



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TESIS: ESTUDIO DE LA AFINIDAD Y EL AGONISMO SELECTIVO DE LAS
ISOFORMAS NATURALES Y RECOMBINANTES DE LA HORMONA FOLITROPINA
HUMANA.**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

BERNARDO CARLOS GUTIERREZ CERVANTES

CIUDAD UNIVERSITARIA, CDMX

2017





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: JESUS FERNANDO MONTIEL AGUIRRE

VOCAL: Profesor: IGNACIO CAMACHO ARROYO

SECRETARIO: Profesor: ALFREDO ULLOA AGUIRRE

1er. SUPLENTE: Profesor: PERLA DEYANIRA MALDONADO JIMENEZ

2° SUPLENTE: Profesor: IGNACIO GONZALEZ SANCHEZ

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

UNAM COORDINACION DE LA INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA, RED DE APOYO A LA INVESTIGACIÓN.

ASESOR DEL TEMA: DR. ALFREDO ANTONIO ULLOA Y AGUIRRE

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. JOSÉ LUIS MARAVILLAS MONTERO

SUSTENTANTE (S): BERNARDO CARLOS GUTIÉRREZ CERVANTES

Índice

| | |
|---|----|
| | 1 |
| 1. Introducción | 4 |
| 1.1 Planteamiento del problema | 4 |
| 1.2 Objetivos Particulares | 4 |
| 1.3 Hipótesis | 5 |
| 2 Marco Teórico | 5 |
| 2.1 Las hormonas glicoprotéicas | 5 |
| 2.2 FSH..... | 7 |
| 2.3 Receptor para FSH..... | 14 |
| 2.4 Vías de señalización estimuladas por la FSH | 17 |
| 2.5 Agonismo selectivo | 19 |
| 2.6 Resonancia de plasmón de superficie (SPR) para determinar la constante de afinidad de un ligando..... | 23 |
| 2.7 Calcio como segundo mensajero | 29 |
| 3. Materiales | 33 |
| 4 Metodología | 34 |
| 4.1 Cultivos celulares..... | 34 |
| 4.2 Resonancia de plasmón de superficie | 34 |
| 4.3 Citometría de flujo | 36 |
| 4.3.1 Medición de Calcio intracelular por citometría de flujo | 38 |
| 5. Resultados | 40 |
| 5.1 Resultados Constantes de Afinidad..... | 40 |
| 5.2 Resultados de medición de calcio intracelular..... | 44 |
| 6. Discusión | 48 |
| 7. Conclusiones..... | 54 |
| 8. Referencias | 55 |

1. Introducción

1.1 Planteamiento del problema

Se desconoce la constante de afinidad de la preparación de FSH 24 o tetraglicosilada y de su isoforma triglicosilada o FSH 21. Tampoco se conoce la actividad para liberar calcio intracelular de estos compuestos, lo cual es necesario para su estudio comparativo con sus análogos recombinante y equino ya que esto es de gran importancia para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento de la infertilidad.

1.2 Objetivos Particulares

- Implementar el cultivo de una línea celular HEK293 que expresan permanentemente el receptor silvestre de la hormona folículo estimulante (FSH) humana.
- Implementar la técnica de plasmón de superficie en el equipo Biacore T200 y analizar las constantes de afinidad de FSH equina, FSH recombinante humana o Gonal-f, FSH24 humana y FSH21 humana, obteniendo estos estudios en liposomas de células HEK293 que expresan el receptor de la FSH a altas densidades.
- Realizar experimentos *in vitro* con la línea celular HEK293 para analizar la respuesta celular en términos de liberación de calcio intracelular en respuesta a la exposición a las cuatro preparaciones de la FSH mencionada anteriormente.
- Implementar la técnica de citometría de flujo para evaluar la detección de calcio intracelular en respuesta a las isoformas de la FSH, para posteriormente realizar experimentos en para estudiar este aspecto.

