares, ERK1 y 2)^{25,47,8} y por TK que fosforilan en residuos de tirosina (PI3K y cinasas de la familia Src, c-Src y Fyn). Además, se ha sugerido la participación de la subunidad $G\beta\gamma$ que regula muchas moléculas efectoras (PLC β , PLA2, ACII y IV, canales de K^+ muscarínicos, y PI3K), en la transmisión de señales mitogénicas a través de intermediarios empleados por los RTK (Shc-Grb2-Sos1-p21Ras y activación final de ERK1/2)^{45,8}.

Existen evidencias que sugieren una relación estrecha entre las vías de señalización de la PRL, que actúa a través de cinasas asociadas al receptor, y de los GPCR⁴⁵. En las células Nb2, se ha sugerido que las acciones mitogénicas de la PRL sobre estas células no son mediadas por flujos de Ca^{2+} transmembranal o al incremento en el metabolismo de los fosfolípidos de inositol y activación de la PKC sino que las proteínas G participan en las acciones mitogénicas de esta hormona⁷⁵. Además, se ha propuesto que el

RPRL en las células Nb2 está acoplado con proteínas G⁷⁴. Se ha demostrado que un análogo del AMPc ([Bu]₂AMPc) y varios inhibidores de fosfodiesterasas del AMPc alteran la velocidad de formación de los productos de la leche y suprimen los efectos de la PRL en los procesos lactogénicos⁴¹. La TP, inhibidor de proteínas G α i/o, provoca la disminución significativa en la magnitud de la estimulación de la síntesis de lactosa por la PRL, sugiriendo que esta hormona actúa vía proteínas G sensibles a la TP. Una evidencia directa de los efectos de la PRL sobre las proteínas G se ha obtenido en las células de Leydig MA-10⁸² y en las células Nb2⁷⁴, en donde la PRL disminuye la habilidad de la TP para unir ADP a proteínas G membranales, indicando la interacción entre los RTK y los GPCR. Además, el desacoplamiento (desensibilización) del RFSH de las proteínas G α s, inducido por su ligando, implica la fosforilación del receptor por cinasas receptoras acopladas a proteínas G (GRK) y por la PKC que fosforilan al receptor activado en residuos de serina y/o treonina^{61,76,78}.

De esta manera, la actividad de TK intrínseca o asociada de los RTK puede ser modulada de una manera independiente del ligando por las señales mediadas por los GPCR. Por otra parte, los RTK podrían funcionar como enlaces en la señalización de los GPCR⁸. Esta convergencia en las vías de señalización representa un grado de interacción entre los RTK y los GPCR. En cada caso la activación del receptor conduce a la fosforilación de proteínas blanco, provocando la activación y/o desactivación de intermediarios celulares que darán origen a una respuesta biológica específica⁴⁵.

El conocimiento preciso del mecanismo de acción de la PRL sobre la esteroidogénesis gonadal es desconocido. La finalidad del presente trabajo, fue dilucidar a través de que mediadores intracelulares (o vías de señalización) la PRL ejerce sus efectos inhibitorios sobre la esteroidogénesis inducida por la FSH en cultivos primarios de las células de la granulosa de la rata.

MATERIAL Y METODOS

BIOENSAYO DE AROMATIZACION EN CELULAS DE LA GRANULOSA (GAB)

Reactivos:

El dietilestilbestrol (DES), L-glutamina, androstendiona, 1-metil-3-isobutilxantina (MIX), 8-bromoadenosine 3':5'-cyclic monophosphate (8Br-AMPC), phorbol 12-myristate 13-acetate (TPA), forskolina y la calfofostina C se obtuvieron de SIGMA-Aldrich (México). La FSH humana (hFSH-SIAFP-2) y la PRL humana (hPRL-RP-2) fueron donadas por el National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK) y el National Hormone and Pituitary Program (Rockville MD. USA). La GnRH (LH-RH) se obtuvo de Hoechst (Frankfurt, Germany). La toxina pertusis (TP) se obtuvo de Calbiochem (San Diego, CA). El medio McCoy 5a modificado y la penicilina-estreptomomicina se obtuvieron de GibcoBRL (Life Technologies, México).

Metodología del bioensayo:

A ratas hembras prepúberes (cepa Wistar de 21-22 días) mantenidas bajo un régimen de luz/obscuridad de 12/12 h con alimento y agua disponibles, se les implantó subcutáneamente en la región dorsal una cápsula de silastic (1 cm) conteniendo aproximadamente 10 mg de DES. Posterior a la estimulación (cuatro días) las ratas se sacrificaron por dislocación cervical y las células de la granulosa se obtuvieron por punción folicular de los ovarios previamente descapsulados en medio McCoy 5a modificado.

Los bioensayos de aromatización se realizaron de acuerdo con el método descrito por Jia X, 1984³⁹. Las células fueron cultivadas en placas de 24 pozos a una concentración de 1.5×10^5 células viables (determinadas por tinción vital con azul tripan) en 0.5 ml de medio McCoy 5a modificado, complementado

con 2 mM de L-glutamina, 0.125 μ M de DES, 10^{-6} M de androstendiona, 0.150 nM de MIX y antibióticos (10,000 UI/ml y 10 mg/ml de penicilina-estreptomicina, respectivamente).

Inmediatamente después de la siembra las células se incubaron en presencia de dosis crecientes de la hFSH (SIAFP-2) o de un activador directo de la AC (forskolina) o de un análogo no hidrolizable de AMPc (8Br-AMPc). Sobre la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis inducida con los tres activadores de la vía de la PKA en los cultivos primarios de las células de la granulosa, se evaluó el efecto de dosis crecientes de la hPRL (RP-2) o de un activador directo de la PKC (TPA) o de un activador de la PKC (GnRH).

La participación de la PKC en el mecanismo de acción de la PRL se evaluó mediante la utilización de un inhibidor específico de la PKC (calfostina C) en células incubadas con la hPRL ó el TPA y en presencia de la hFSH.

La activación de proteínas G por la PRL se evaluó en células estimuladas con la hFSH o el 8Br-AMPc, en presencia de la hPRL o de TPA y de dosis crecientes de la TP, un inhibidor de la actividad de las proteínas G α i/o.

Los cultivos se mantuvieron por 72 h a 37°C en atmósfera húmeda con 95% de aire y 5% de CO₂. Al final se cuantificaron el AMPc total y el estradiol (E₂) por radioinmunoanálisis (RIA) específicos. Cada ensayo se repitió al menos tres veces.

DETERMINACION DE ESTRADIOL (E₂) POR RIA

Reactivos:

El E₂ marcado con tritio ([2,4,6,7-³H]Oestradiol) se obtuvo de Amersham Int. (England). La resina LH-20, el carbón activado, dextran, POPOP, PPO, timerosal y la gelatina se obtuvieron de SIGMA-Aldrich (México). El NaH₂PO₄, Na₂HPO₄, NaCl, tolueno y metanol se obtuvieron de JT Baker SA. (México).

Metodología del RIA de E₂:

Las concentraciones de E₂ en los sobrenadantes de las células cultivadas en cada bioensayo se determinaron por RIA específico. Los resultados fueron expresados en ng/pozo. El procedimiento incluyó la elaboración de una curva estándar sobre la cual se interpolaron los valores de las muestras desconocidas. La curva estándar se expresó gráficamente con el programa matemático A5.2 (P.R. Edwards, 1988) propuesto por la Organización Mundial de la Salud y calibrado por el modelo de cuatro parámetros logísticos (ver apéndice).

Como estándar se utilizó el E₂ (17β-Oestradiol) no radiactivo. Alícuotas de 100 µl del estándar a una concentración de 150 nmol/L, se resuspendieron en 10 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.2 (ver apéndice) para obtener concentraciones finales de 204.8 pg/0.5 ml. Estas alícuotas se incubaron a 37°C por 30 min y de éstas se prepararon diluciones crecientes (1:2) del estándar que incluyeron dosis de 6.4 a 204.8 pg/0.5 ml.

Como antígeno (³H-E₂) se utilizó el [2,4,6,7-³H]Oestradiol marcado con tritio con una actividad específica de 87.0 Ci/mmol, y purificado por cromatografía de intercambio iónico en una columna de resina LH-20 (50 x 1 cm) equilibrada en solución (85:15) de tolueno-metanol. El ³H-E₂ purificado

se ajustó a una concentración de trabajo de 10,000 cpm/0.1 ml en amortiguador de fosfatos pH 7.2 y se incubó a 37°C por 30 min, antes de su utilización.

El anticuerpo utilizado contra E₂ se resuspendió en 10 ml de amortiguador de fosfatos pH 7.2 y se incubó a temperatura ambiente por 30 min, antes de su utilización.

De los sobrenadantes celulares en cada bioensayo se hizo una dilución 1:20 en amortiguador de fosfatos pH 7.2. Las muestras diluidas fueron analizadas por duplicado en el RIA. En cada tubo de reacción, se agregaron 0.4 ml de solución amortiguadora de fosfatos, 0.1 ml de muestra problema, 0.1 ml de ³H-E₂ (10,000 cpm) y 0.1 ml de anticuerpo (dilución final 1:70). En la curva estándar se adicionaron 0.5 ml de cada concentración, 0.1 ml de ³H-E₂, y 0.1 ml de anticuerpo. El análisis incluyó dos tubos de estimación de uniones no específicas (UNE) y dos de uniones totales (U_o). Las UNE contenían 0.6 ml de amortiguador de fosfatos y 0.1 ml de ³H-E₂, mientras que las uniones específicas con 0.5 ml de amortiguador de fosfatos, 0.1 ml de ³H-E₂ y 0.1 ml de anticuerpo.