1.3 Hipótesis

La estimulación de las células HEK293 que expresan el receptor para la FSH de manera estable con isoformas de su ligando natural y recombinante inducirá respuestas intracelulares como la liberación de Ca^{2+} que se correlacionarán con sus diferentes constantes de afinidad, con una mayor respuesta la preparación que posea la menor constante de afinidad.

2 Marco teórico

2.1 Las hormonas glicoprotéicas

Las gonadotropinas, hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo o folitropina (FSH) y la gonadotropina coriónica (hCG), son fundamentales en la regulación endocrina de la función gonadal y en el embarazo. La LH y FSH son sintetizadas y secretadas por los gonadótropos de la hipófisis anterior en respuesta a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) que es secretada por el hipotálamo medio basal, en tanto que la hCG es sintetizada por los trofoblastos de la placenta en desarrollo.

Las células blanco de la LH son las células de Leydig del testículo, células de la teca y del cuerpo lúteo del ovario, en tanto que para la FSH son las células de Sertoli del testículo y las de la granulosa del ovario. La hCG tiene como órgano blanco principal al cuerpo lúteo, en el que promueve la síntesis de progesterona necesaria para el desarrollo del embarazo mientras se forma e inicia esta función la placenta.

En el testículo la LH estimula la síntesis de esteroides sexuales, principalmente de testosterona, siendo este andrógeno indispensable para la gametogénesis; en el ovario esta gonadotropina regula la síntesis de andrógenos en las células de la teca y de progesterona y estradiol en las células lúteas, siendo además indispensable para la ruptura del folículo maduro y la liberación del ovocito. En las células de la granulosa del ovario, la FSH regula la síntesis de estrógenos a partir de los

andrógenos sintetizados en la célula de la teca, así como la maduración folicular, esto es, el crecimiento del folículo secundario a folículo antral. Ambas gonadotropinas controlan también la síntesis de otros factores de crecimiento y hormonas de naturaleza peptídica que a su vez regulan de forma autocrina y/o parácrina la función testicular y folicular.

Los esteroides sexuales y algunas de las hormonas producidas localmente por el estímulo gonadotrópico (por ejemplo, activinas e inhibinas) ejercen un efecto de retrocontrol negativo o positivo, tanto a nivel hipotalámico como hipofisario, en la síntesis y secreción de ambas gonadotropinas, configurándose así el circuito primario del eje regulador de la función gonadal [1, 2].

Las gonadotropinas pertenecen a la familia de las hormonas glicoproteicas, de la que es miembro también la hormona estimulante de la tiroides o tirotrópina (TSH). Estas hormonas son glicoproteínas heterodiméricas compuestas por una subunidad- α , que es común a todos los miembros de la familia, asociada mediante uniones no covalentes con una subunidad- β , que es específica para cada hormona y que le confiere a cada una sus propiedades biológicas particulares. Cada subunidad contiene 1 ó 2 cadenas de oligosacáridos unidos a residuos de asparagina (N-glicosilación); la hCG posee además una extensión en el extremo carboxilo terminal de su subunidad- β , con 4 residuos de serina glicosilados (O-glicosilación) cuyos oligosacáridos terminan en ácido siálico, lo que le confiere una vida media plasmática más prolongada y sustancialmente mayor a la del resto de las hormonas glicoproteicas [3, 4, 1, 5].

Los residuos de oligosacáridos de todas las gonadotropinas son altamente heterogéneos lo que da lugar a múltiples formas moleculares o isoformas de cada hormona [6-11].

Los oligosacáridos en las moléculas de las hormonas glicoproteicas juegan un papel importante en diversas funciones de cada hormona, incluyendo su plegamiento, heterodimerización, control de calidad, transporte y maduración conformacional intracelulares, eficiencia de su secreción y determinación de su vida media y destino metabólico en la circulación, así como en su interacción con su receptor en la célula

blanco. Además su glicación terminal diferencial permite que la proteína regule de manera fina cada una de sus propiedades, sin necesidad de un cambio en la secuencia primaria [6, 8, 12, 10, 13, 14, 11]. Las estructuras de los oligosacáridos en estas hormonas juegan también un papel importante en algunas de sus propiedades fisicoquímicas, tales como la disociación entre sus subunidades, su estabilidad térmica y las propiedades antigénicas que se han observado cuando estas estructuras son modificadas [15-18].