Los tubos con las mezclas se incubaron toda la noche a 4°C. Posteriormente a cada tubo de reacción se agregaron 0.2 ml de carbón-dextran frío (0.625% de carbón activado y 0.062% de dextran en amortiguador de fosfatos pH 7.2) mantenido en agitación constante, y el análisis se mantuvo a 4°C por 30 min. Finalmente, los tubos se centrifugaron 15 min a 3,000 rpm y a 4°C. Los sobrenadantes se decantaron en viales de centelleo a los cuales se les añadieron 5 ml de líquido de centelleo (POPOP al 0.01% y PPO al 0.44% en tolueno). Cada vial se agitó vigorosamente y se dejaron reposar a temperatura ambiente por una hora. La cantidad de radiactividad unida al anticuerpo se determinó en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Packard) con una eficiencia para tritio del 68 %.

DETERMINACION DE AMPc TOTAL POR RIA

Reactivos:

El NaI¹²⁵ se obtuvo de Amersham Int. (England). La preparación de estándar (adenosin 3',5'-monofosfato cíclico), el 2'-O-monosuccinyl adenosin 3',5'-monofosfato cíclico-tirosil metil éster, la DEAE celulosa, la albúmina sérica bovina (ASB), el acetato de sodio, la trietilamina y el anhídrido acético se obtuvieron de SIGMA-Aldrich (México). El anticuerpo anti-AMPc (anti-2'-O-succinyl adenosin 3',5'-monofosfato cíclico) se obtuvo de Calbiochem (San Diego, CA).

Metodología del RIA de AMPc:

Las concentraciones de AMPc en los sobrenadantes y células de cada bioensayo se determinaron por RIA específico. Los resultados fueron expresados en pmol/pozo. El procedimiento incluyó la elaboración de una curva estándar sobre la cual se interpolaron los valores de las muestras desconocidas. La curva estándar se expresó gráficamente con el programa matemático A5.2 (P.R. Edwards, 1988) propuesto por la Organización Mundial de la Salud y calibrado por el modelo de cuatro parámetros logísticos (ver apéndice).

Como estándar se utilizó la sal sódica de adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (SIGMA) a una concentración de 20 pmol/0.2 ml. A partir de alícuotas de 5,000 fmol/ml, se prepararon diluciones crecientes (1:2) en amortiguador de acetato de sodio 5 mM pH 4.7, para obtener concentraciones finales de 2 a 250 fmol/0.05 ml.

Como antígeno (¹²⁵I-AMPc) se utilizó el 2'-O-monosuccinyl adenosin 3',5'-monofosfato cíclico-tirosil metil éster (SIGMA) marcado con NaI¹²⁵ (Amersham) por el método de cloramina T³⁵, y purificado en una columna de

intercambio iónico (DEAE celulosa, SIGMA). El ^{125}I -AMPc purificado se ajustó a una concentración final de 10,000 cpm/0.025 ml en solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM pH 6.1 y 0.1% de albúmina sérica bovina (ASB, SIGMA).

Como anticuerpo se utilizó el anti-2'-O-succinyl adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (Calbiochem) a una concentración final en tubo de 1:12,000 en solución amortiguadora de acetato de sodio 50 mM pH 6.1 y 0.1% de ASB.

Para el análisis de AMPc total las células y los sobrenadantes de los bioensayos realizados se extrajeron de las placas de cultivo. El contenido de las placas fue colectado en tubos de plástico (12x75 mm) y calentado a 93°C por 3 min, con el fin de inactivar a la fosfodiesterasa del AMPc y evitar así la degradación de este nucleótido cíclico.

Las muestras obtenidas se diluyeron 1:20 en solución amortiguadora de acetato de sodio 5 mM pH 4.7. Las muestras diluidas y los estándares se acetilaron con 0.02 ml de solución (2:1) de trietilamina-anhidrido acético (SIGMA) preparada al momento, ya que ésta solución es sensible a la humedad y a la luz. Las muestras y los estándares acetilados se analizaron por duplicado. En cada tubo de reacción se agregaron 0.05 ml de cada muestra acetilada, 0.025 ml de ^{125}I -AMPc a una concentración de 10,000 cpm/0.025 ml, y 0.025 ml de anticuerpo (dilución final 1:12,000). De los estándares se añadieron 0.05 ml de cada concentración, 0.025 ml de ^{125}I -AMPc, y 0.025 ml de anti-AMPc. Se incluyeron dos tubos de estimación de UNE y dos de Uo. Las uniones no específicas contenían 0.075 ml de solución amortiguadora de acetato de sodio 5 mM pH 4.7 y 0.025 ml de ^{125}I -AMPc, mientras que las uniones totales con 0.05 ml de solución amortiguadora, 0.025 ml de ^{125}I -AMPc y 0.025 ml de anticuerpo.

Los tubos con las mezclas se incubaron a 4°C toda la noche. Posteriormente se adicionaron 3 ml de alcohol al 96% frío (4°C) para

precipitar las proteínas (complejo antígeno-anticuerpo). Finalmente los tubos se centrifugaron por 30 min a 3,000 rpm. Los sobrenadantes fueron decantados y se determinó el contenido de radiactividad unida al anticuerpo en los inmunoprecipitados en un contador para radiaciones gamma con una eficiencia del 80 % (Crystal Plus 5,000 Packard).

ANALISIS ESTADISTICO

Cada experimento fue repetido al menos tres veces con diferentes grupos de células. Los análisis de concentración de AMPc y de E_2 se realizaron usando la prueba de t de Student pareada para la comparación de los diferentes estímulos. Las diferencias entre los grupos se consideraron estadísticamente significativas con un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

CUANTIFICACION DE AMPc Y DE E₂ POR RIA

Como se mencionó en material y métodos el AMPc y el E₂, producto de cada bioensayo, se cuantificaron por RIA específico. Todos los radioinmunoanálisis se calcularon utilizando el programa matemático A5.2 propuesto por la Organización Mundial de la Salud y calibrado por el modelo de cuatro parámetros logísticos. Los valores obtenidos para cada parámetro fueron los siguientes:

a) RIA de AMPc.

- % de unión específica (% U₀): 75.48
- Pendiente: -1.05
- Dosis al 50%: 72.21
- % de unión no específica: 3.86

b) RIA de estradiol.

- % de unión específica (% U₀): 43.67
- Pendiente: -1.15
- Dosis al 50%: 39.45
- % de unión no específica: 1.41

La sensibilidad del RIA de E₂ fue de 6.4 pg/0.5 ml y con un coeficiente de variación intra-análisis del 2.05% e inter-análisis del 10.5%. Para el RIA de AMPc la sensibilidad fue de 2 fmol/0.05 ml y con un coeficiente de variación intra- e inter-análisis del 2.17% y del 12.03% respectivamente. La consideración de estos parámetros permitió la validación de los análisis y el establecimiento de la confiabilidad de los resultados obtenidos.

I. SINTESIS DE AMPc Y DE E₂ EN CELULAS DE LA GRANULOSA DE LA RATA

Cuando las células de la granulosa de la rata fueron incubadas en presencia de dosis crecientes de la hFSH (1.25-20 mUI) a 37°C y por 72 h, se obtuvo una curva de saturación dosis-respuesta sobre la síntesis de AMPc y de E₂. Bajo estas condiciones experimentales la dosis efectiva media (ED₅₀) fue de 3.07 mUI (Figura 1).

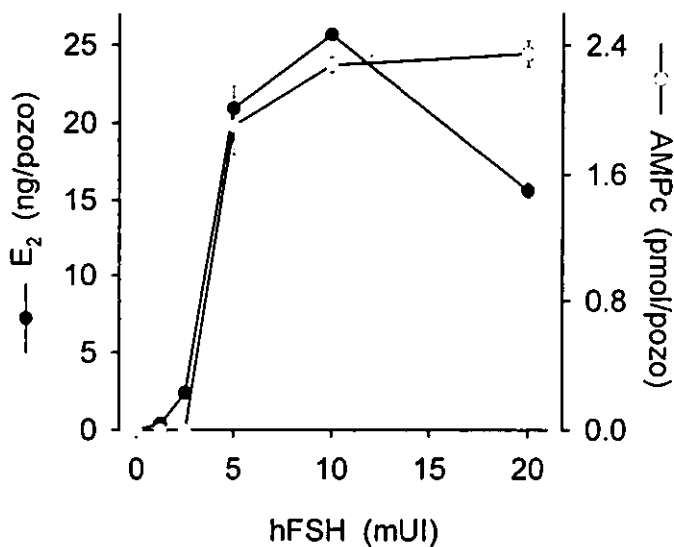


Fig. 1. Efecto dosis-respuesta de la hFSH (ED₅₀ = 3.07 mUI) sobre la síntesis de AMPc y de E₂ en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; n = 3).

Ya que la FSH ejerce sus efectos biológicos a través de la activación de la PKA, la incubación de las células en presencia de dosis crecientes de un activador específico de la AC, forskolina (2.5-20 μM), indujo también un aumento dependiente de la dosis sobre la generación de AMPc y de E_2 , con una ED_{50} de 4.38 μM (Figura 2, sección A). Así mismo, la incubación de las células con dosis crecientes de un análogo no hidrolizable del nucleótido cíclico, 8Br-AMPc (0.5-4 nM), incrementó de manera dosis-dependiente la esteroidogénesis con una ED_{50} de 1.04 mM (Figura 2, sección B).

II. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS OVARICA MEDIADO POR LA ACTIVACION DE LA PKC

Con la finalidad de evaluar el efecto de la PRL sobre la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis, dosis crecientes de la hPRL (5-250 ng/ml) se adicionaron a los cultivos primarios de las células de la granulosa incubadas en presencia de la hFSH.

Como se observa en la Figura 3, la PRL ejerció una respuesta inhibitoria de tipo dosis-dependiente sobre la generación de AMPc y de E_2 . Con una dosis inhibitoria media (ID_{50}) de 83.75 ng/ml. Concentraciones de la hPRL de entre 50 a 250 ng/ml redujeron de manera significativa, con una $p < 0.05$, la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis en las células estimuladas con 5 mUI de la hFSH.

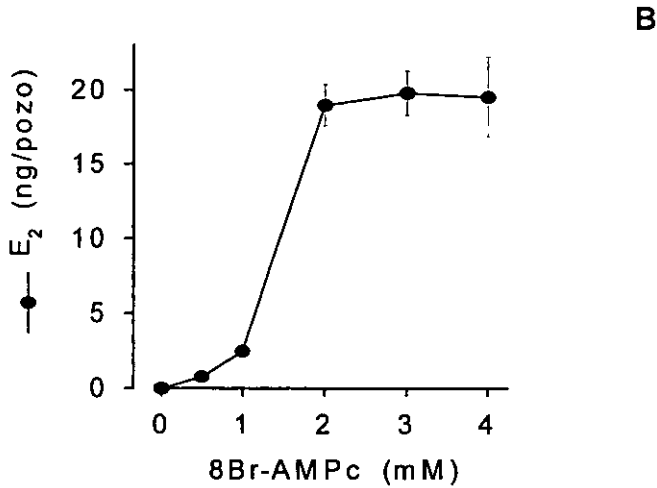
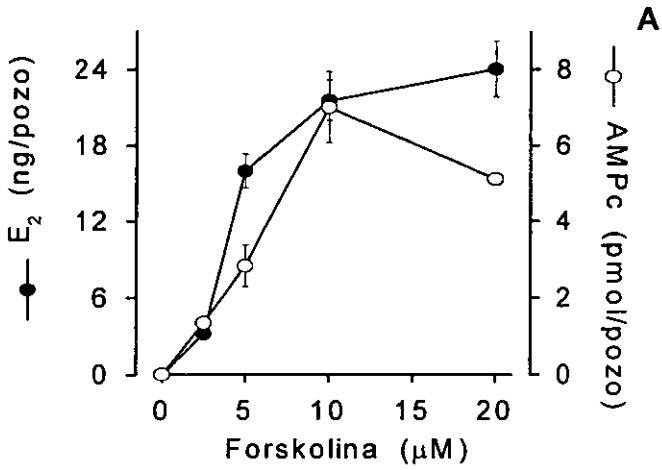


Fig. 2. Efecto dosis-respuesta de la forskolina ($\text{ED}_{50} = 4.38 \mu\text{M}$), sección A, y del 8Br-AMPC ($\text{ED}_{50} = 1.04 \text{ mM}$), sección B, sobre la síntesis de AMPc y de E_2 en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm \text{DE}$; $n = 3$).

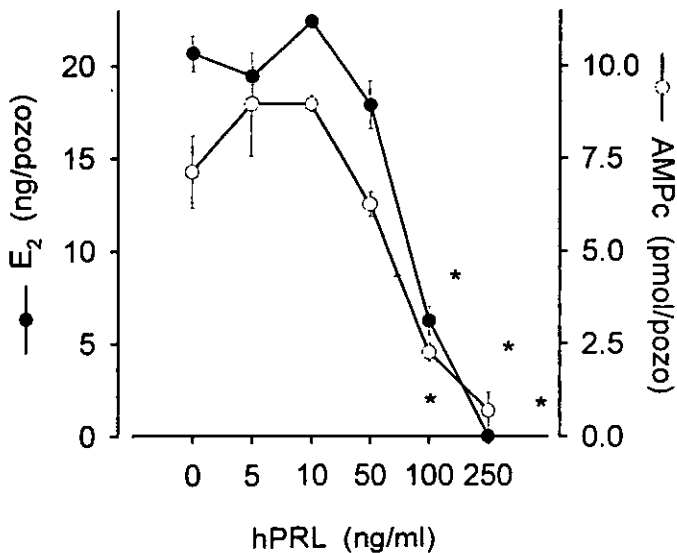


Fig. 3. Efecto dosis-dependiente de la hPRL ($ID_{50} = 83.75$ ng/ml) sobre la síntesis de AMPc y de E_2 inducida con 5 mUI de la hFSH en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control.

1. Síntesis de AMPc y de E_2 estimulada por la FSH y su inhibición por el TPA y la GnRH

Con el propósito de evaluar la participación de la PKC sobre la inhibición de la esteroidogénesis inducida por la FSH en las células de la granulosa en cultivo, en este estudio se valoró el efecto de la activación de la PKC por el TPA y por la GnRH sobre la síntesis de AMPc y de E_2 . Como se observa en la Figura 4, la adición de dosis crecientes de TPA (0.06-1 nM) a células incubadas en presencia de 5 mUI de la hFSH redujeron significativamente,

con una $p < 0.05$, y de manera dosis-dependiente, con una $ID_{50} = 0.05$ nM, la síntesis de AMPc y de E_2 .

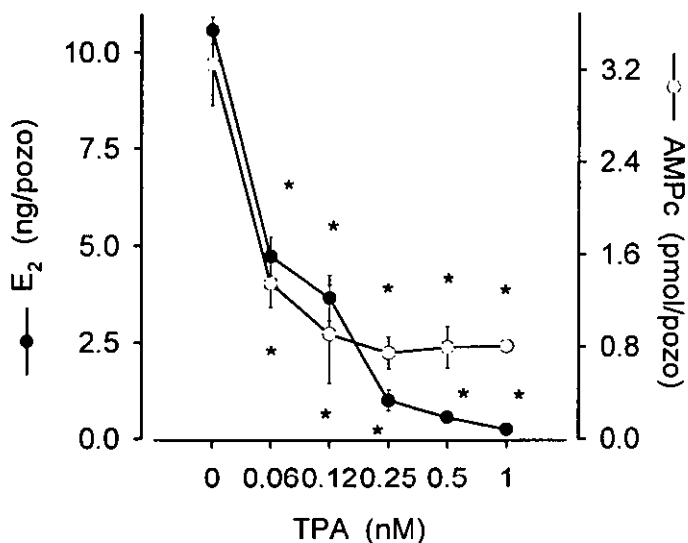


Fig. 4. Efecto de la activación de la PKC con el TPA ($ID_{50} = 0.05$ nM) sobre la síntesis de AMPc y de E_2 inducida con 5 mUI de la hFSH en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control.

Por otra parte, cuando las células de la granulosa se incubaron con dosis crecientes de la GnRH (0.5-100 nM), un modulador de la esteroidogénesis ovárica que media su acción por la activación de la PKC, la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis inducida con 5 mUI de la hFSH fue inhibida significativamente, con una $p < 0.05$, y de manera dosis-dependiente por la GnRH. La ID_{50} calculada fue de 0.7 nM (Figura 5).

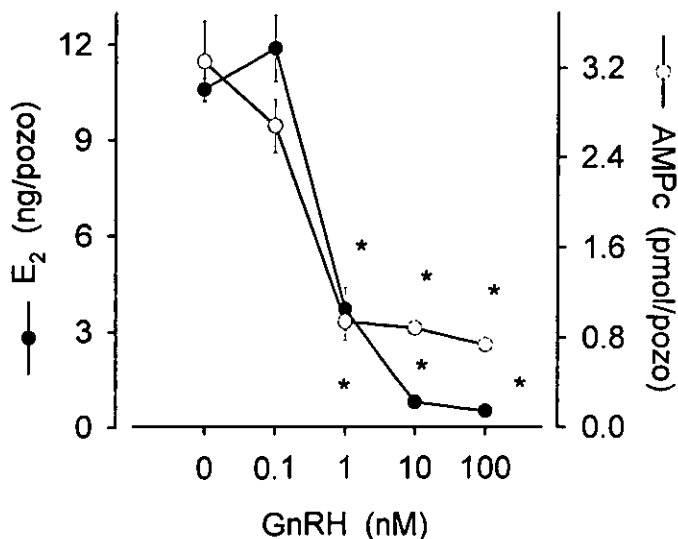


Fig. 5. Efecto dosis-dependiente de la GnRH ($ID_{50} = 0.7$ nM) sobre la síntesis de AMPc y de E_2 inducida con 5 mUI de la hFSH en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control.

2. *Síntesis de AMPc y de E_2 estimulada por la forskolina y su inhibición por la PRL, el TPA y la GnRH*

Con el fin de delinear más específicamente el sitio o los sitios de acción de la PRL sobre la vía esteroidogénica inducida por la FSH en los cultivos primarios de las células de la granulosa, se examinaron los efectos de la PRL, el TPA, y la GnRH sobre la síntesis de AMPc y de E_2 inducida por la activación directa de la AC con la forskolina. Como se muestra en la Figura 6, la adición de dosis crecientes de la hPRL (25-150 ng/ml) a las células de la granulosa cultivadas en presencia de 10 μ M de la forskolina, inhibieron

significativamente ($p < 0.05$) y de manera dosis-dependiente la síntesis de AMPc y la actividad de la aromatasa. Con una ID_{50} de 43.75 ng/ml.

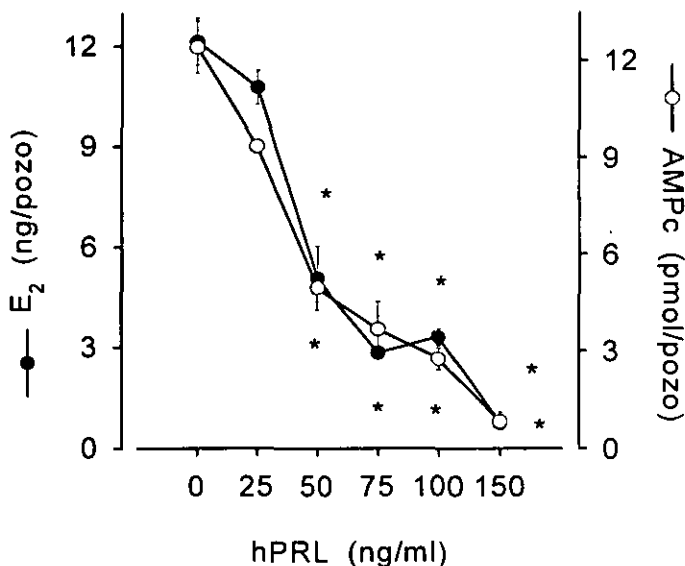


Fig. 6. Efecto dosis-dependiente de la hPRL ($ID_{50} = 43.75$ ng/ml) sobre la síntesis de AMPc y de E_2 inducida con $10 \mu M$ de la forskolina en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control.