En resumen las gonadotropinas son fundamentales en la regulación endocrina de la función gonadal y en el embarazo, son secretadas por los gonadotropos en la hipófisis anterior en respuesta a la hormona liberadora de gonotropinas o GnRH secretada por el hipotálamo medio basal. Existen diversas células blanco para las gonadotropinas como son las células de Leydig y Sertoli en el testículo o células de la teca, cuerpo lúteo y la granulosa en el ovario, cumpliendo con diversas funciones como maduración celular, regulación y liberación de esteroides sexuales.

Las gonadotropinas pertenecen a la familia de las hormonas glicoproteicas heterodiméricas compuestas por una subunidad- α , que es común a todos los miembros de la familia, asociada mediante uniones no covalentes con una subunidad- β , que es específica para cada hormona.

2.2 FSH

La FSH humana tiene un peso molecular de 32 KDa y está compuesta por 203 residuos de aminoácidos; de éstos, 92 corresponden a la subunidad- α común y 111 a la subunidad- β [36].]. Posee 4 sitios de glicosilación en aspargina, dos en cada subunidad; en la subunidad- α los sitios de glicosilación se localizan en Asn52 y Asn78, en tanto que en la subunidad- β se encuentran en las asparginas 7 y 24 como se muestra en la figura 1 [4, 5, 36].

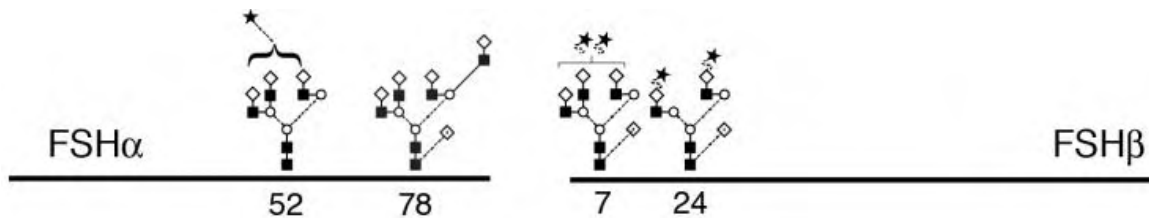


Figura 1. Sitios de glicosilación de la hormona estimulante del folículo en Asn 52 y 78 de la subunidad alfa y en Asn 7 y 24 de la subunidad beta. [92]

La glicosilación de la subunidad subunidad-β en estas asparginas es, sin embargo, variable (macroheterogeneidad de la FSH) pudiendo glicosilarse únicamente en posición 7 ó 24 (FSH triglicosilada), en ambas (FSH tetraglicosilada) o en ninguna (diglicosilada) [37], dependiendo de la etapa reproductiva de la mujer [38, 11]. En el varón la FSH es predominantemente tetraglicosilada.

Los carbohidratos de la molécula de FSH comprenden aproximadamente el 30% de la masa molecular total de la hormona [36]. Durante su síntesis, los oligosacáridos de cada antena son sujetos a un extenso procesamiento, produciéndose así una gran cantidad de variantes de cada molécula de FSH (di-, tri o tetraglicosilada) con estructuras intermedias de oligosacáridos, que se secretan a la circulación y que se excretan en la orina después de la degradación de las formas menos sializadas o desializadas en el hígado [6]. Estas variaciones estructurales en los oligosacáridos son la base química de su microheterogeneidad molecular. Como sucede con otras glicoproteínas, las estructuras de los oligosacáridos de la folitropina (y de otras hormonas glicoproteicas) son extremadamente variables y juegan un papel importante determinando diferentes propiedades de las hormonas incluyendo su vida media plasmática y su capacidad para unirse al receptor, activarlo y desencadenar una o varias señales de transducción intracelular [6, 10].