Por otra parte, al evaluar el efecto de la activación directa de la PKC con dosis crecientes de TPA ($0.12-1$ nM) sobre la respuesta derivada de la activación directa de la AC en células estimuladas con $10 \mu M$ de la forskolina, el TPA inhibió significativamente, con una $p < 0.05$, y de manera dosis dependiente ($ID_{50} = 0.13$ nM) la formación de E_2 ; sin embargo, la síntesis de AMPc no sufrió ningún cambio significativo con respecto al control en ninguna de las dosis de TPA empleadas (Figura 7).

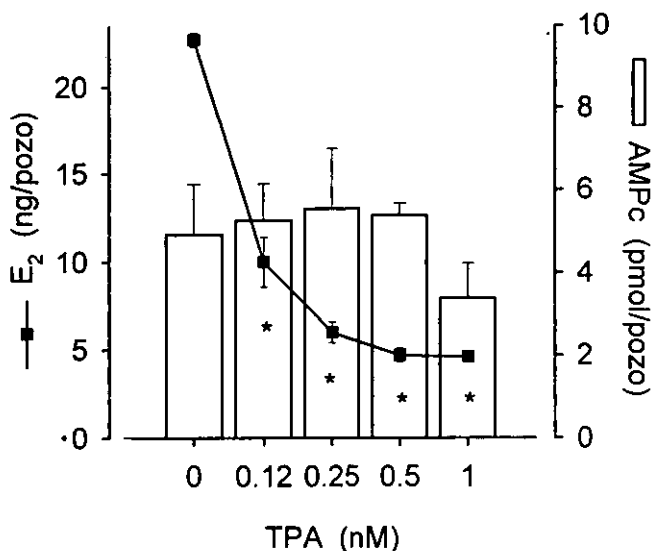


Fig. 7. Efecto de la activación de la PKC por el TPA sobre la síntesis de AMPc y de E₂ inducida con 10 μM de la forskolina en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; n = 3) *p < 0.05 vs control.

Cuando se evaluó la respuesta a la estimulación con dosis crecientes de la GnRH (0.1-100 nM) en células incubadas en presencia de 10 μM de la forskolina, la GnRH también afectó de forma significativa (p < 0.05) y de manera dosis-dependiente la síntesis de E₂, con una ID₅₀ calculada de 0.7 nM. Como se muestra en la Figura 8, en cada una de las dosis empleadas, la GnRH disminuyó la actividad de la aromatasa estimulada por la forskolina; sin embargo, la producción de AMPc no se modificó significativamente con ninguna de las dosis de la GnRH. Observándose un efecto similar al inducido por el TPA sobre la síntesis de AMPc en las células de la granulosa estimuladas también con la forskolina.

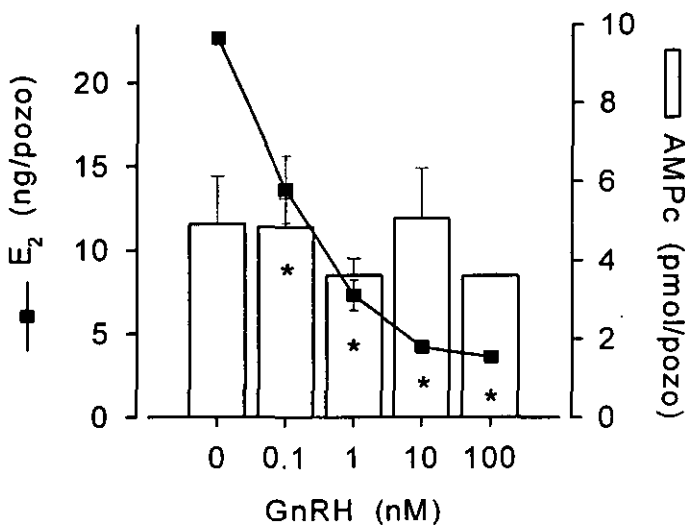


Fig. 8. Efecto de dosis crecientes de la GnRH sobre la síntesis de AMPc y de E₂ inducida con 10 µM de la forskolina en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; n = 3) *p < 0.05 vs control.

3. Síntesis de E₂ estimulada por el 8Br-AMPc y su inhibición por la PRL, el TPA y la GnRH.

Con el propósito de examinar el efecto de la PRL posterior a la generación de AMPc en la esteroidogénesis de los cultivos primarios de las células de la granulosa, se determinó la respuesta inducida por la hPRL, el TPA y la GnRH, sobre la actividad de la aromatasa estimulada con un análogo no hidrolizable del AMPc (8Br-AMPc). Como se observa en la Figura 9, la adición de tres dosis de la hPRL (75, 100 y 150 ng/ml) que mostraron inhibir (p < 0.05) la esteroidogénesis en células estimuladas con la hFSH, disminuyeron

significativamente ($p < 0.05$) y de manera dosis-dependiente ($ID_{50} = 72.2$) la producción de E_2 inducida con 2 mM de 8Br-AMPC. De igual forma, cuando se activó directamente a la PKC con dosis de 0.25, 0.5 y 1 nM de TPA, el éster de forbol provocó una disminución significativa ($p < 0.05$) y con una ID_{50} de 0.2 nM, de la esteroidogénesis en las células de la granulosa cultivadas en presencia de 2 mM del análogo de AMPC (Figura 9).

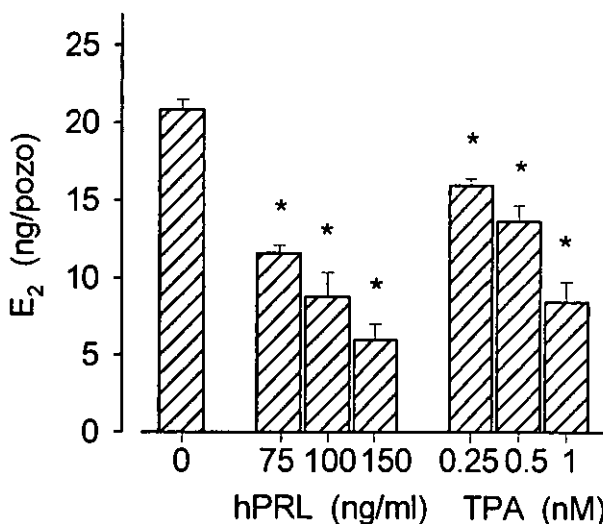


Fig. 9. Efecto de la hPRL ($ID_{50} = 72.2$ ng/ml) y de TPA ($ID_{50} = 0.2$ nM) sobre la síntesis de E_2 inducida con 2 mM de 8Br-AMPC en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control.

Cuando se evaluó el efecto de la activación de la PKC con dosis crecientes de la GnRH (0.1-100 nM) se observó una disminución significativa ($p < 0.05$) de la esteroidogénesis estimulada por el análogo de AMPC. Como se muestra

en la Figura 10, esta hormona inhibió de forma dosis-dependiente y con una ID_{50} de 0.4 nM la producción de E_2 en el cultivo primario de las células de la granulosa estimuladas con 2 mM de 8Br-AMPC.

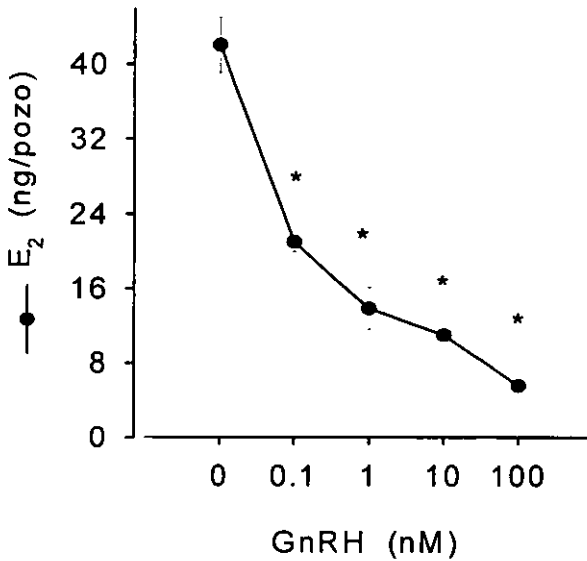


Fig. 10. Efecto dosis-dependiente de la GnRH (ID_{50} = 0.4 nM) sobre la síntesis de E_2 inducida con 2 mM de 8Br-AMPC en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; n = 3) *p < 0.05 vs control.

4. *Efecto de la calfostina C sobre la inhibición con la PRL y el TPA en la síntesis de AMPc y de E_2 inducida por la FSH.*

Para evaluar si la PRL ejerce su efecto inhibitorio sobre la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis a través de un mecanismo de señalización mediado por la participación de la PKC, se examinó la respuesta a la adición

de la calfofostina C, un inhibidor específico de la PKC, sobre el efecto de la hPRL y del TPA en células de la granulosa incubadas en presencia de la hFSH.

De esta manera, cuando se examinó el efecto de la calfofostina C (1.2-5 nM) sobre la activación directa de la PKC con 0.5 nM de TPA, en células estimuladas con 5 mUI de hFSH (Figura 11), el inhibidor de la PKC disminuyó significativamente ($p < 0.05$) la respuesta inhibitoria del éster de forbol sobre la producción de AMPc y de E_2 .