En la folitropinas humana y equina se han identificado al menos 35 diferentes tipos de oligosacáridos; en la FSH humana alrededor del 90% del total de oligosacáridos están sializados y el 10 % restante sulfatados, lo cual les confiere características funcionales particulares tales como mayor o menor vida media plasmática y por lo tanto determinada actividad biológica neta en condiciones in vivo; el ácido siálico prolonga, en tanto que los residuos de sulfato acortan la vida media de la

glicoproteína en la circulación [6, 10]. Por otro lado, se ha demostrado exhaustivamente que los residuos de carbohidratos internos al ácido siálico pueden influenciar la actividad biológica de la hormona a nivel de su célula blanco [10].

Estudios de mutagénesis dirigida y con isoformas naturales han demostrado que los oligosacáridos de la subunidad- β juegan un papel importante en la tasa de depuración plasmática de las gonadotropinas y de su potencia biológica, en tanto que el oligosacárido en posición α Asn52 es esencial para la estabilidad del dímero, la activación del receptor y la transducción de señales intracelulares [39, 16, 17]. La eliminación de este oligosacárido ya sea por métodos químicos o por mutagénesis sitio dirigida, generan moléculas de gonadotropinas con una capacidad incrementada para unirse al receptor, pero incapaces de inducir la transducción de señales intracelulares. Se desconoce con precisión porqué este sitio de glicosilación es crítico para la señalización intracelular pero no para la unión al receptor. Sin embargo, se ha informado que anticuerpos contra la hCG restauran el defecto en la inducción de señalización causado por la deglicosilación de la molécula en este sitio particular [36]. Una segunda posibilidad es que la longitud de la rama del oligosacárido Man(α 1-6)Man en el sitio α Asn52, pueda provocar interferencia estérica, disminuyendo la afinidad de la hormona para el receptor y permitiendo al mismo tiempo la flexibilidad necesaria para la transducción de la señal. Estudios recientes sobre la estructura tridimensional de la FSH completamente glicosilada en complejo con el dominio extracelular del receptor (FSHR_{HB})/FSH, predicen contactos por puentes de hidrógeno entre el residuo GlcNAc proximal en α Asn52 y β Tyr58, lo cual posiblemente contribuye a la estabilización del dímero de la hormona [23].

En este escenario, un cambio conformacional (aún leve) podría reposicionar los residuos críticos involucrados en la unión al receptor, los cuales se encuentran exactamente en la misma región del sitio de adherencia del oligosacárido. Ahora bien, el hecho de que las variantes deprivadas de α Asn52 presenten una elevada constante de afinidad, sugiere que la formación de un complejo fuertemente unido podría alterar la conformación final del complejo hormona-receptor producto de una

señal intracelular. Estudios más recientes indican, sin embargo, que el FSHR forma trímeros en la membrana celular y que cada complejo (ya sea monómero, dímero o trímero), puede unir únicamente una molécula totalmente glicosilada del agonista y favorecer la activación del receptor [23 y Ulloa-Aguirre y Zariñán, Mol. Pharmacol. 2016 doi.org/10.1124/mol.116.104398]. Este estudio sugiere que las isoformas de la FSH pueden provocar diferentes efectos sobre la conformación del trímero, lo que podría potencialmente influir en la(s) señal(es) de transducción mediadas por el FSHR. La estructura de la FSH en complejo con el ectodominio del FSHR [40], muestra que los carbohidratos tienen poca influencia en la unión de la proteína a su receptor ya que están secuestrados en la periferia del complejo y por lo tanto en la interface de unión entre FSH y el FSHR_{HB} (el dominio de unión del receptor) no hay carbohidratos; esto podría explicar por qué la desglicosilación de FSH no abroga la unión pero afecta profundamente la transducción de la señal.