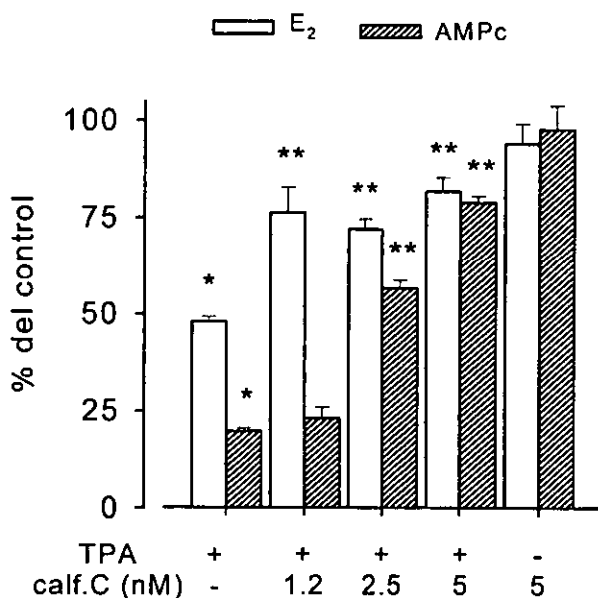


Fig. 11. Efecto de la calfofostina C sobre la inhibición con 0.5 nM de TPA de la síntesis de AMPc y de E_2 inducida con 5mUI de la hFSH en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control; ** $p < 0.05$ vs 0 calf. C.

Por otra parte, como se muestra en la Figura 12, la adición de diferentes dosis de la calfofostina C a células de la granulosa incubadas en presencia de 100 ng/ml de la hPRL y de 5 mUI de la hFSH, disminuyó significativamente ($p < 0.05$) el efecto inhibitorio de la PRL ejercido sobre la producción de AMPc y de E_2 .

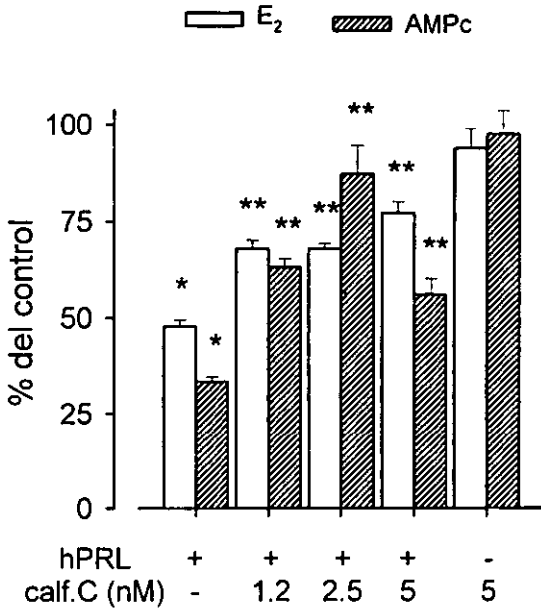


Fig. 12. Efecto de la calfofostina C sobre la inhibición con 100 ng/ml de la hPRL en la síntesis de AMPc y de E_2 inducida con 5 mUI de la hFSH en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control; ** $p < 0.05$ vs 0 calf. C.

III. EFECTO DE LA PRL SOBRE LA ESTEROIDOGENESIS OVARICA MEDIADO POR LA ACTIVACION DE PROTEINAS G

Para evaluar si el efecto de la PRL sobre la esteroidogénesis en las células de la granulosa de rata está relacionado con la activación de las proteínas G heterotrímicas, se examinó el efecto de la TP (inhibidor de la actividad de $G\alpha i/o$) sobre la inhibición con la PRL de la síntesis de AMPc y la actividad de la aromatasa inducida por la FSH, en los cultivos primarios de las células de la granulosa.

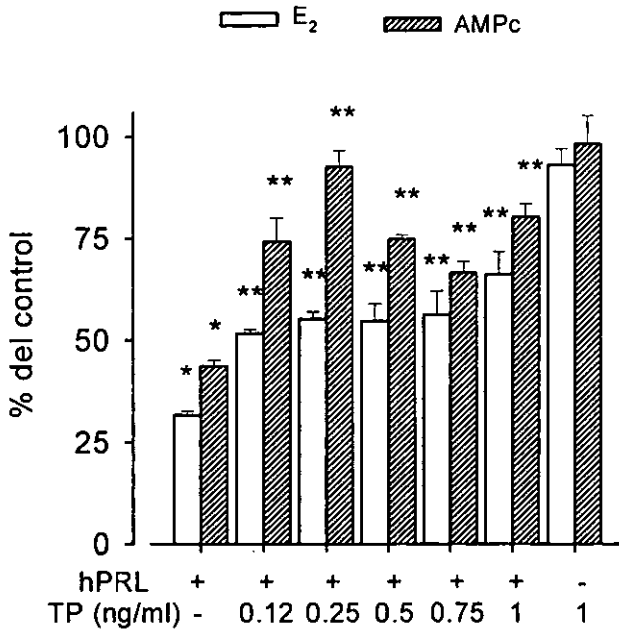


Fig. 13. Efecto de la TP sobre la inhibición con 100 ng/ml de la hPRL en la síntesis de AMPc y de E₂ inducida con 3.5 mUI de la hFSH en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; n = 3) *p < 0.05 vs control; **p < 0.05 vs 0 de TP.

Como se muestra en la Figura 13, la adición de dosis crecientes de la TP (0.12-1 ng/ml) a las células de la granulosa incubadas en presencia de 100 ng/ml de la hPRL y de 3.5 mUI de la hFSH, disminuyeron significativamente ($p < 0.05$) y con una ID_{50} de 0.15 ng/ml, el efecto inhibitorio de la hPRL sobre la producción de AMPc y la esteroidogénesis.

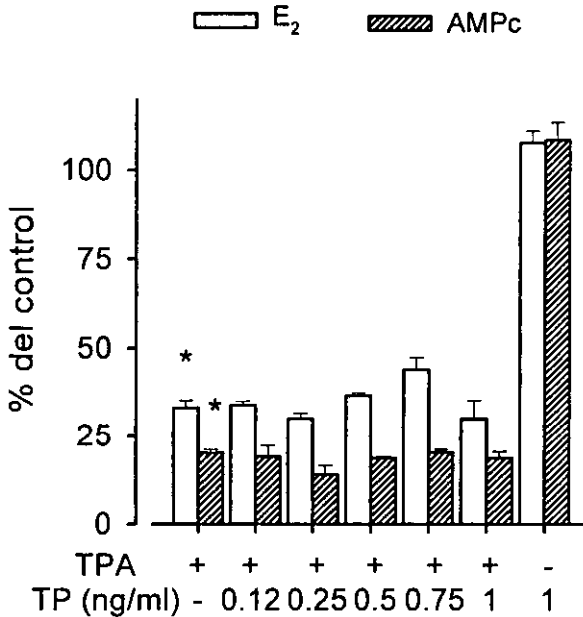


Fig. 14. Efecto de la TP sobre la inhibición con 0.25 nM de TPA en la síntesis de AMPc y de E₂ inducida con 5 mUI de la hFSH en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control.

Con la finalidad de determinar si el efecto inhibitorio que la PRL ejerce sobre la esteroidogénesis en las células de la granulosa mediante la activación de las proteínas G sensibles a la TP, constituye un mecanismo de señalización independiente de la acción de la PKC, se evaluó la respuesta a la adición de dosis crecientes de la TP (0.12-1 ng/ml) sobre la activación directa de la PKC

con 0.25 nM de TPA en células de la granulosa estimuladas con 5 mUI de la hFSH. Como se observa en la Figura 14, la presencia de la TP no ejerció ningún cambio significativo ($p > 0.05$) sobre la inhibición de la síntesis de AMPc y de E_2 causada por el TPA.

Además, cuando se evaluó el efecto de la TP en células estimuladas con 100 ng/ml de la hPRL y en presencia de 2mM del 8Br-AMPC, la adición de la TP no disminuyó la respuesta inhibitoria de la PRL sobre la actividad de la aromatasa inducida por el análogo de AMPc en las células de la granulosa en cultivo (Figura 15).

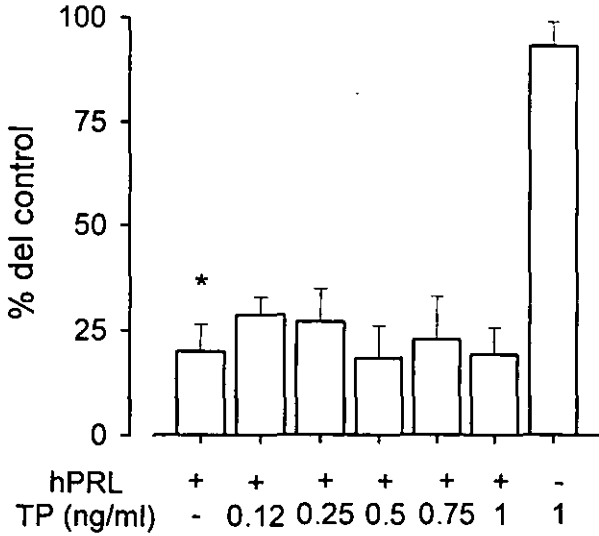


Fig. 15. Efecto de TP sobre la inhibición con 100 ng/ml de la hPRL en la síntesis de E_2 inducida con 2 mM de 8Br-AMPC en células de la granulosa en cultivo ($\bar{x} \pm DE$; $n = 3$) * $p < 0.05$ vs control.

DISCUSION

En los mamíferos, la regulación del sistema reproductivo es una de las acciones mejor estudiadas de la PRL⁴⁴. Estudios previos han demostrado un efecto inhibitorio directo de la PRL sobre la esteroidogénesis en el ovario de la rata y del humano^{42,45}. Este efecto de la PRL sobre la esteroidogénesis folicular se cree que es el resultado de una desregulación en la expresión del gen CYP450 aromatasas, provocando una disminución de la actividad biológica de la enzima. Sin embargo, el conocimiento preciso del mecanismo de acción de la PRL sobre la esteroidogénesis gonadal aún se desconoce. El propósito del presente trabajo fue estudiar el mecanismo de transducción de señal a través del cual la PRL inhibe la esteroidogénesis inducida por la FSH en las células de la granulosa de la rata en cultivo.

De acuerdo con estudios previos, los resultados del presente trabajo demuestran que la PRL inhibe de manera dosis-dependiente la síntesis de AMPc y la esteroidogénesis estimulada por la FSH y por la forskolina en los cultivos primarios de las células de la granulosa de la rata. Además, la PRL también es capaz de reducir la actividad de la aromatasas inducida por el 8Br-AMPc. Esta respuesta inhibitoria que la PRL ejerce sobre la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa de la rata, se ha establecido como el resultado de la disminución en la cantidad y la expresión del RNAm de la aromatasas⁴². Por lo tanto, estos resultados indican un efecto inhibitorio de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica en algún sitio previo y posterior al metabolismo del AMPc en las células de la granulosa de la rata en cultivo.

Recientemente se ha mostrado que los efectos inhibitorios de la PRL sobre la esteroidogénesis inducida por la FSH son mediados por la activación de la PKC⁸⁰, demostrando la importancia de la PKC en la regulación de la síntesis de hormonas esteroideas. Por otra parte, se ha demostrado que la activación de la PKC por el TPA, reduce significativamente la formación de AMPc estimulada por la FSH en las células HEK-293⁶¹ y en los cultivos primarios de las células de la granulosa⁶⁹. Además, el TPA reduce la producción de

progesterona estimulada por la FSH o la forskolina en las células GFSHR-17⁴⁰. El TPA también suprime la secreción de la progesterona y del E₂ inducida por la FSH, la forskolina y el (Bu)₂AMPc, aunque inhibe sólo la síntesis de AMPc estimulada por la FSH pero no la inducida con la forskolina en las células de la granulosa porcinas³⁷. Estos antecedentes apoyan a los resultados obtenidos en este estudio, en donde la activación directa de la PKC por el TPA en las células de la granulosa de la rata inhibe sólo la síntesis de AMPc estimulada por la hFSH o por el 8Br-AMPc, pero no la inducida con la forskolina. Mientras que la producción del E₂ fue inhibida por el TPA tanto en presencia de la hFSH como de la forskolina o del 8Br-AMPc. Un efecto similar se observó al activar a la PKC con la GnRH, un modulador de la esteroidogénesis ovárica que incrementa la actividad de esta enzima^{57,34}, en células estimuladas con los tres activadores de la vía de la PKA. La observación de que la utilización de potentes activadores de la PKC (derivados de ésteres de forbol y diacilgliceroles permeables) no afectan e incluso son capaces de incrementar la producción de AMPc estimulada por la forskolina en diversos sistemas celulares ha sugerido una interacción entre la actividad de la AC y la PKC⁶⁹. Esta observación se deriva de la demostración de que la unidad catalítica de la AC en cerebro bovino puede funcionar como substrato de la PKC *in vitro*, sugiriendo que esta enzima podría fosforilar a la AC conduciendo al incremento en la síntesis de AMPc⁵².

En este estudio, se demostró que un inhibidor específico de la PKC, calfostina C, disminuyó el efecto inhibitorio de la PRL y del TPA sobre la generación de AMPc y de E₂ inducida por la FSH. Estos resultados sustentan observaciones iniciales en las cuales la utilización de inhibidores de proteínas cinasas tales como la estaurosporina, reducen el efecto de la PRL y del TPA sobre la actividad de la aromatasas inducida por la FSH⁸⁰. La utilización de la estaurosporina ha sugerido la participación de cinasas acopladas al RFSH como parte de un mecanismo de regulación de la actividad del mismo, donde la fosforilación del receptor (en residuos de serina y/o treonina) afectaría el mecanismo de activación de la AC⁴⁰. Por otra parte, se ha demostrado que la adición de TPA a células HEK-293 estimuladas con la FSH resulta en la fosforilación y desacoplamiento (desensibilización) del RFSH conduciendo a la disminución de la habilidad del receptor para activar su sistema efector^{61,68,33}. Estas observaciones sugieren que la estimulación de la PKC por

la PRL posiblemente pueda incidir sobre la esteroidogénesis regulando la actividad del RFSH, es decir, disminuyendo el número o afinidad del RFSH o el acoplamiento del receptor a las proteínas G α s asociadas con la estimulación de la AC. Aunque la inhibición de la esteroidogénesis por la actividad de la PKC también se presenta en sitios posteriores a la generación del AMPc tal como se ha demostrado en este y en otros estudios. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo apoyan las evidencias previas que demuestran que la PRL inhibe la acumulación de AMPc y la actividad de la aromataasa, inducida por la FSH, a través de un mecanismo de señalización mediado por las TK asociadas al RPRL y a la actividad de la PKC. Sugiriendo una función fisiológica importante de la PKC en el mecanismo de acción de la PRL sobre la regulación de la actividad estrogénica en las células de la granulosa.

Las proteínas cinasas y el sistema de las proteínas G son mecanismos importantes de la propagación y regulación de la señalización intracelular. Evidencias previas han mostrado una relación estrecha entre los mecanismos de transducción de señal de los GPCR y los receptores con actividad de TK intrínseca o asociada. Esta interacción se origina de la posibilidad de que los GPCR pueden inducir cascadas de fosforilación de proteínas en residuos de tirosina y de que la señalización de los RTK pueda activar a las proteínas G heterotriméricas⁸. Aunque el RPRL no tiene ninguna relación estructural o funcional con los GPCR, no se descarta la posibilidad de que las proteínas G representen una vía adicional o alternativa para la PRL. Estudios realizados en células Nb2, donde la PRL actúa principalmente como un factor mitogénico, apoyan la idea de la participación de las proteínas G sobre el mecanismo de acción del RPRL, y muestran una asociación estrecha entre las proteínas G y el receptor⁷⁵. Adicionalmente, se demostró que la toxina del cólera (TC) y la TP modulan la proliferación inducida por la PRL en las células Nb2⁷⁴. Un efecto directo de la PRL sobre las proteínas G, se observó al demostrar que esta hormona rápidamente inhibe la activación de una proteína G de 41 kda sensible a la TC, y estimula la activación de una proteína G de 36 kda sensible a la TP³. Además, recientemente se ha observado que el GTP reduce de manera dosis-dependiente la afinidad del RPRL por su ligando en células de Leydig MA-10, y que la exposición de estas células a la PRL disminuye la habilidad de la TP para activar una proteína membranar de 44 kda⁸². En este estudio, se demostró que la adición de la TP a cultivos primarios de células de

la granulosa, disminuye el efecto inhibitorio de la PRL sobre la síntesis de AMPc y la actividad de la aromatasa estimulada por la FSH. Es importante mencionar que la TP no disminuyó el efecto de la PRL en células estimuladas con el 8Br-AMPc ni sobre la activación directa de la PKC por el TPA en células incubadas con la FSH. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo sugieren que la PRL disminuye la esteroidogénesis ovárica a través de la activación de las proteínas G sensibles a la TP ($G_{\alpha i/o}$) constituyendo un mecanismo de señalización adicional e independiente de la contribución de la PKC. Y pone en evidencia una interacción directa entre el sistema de transducción de señal del RPRL y las proteínas G sensibles a la TP.

Posteriores estudios deberán ser dirigidos a establecer la naturaleza exacta de los eventos que conducen a la activación de las proteínas G por la PRL y los sitios precisos de la acción de la PKC sobre la vía esteroidogénica en las células de la granulosa de la rata.

CONCLUSIONES

- En las células de la granulosa de la rata, la PRL inhibe la actividad de la aromatasas inducida por la FSH a través de un mecanismo de transducción de señal mediado por la activación de la PKC, previo y posterior a la generación del AMPc.
- El efecto inhibitorio de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica implica la participación de las proteínas G sensibles a la TP ($G\alpha i/o$).
- La participación de las proteínas G sensibles a la TP en el efecto inhibitorio de la PRL sobre la esteroidogénesis ovárica es independiente de la contribución de la PKC en la vía de señalización de la PRL.
- Existe una comunicación intracelular entre las vías de señalización del RPRL y los GPCR en las células de la granulosa de la rata.

APENDICE

CURVA ESTANDAR.

La curva estándar representa la relación entre el grado de unión del anticuerpo con el antígeno marcado y la concentración del estándar. Esta relación se expresó gráficamente en el laboratorio utilizando el programa matemático A5.2 (P.R. Edwards, 1988) propuesto por la Organización Mundial de la Salud. Este programa grafica el porcentaje de unión (%U), que se refiere a la relación entre la radiactividad unida al anticuerpo (U) en presencia de cada una de las dosis del estándar y la radiactividad total (CT) añadida a cada tubo de reacción por cien, contra la concentración del estándar en escala logarítmica. Calibrada por el modelo de 4 parámetros logísticos los cuales son:

- % de unión específica (% U₀), que se refiere a la cantidad de radiactividad unida al anticuerpo en ausencia de estándar y debe ser del 25 al 50%.
- Pendiente, cuyo valor debe estar en el rango de entre -0.8 y -1.2.
- Dosis al 50%, que es la dosis a la cual lo U/CT es la mitad del U₀/CT en el centro de la curva y debe ser similar de ensayo a ensayo.
- % de unión no específica (% UNE), es la cantidad de radiactividad que permanece en el tubo en ausencia de anticuerpo y cuyo valor no debe ser mayor del 4%.

CRITERIOS DE EVALUACION DEL RIA

Un RIA es confiable si los resultados expresan el contenido real de la muestra con un grado aceptable de precisión dentro de los límites de error experimental⁴. Como todo método cuantitativo los criterios de confiabilidad del RIA incluyen:

1. La precisión que se refiere al grado de variación en la cuantificación repetida de una misma muestra alrededor de la media y se expresa en términos de dispersión dentro de un análisis (variación intra-análisis) y entre n número de análisis (variación inter-análisis). La última expresión es el reflejo de la reproducibilidad del método.
2. La sensibilidad del análisis que se define como la mínima dosis detectable que es significativamente diferente de cero y permite distinguir una dosis de otra.
3. La exactitud de un análisis es el grado de acercamiento entre el valor obtenido a través del RIA y la concentración real de la muestra.
4. La especificidad de un RIA se define como el reconocimiento selectivo de la estructura química de la hormona que desea cuantificarse sin interferencia de estructuras análogas y es dependiente de la especificidad del anticuerpo.