El oligosacárido α Asn52 se encuentra cerca del sitio de unión del ligando con el receptor y se desconoce qué tipo de cambios o acomodamientos realiza la estructura FSHR1-250 para unir a la FSH. El que las variantes de glicosilación de la FSH provoquen efectos diversos en la transducción de señales intracelulares y respuestas biológicas en sistemas in vitro, sugiere fuertemente que la unión de FSH a su receptor provoca rearrreglos (aún desconocidos) en el dominio transmembranal del receptor y que dependiendo del rearrreglo particular se definirá la intensidad o el tipo de respuesta biológica al estímulo con la gonadotropina.

La síntesis de las variantes naturales de glicosilación de la FSH está regulada hormonalmente, principalmente por los estrógenos producidos en el ovario [41]. La producción y secreción de las variantes poco sializadas aumenta durante la fase folicular tardía y preovulatoria del ciclo menstrual y su producción es marginal después de la menopausia, lo que indica que los estrógenos regulan positivamente su producción [42]. En modelos experimentales, las variantes poco sializadas desaparecen más rápido de la circulación pero presentan mayor actividad biológica en términos de producción de AMPc, aromatización de andrógenos y producción de activador del plasminógeno tisular, tanto en sistemas in vitro como in vivo [12].

La evidencia parecería indicar que las variaciones estructurales de los oligosacáridos durante el ciclo estral y menstrual representan un mecanismo regulatorio a través del cual la hipófisis anterior modula la intensidad de la señal gonadotrópica hacia el ovario. Estudios recientes de Bousfield y cols. [37] en la Universidad de Wichita (KS, EUA), han aislado 4 grandes grupos de glicofomas de la FSH humana en la hipófisis y la orina de mujeres, de las cuales las formas tetraglicosilada y triglicosilada son las más importantes, ya que su abundancia relativa varía con la etapa reproductiva de la mujer. La forma triglicosilada [FSH21 - 21 por su masa molecular o Mr - con un solo sitio glicosilado en la subunidad- β (Asn7) y los 2 sitios en la subunidad- α (Asn52 y Asn78)] es más abundante en la etapa reproductiva (representando el 53- 72% del total de la FSH), en tanto que la tetraglicosilada (FSH24) (esto es, con glicosilación completa) se incrementa progresivamente con la edad [38].

La FSH21 tiene una vida media plasmática menor, posee una afinidad mayor para el FSHR que la forma tetraglicosilada y es más activa biológicamente en sistemas in vitro (células de la granulosa de rata y células HEK-293), en tanto que la FSH24 es más activa en osteoclastos, lo que sugiere que esta isoforma en particular podría estar involucrada en el desgaste óseo que se presenta durante la posmenopausia (Bousfield, G., comunicación personal). Las formas di-, tri- y tetraglicosiladas de la FSH natural definen la macroheterogeneidad de la FSH, en tanto que el tipo de carbohidratos terminales presentes en los oligosacáridos de cada una de estas variantes (principalmente la cantidad de ácido siálico y el número de antenas de los oligosacáridos) define la microheterogeneidad de una molécula particular de esta gonadotropina (a sea di, tri-, o tetra-glicosilada) como se aprecia en la figura 2 [6, 37].