El análisis debe incluir muestras de concentración conocida y de una misma muestra usadas como controles de calidad a lo largo de 20 a 30 ensayos. Estas muestras analizadas al menos dos veces en un mismo ensayo, por duplicado o triplicado, nos ayudan a evaluar la precisión de un análisis.

Como la precisión de la curva estándar no es uniforme, la evaluación de la precisión del análisis requiere de la consideración de dos conceptos importantes:

- a) El *coeficiente de variación intra-análisis*, el cual es un indicador de la precisión y reproducibilidad en la medición de una misma muestra a lo largo de un RIA. El valor del coeficiente de variación del ensayo no debe ser mayor del 10 %.

- b) El *coeficiente de variación inter-análisis*, es la medida de la reproducibilidad de una misma muestra a través de diferentes análisis. Esta reproducibilidad puede verse afectada por cambios en las condiciones del análisis y/o a la composición de los reactivos. Este coeficiente se calcula midiendo una o varias muestras en cada análisis y pueden ser las mismas utilizadas para el coeficiente de variación intra-análisis. Este valor no debe ser mayor del 20 %.

Generalmente cuando un grupo de muestras de control de calidad se encuentran fuera de tres valores de desviación estándar (DE) o dos grupos se encuentren fuera de dos valores de DE, o los tres se encuentren fuera de un valor de DE en las gráficas de variación del análisis, éste debe ser rechazado⁴.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS PARA RIA DE ESTEROIDES:

- 0.02 M de NaH_2PO_4
- 0.08 M de Na_2HPO_4
- 0.15 M de NaCl
- 0.01% de timerosal
- 0.1% de gelatina

La gelatina debe disolverse previamente en agua caliente (50-60°C).
Ajustar la solución a un pH de 7.2 – 7.4

BIBLIOGRAFIA

1. Amsterdam A, Rotmensch S. Structure-function relationships during granulosa cells differentiation. *Endocrine Reviews*, 1987; 8:309-337.
2. Anderson I, Milligan G, Eidne K. Characterization of the gonadotrophin-releasing hormone receptor in α T3-1 pituitary gonadotroph cells. *Journal Endocrinology*, 1993; 136:51-58.
3. Barkey J, Calvo J, Dufau M. Prolactin differentially affects bacterial toxin-induced ADP-ribosylation of Nb2 lymphoma cell membrane protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1988; 156:776-782.
4. Bedolla N, Ulloa-Aguirre, Landeros J, Pérez-Palacios G. Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. Guía para la evaluación de resultados. *Revista de Investigación Clínica*, 1984; 36:179-192.
5. Ben-Jonathan N, Mershon J, Allen D, Steinmetz R. Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocrine Reviews*, 1996; 17:639-669.
6. Ben-Jonathan N. Dopamine: A prolactin-inhibiting hormone. *Endocrine Reviews*, 1985; 6:564-589.
7. Berlanga J, Garcia-Ruiz J, Perrot-Applanat M, Kelly P, Edery M. The short form of the prolactin (PRL) receptor silences PRL induction of the β -casein gene promoter. *Molecular Endocrinology*, 1997; 11:1449-1457.
8. Biesen T, Luttrell L, Hawes B, Lefkowitz R. Mitogenic signaling via G protein-coupled receptors. *Endocrine Reviews*, 1996; 17:698-714.
9. Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly P. Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocrine Reviews*, 1998; 19:225-268.
10. Camp T, Rahal J, Mayo K. Cellular localization and hormonal regulation of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone receptor messenger RNAs in the rat ovary. *Molecular Endocrinology*, 1991; 5:1405-1417.
11. Carlone D, Richards J. Functional interactions, phosphorylation, and levels of 3',5'-cyclic adenosine monophosphate-regulatory element binding protein and steroidogenic factor-1 mediate hormone-regulated and

- constitutive expression of aromatase in gonadal cells. *Molecular Endocrinology*, 1997; 11:292-304.
12. Combarnous Y. Molecular basis of the specificity of binding of glycoprotein hormones to their receptors. *Endocrine Reviews*, 1992; 13:670-691.
 13. Cooke N, Coit D, Shine J, Baxter J, Martial J. Human prolactin. *J. Biol. Chem*, 1981; 258:4007-4016.
 14. Cutler R, Maizels E, Brooks E, et al. Regulation of δ protein kinase C during rat ovarian differentiation. *Bioch. Biophys. Acta*, 1993; 1179:260-270.
 15. Chappel S, Ulloa-Aguirre A, Coutifaris C. Biosynthesis and secretion of follicle-stimulating hormone. *Endocrine Reviews*, 1983; 4:179-211.
 16. Chen S, Zhou D, Swiderek K, et al. Structure-function studies of human aromatase. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*, 1993; 44:347-356.
 17. Dias J.A, Lindau-Shepard B, Hauer C, Auger I. Human follicle-stimulating hormone structure-activity relationships. *Biology of Reproduction*, 1998; 58:1331-1336.
 18. Dorrington J, Bendell J, Khan S. Interactions between FSH, estradiol-17 β and transforming growth factor- β regulate growth and differentiation in the rat gonad. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*, 1993; 44:441-447.
 19. Eskola V, Rannikko A, Huhtaniemi I, Warren D. Ontogeny of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory protein in the rat testis: mRNA expression and modulation of LH and FSH action. *Mol. Cell. Endocrinology*, 1994; 102:63-68.
 20. Fitzpatrick S, Richards J. Regulation of cytochrome P450 aromatase messenger ribonucleic acid and activity by steroids and gonadotropins in rat granulosa cells. *Endocrinology*, 1991; 129:1452-1462.
 21. Fitzpatrick S, Richards J. Regulation of the aromatase gene in ovarian granulosa cells and R2C Leydig cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, 1993; 44:429-433.
 22. Fujiki Y, Rathnam P, Saxena B. Studies on the disulfide bonds in human pituitary follicle-stimulating hormone. *Biochem. Biophys. Acta*, 1980; 624:428-435.
 23. Godine J, Chin W, Habener J. Alpha subunit of rat pituitary glycoprotein hormones. Primary structure of the precursor determined from the nucleotide sequence of cloned cDNAs. *J. Biology Chem*, 1982; 257:8368-8371.

24. Gonzalez-Robayna I, Alliston T, Buse P, et al. Functional and subcellular changes in the A-kinase-signaling pathway: relation to aromatase and Sgk expression during the transition of granulosa cells to luteal cells. *Molecular Endocrinology*, 1999; 13:1318-1337.
25. Gonzalez-Robayna I, Falender A, Ochsner S, et al. Follicle-stimulating hormone (FSH) stimulates phosphorylation and activation of protein kinase B (PKB/Akt) and serum and glucocorticoid-induced kinase (Sgk): evidence for A kinase-independent signaling by FSH in granulosa cells. *Molecular Endocrinology*, 2000; 14:1-18.
26. Gorczynska E, Spaliviero J, Handelsman D. The relationship between 3',5'-cyclic adenosine monophosphate and calcium in mediating follicle-stimulating hormone signal transduction in sertoli cells. *Endocrinology*, 1994; 134:293
27. Gordon D, Wood W, Ridgway E. Organization and nucleotide sequence of the mouse alpha-subunit gene of the pituitary glycoprotein hormones. *DNA*, 1988; 7:679-690.
28. Hall J, Taylor A, Martin K, et al. Decreased release of gonadotropin-releasing hormone during the preovulatory midcycle luteinizing hormone surge in normal women. *Physiology*, 1994; 91:6894-6898.
29. Hennighausen L, Robinson G, Wagner K, Liu X. Prolactin signaling in mammary gland development. *J. Biol. Chem.*, 1997; 272:7567-7569.
30. Herrlich A, Kühn B, Gorsse R. Involvement of Gs and Gi proteins in dual coupling of the luteinizing hormone receptor to adenylyl cyclase and phospholipase C. *J. Biol. Chem.*, 1996; 271:16764-16772.
31. Hickey G, Chen S, Besman M, Shively J, et al. Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology*, 1988; 122:1426-1436.
32. Hillier S, Miró F. Local regulation of primate granulosa cells aromatase activity. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.*, 1993; 44:435-439.
33. Hipkin R, Liu X, Ascoli M. Truncation of the C-terminal tails of the follitropin receptor does not impair the agonist- or phorbol ester-induced receptor phosphorylation and uncoupling. *Journal of Biol. Chem.*, 1995; 270:26683-26689.
34. Hsueh A, Jones P. Extrapituitary actions of gonadotropin-releasing hormone. *Endocrine Reviews*, 1981; 2:437-461.

35. Hunter W, Greenwood F. Preparation of iodine 131 labeled human growth hormone of high specific activity. *Nature*, 1962; 194:495-502.
36. Hickey G, Krasnow J, Beattie W, Richards J. Aromatase cytochrome P450 in rat ovarian granulosa cells before and after luteinization: adenosine 3',5'-monophosphate-dependent and independent regulation. Cloning and sequencing of rat aromatase cDNA and 5'-genomic DNA. *Molecular Endocrinology*, 1990; 4:3-12.
37. Hylka V, Kaki M, DIZerega G. Steroidogenesis of porcine granulosa cells from small and medium-sized follicles: effects of follicle-stimulating hormone, forskolin, and adenosine 3',5'-cyclic monophosphate *versus* phorbol ester. *Endocrinology*, 1989; 124:1204-1209.
38. Jameson J, Jaffe R, Gleason S, Habener J. Transcriptional regulation of chorionic gonadotropin alpha- and beta-subunit gene expression by 8-Br-adenosine 3',5'-monophosphate. *Endocrinology*, 1986; 119:2560-2567.
39. Jia X, Hsueh A. Granulosa cell aromatase bioassay for follicle-stimulating hormone: validation and application of the method. *Endocrinology*, 1986; 119:1570-1577.
40. Keren-Tal I, Dantes A, Amsterdam A. Activation of FSH-responsive adenylate cyclase by staurosporine: role for protein phosphorylation in gonadotropin receptor desensitization. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1996; 116:39-48.
41. Kodme P, Rillema J. Effects of cholera and pertussis toxins on prolactin stimulation of lactose synthesis and ornithine decarboxylase activity in mouse mammary gland explants. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1993; 203:424.
42. Krasnow J, Hickey G, Richards J. Regulation of aromatase mRNA and estradiol Biosynthesis in rat ovarian granulosa and luteal cells by prolactin. *Molecular Endocrinology*, 1990; 4:13-21.
43. Larrea F, Méndez I, Cariño C, Díaz L. Conceptos actuales sobre fisiología de la prolactina: variantes moleculares y mecanismos de acción. *Rev. Invest. Clin*, 1993; 45:375-386.
44. Larrea F, Ramos-Gordillo J, Méndez I, García R. Prolactina y reproducción. *Biología de la Reproducción, UAM-I.* 1998, 1-26 pp.
45. Larrea F, Sánchez-González S, Méndez I, García-Becerra R, et al. G protein-coupled receptors as targets for prolactin actions. *Archives of Medical Research*, 1999; 30:532-543.

46. Levallet J, Pakarinen P, Huhtaniemi I. Follicle-stimulating hormone ligand and receptor mutations, and gonadal dysfunction. *Archives of Medical Research*, 1999; 30:486-494.
47. Maizels E, Cottom J, Jones J, Hunzicker-Dunn M. Follicle stimulating hormone (FSH) activates the p38 mitogen-activated protein kinase pathway, inducing small heat shock protein phosphorylation and cell rounding in immature rat ovarian granulosa cells. *Endocrinology*, 1998; 139:3353-3356.
48. Mannaerts B, Leeuw R, Geelen J, et al. Comparative *in vitro* and *in vivo* studies on the biological characteristics of recombinant human follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, 1991; 129:2623-2630.
49. Matzuk M, Boime I. Site-specific mutagenesis defines the intracellular role of the asparagine-linked oligosaccharides of chorionic gonadotropin β subunit. *J. Biol. Chem*, 1988; 263:17106-17111.
50. Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, et al. Cloning and sequencing of human FSH receptor cDNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1991; 175:1125-1130.
51. Naylor S, Chin W, Goodman H, et al. Chromosome assignment of genes encoding the alpha and beta subunits of glycoprotein hormones in man and mouse. *Somatic Cell Genet*, 1983; 9:757-770.
52. Nikula H, Huhtaniemi I. Effects of protein kinase C activation on cyclic AMP and testosterone production of rat Leydig cells *in vitro*. *Acta Endocrinológica*, 1989; 121:327-333.
53. Nishizuka Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 1992; 258:607-613.
54. Nishizuka Y. The molecular heterogeneity of protein kinase C and its implications for cellular regulation. *Nature*, 1988; 334:661-665.
55. Nordhoff V, Gromoll J, Simoni M. Constitutively active mutations of G protein-coupled receptors: the case of the human luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone receptors. *Archives of Medical Research*, 1999; 30:501-509.
56. O'Shaughnessy P, McLelland D, McBride M. Regulation of luteinizing hormone-receptor and follicle-stimulating hormone-receptor messenger ribonucleic acid levels during development in the neonatal mouse ovary. *Biology of Reproduction*, 1997; 57:602-608.

57. Oikawa M, Dargan C, Ny T and Hsueh A. Expression of gonadotropin-releasing hormone and prothymosin- α messenger ribonuclei acid in the ovary. *Endocrinology*, 1990; 127:2350-2356.
58. Perrot-Appanat M, Gaulillo O, Pezet A, Vincent V, et al. Dominant Negative and cooperative effects of mutant forms of prolactin receptor. *Molecular Endocrinology*, 1997; 11:1020-1032.
59. Pierce J, Parsons T. Glycoprotein hormones: structure and function. *Annual Reviews Biochem*, 1981; 50:465-495.
60. Pircher T, Petersen H, Gustafsson J, et al. Extracellular signal-regulated kinase (ERK) interacts with signal transducer and activator of transcription (STAT) 5a. *Molecular Endocrinology*, 1999; 13:555-565.
61. Quintana J, Hipkin R, Sanchez-Yagüe J, Ascoli M. Follitropin (FSH) and a phorbol ester stimulate the phosphorylation of the FSH receptor in intact cells. *J. Biol. Chem*, 1994; 288:8772-8779.
62. Rajagopalan-Gupta R, Rasenick M, Hunzicker-Dunn M. Luteinizing hormone/choriogonadotropin-dependent, cholera toxin-catalyzed adenosine 5'-diphosphate (ADP)-ribosylation of the long and short forms of G α and pertussis toxin-catalyzed ADP-ribosylation of G α . *Molecular Endocrinology*, 1997; 11:538-549.
63. Reddi K, Wickings E, McNeilly A, et al. Circulating bioactive follicle stimulating hormone and immunoreactive inhibin levels during the normal human menstrual cycle. *Clinical Endocrinology*, 1990; 33:547-557.
64. Reichert L. The functional relationship between FSH and its receptor as studied by synthetic peptide strategies. *Mol. and Cell. Endocrinology*, 1994; 100:21-27.
65. Ryan R, Keutmann H, Charlesworth M, et al. Structure-function relationship of gonadotropins. *Rec. Prog. Horm. Res*, 1987; 43:383-429.
66. Sabharwal P, Glaser R, Lafuse W, Varma S, et al. Prolactin synthesized and secreted by human peripheral blood mononuclear cells: an autocrine growth factor for lymphoproliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1992; 89:7713-7719.
67. Sairam R, Jiang L, Yarney T, Khan H. Follitropin signal transduction: alternative splicing of the FSH receptor gene produces a dominant negative form of the receptor which inhibits hormone action. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1996; 226:717-722.

68. Selvaraj N, Amsterdam A. Modulation of FSH receptor phosphorylation correlates with hormone-induced coupling to the adenylate cyclase system. *Endocrine*, 1997; 6:179-185.
69. Shinohara O, Knecht M, Catt K. Inhibition of gonadotropin-induced granulosa cell differentiation by activation of protein kinase C. *Proc. Natl. Acad. Sci*, 1985; 82:8518-8522.
70. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. The follicle-stimulating hormone receptor: biochemistry, molecular biology, physiology, and pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 1997; 18:739-773.
71. Simpson E, Mahendroo M, Means G, et al. Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome p450 expression. *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol*, 1993; 44:321-330.
72. Sinha Y. Structural variants of prolactin: occurrence and physiological significance. *Endocrine Reviews*, 1995; 16:354-369.
73. Spiegel A, Shenker A, Weinstein L. Receptor-effector coupling by G proteins: implications for normal and abnormal signal transduction. *Endocrine Reviews*, 1992; 13:536-565.
74. Too C, Murphy P, Friesen H. Cross-linking of G-proteins to the prolactin receptor in rat Nb2 lymphoma cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun*, 1990; 173:48.
75. Too C, Murphy P, Friesen H. G-proteins modulate prolactin- and interleukin-2-stimulated mitogenesis in rat Nb2 lymphoma cells. *Endocrinology*, 1989; 124:2185-2192.
76. Troispoux C, Guillou F, Elalouf J, et al. Involvement of G protein-coupled receptor kinases and arrestins in desensitization to follicle-stimulating hormone action. *Molecular Endocrinology*, 1999; 13:1599-1614.
77. Ulloa-Aguirre A, Midgley A, Beitins I, Padmanabhan V. Follicle-stimulating isohormones: Characterization and physiological relevance. *Endocrine Reviews*, 1995; 16:765-787.
78. Ulloa-Aguirre A, Stanislaus D, Janovick J, Conn P. Structure-activity relationships of G protein-coupled receptors. *Archives of Medical Research*, 1999; 30:420-435.
79. Ulloa-Aguirre A, Timossi C. Structure-function relationship of follicle-stimulating hormone and its receptor. *Human Reproduction Update*, 1998; 4:260-283.
80. Villanueva L, Méndez I, Ampuero S, Larrea F. The prolactin inhibition of follicle-stimulating hormone-induced aromatase activity in cultured rat

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- granulosa cells is in part tyrosine kinase and protein kinase-C dependent. *Mol. Hum. Reprod*, 1996; 2:725-731.
81. Wayman G, Hinds T, Storm D. Hormone stimulation of type III adenylyl cyclase induces Ca^{2+} oscillations in HEK-293 cells. *J. Biol. Chem*, 1995; 270:24108-24115.
 82. Weiss-Messer E, Ber R, Barkey R. Prolactin and MA-10 leydig cell steroidogenesis: Biphasic effects of prolactin and signal transduction. *Endocrinology*, 1996; 137:5509-5518.
 83. Wierman M, Wang C. Androgen selectively stimulates FSH beta mRNA levels after GnRH antagonist administration. *Biol. Reprod*, 1990; 42:563-571.
 84. Yarney T, Jiang L, Khan H, et al. Molecular cloning, structure, and expression of a testicular follitropin receptor with selective alteration in the carboxy terminus that affects signaling function. *Mol. Reprod. Dev*, 1997; 48:458-470.
 85. Zambrano E, Olivares A, Méndez J, et al. Dynamics of basal and gonadotropin-releasing hormone-releasable serum follicle-stimulating hormone charge isiform distribution throughout the human menstrual cycle. *J. of clinical Endocrinology and Metabolism*, 1995; 80:1-10.
 86. Zambrano E, Zariñan T, Olivares A, et al. Receptor binding activity and *in vitro* biological activity of the human FSH charge isoforms as disclosed by heterologous and homologous assay systems. *Endocrine*, 1999; 10:113-121.