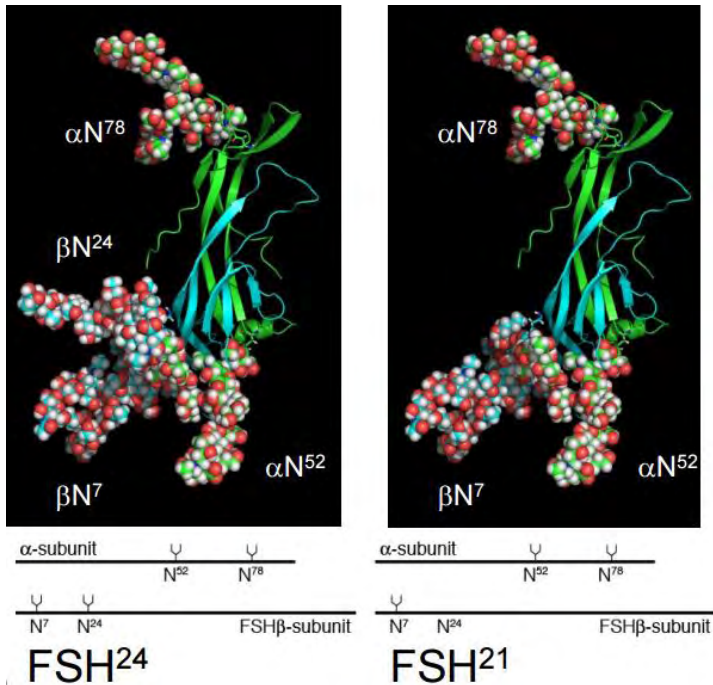


Figura 2. Estructura tridimensional de la formas tri y tetraglicosilada de la hormona folículo estimulante y sus sitios de glicosilación. [92].

Así, dos moléculas tetraglicosiladas de la FSH pueden diferir en su grado de microheterogeneidad [1]. La FSH recombinante (recFSH) producida en células CHO (células ováricas de hamster chino), es tetraglicosilada, contiene menos ácido siálico que la excretada en orina de mujeres postmenopásicas (en la que predominan las formas ricamente sializadas), presenta mayor potencia biológica in vitro (e in vivo) pero menor vida media plasmática [1, 43]. La FSH urinaria (uFSH) semeja más el perfil de formas moleculares presentes en la hipófisis que su homóloga recombinante, su vida media plasmática es más corta y su potencia biológica es menor que la forma recombinante. Aquí es importante enfatizar que estas dos formas de la FSH difieren de forma importante en su microheterogeneidad, la cual es la responsable de las diferencias en respuestas biológicas in vitro e in vitro. Recientemente se ha comercializado una nueva preparación recombinante de la FSH de larga acción y que corresponde a la recFSH tetraglicosilada a la que se le ha agregado mediante tecnología recombinante el carboxilo terminal de la hCG, el cual es rico en oligosacáridos ligados a serinas. [44]

Hasta la fecha se desconoce si esta preparación en particular es más o menos potente que las otras dos en sistemas in vitro.

Las gonadotropinas humanas han sido utilizadas desde hace varias décadas para el tratamiento de la infertilidad en la mujer. En particular, la FSH exógena, ya sea recombinante o concentrada y purificada a partir de la orina de mujeres posmenopáusicas, ha sido una herramienta fundamental en las tecnologías modernas de reproducción asistida (ART).

Existen varias preparaciones recombinantes y naturales de la FSH que son ampliamente utilizadas en programas de fertilización asistida para la hiperestimulación controlada del crecimiento folicular. Básicamente existen en el mercado 3 preparaciones que contienen únicamente FSH: a) recFSH producida en células CHO; b) Preparaciones de FSH urinaria altamente purificada de orina de mujeres postmenopáusicas; c) Una quimera compuesta por recFSH a la cual se le ha fusionado la extensión COOH-terminal de la subunidad- β de la CG (recFSH de larga acción, bautizada por el fabricante como coriofolitropina- α), la cual se encuentra ricamente sializada (ya que tiene cuatro sitios adicionales de O-glicosilación) [45-47]. Aunque la información al respecto es aún contradictoria, se ha informado que la preparación recombinante es más eficaz que la urinaria para inducir crecimiento folicular en mujeres tratadas con una u otra formulación; aparentemente se requiere de menos dosis total de recFSH y menor tiempo de administración para inducir desarrollo folicular múltiple [45-47].

Los resultados en términos de tasa de embarazo han sido contradictorios; un metaanálisis de 18 estudios publicados en el 2002 reveló que las preparaciones recombinantes dieron lugar a tasas de embarazo mayores que la preparación urinaria, en tanto que otro posterior (2004, 5 estudios)[45, 46], no reveló ninguna diferencia en este parámetro. A pesar de estos estudios, no existe todavía una respuesta a la pregunta de cuál preparación es la óptima para estimular el desarrollo folicular y la maduración ovocitaria y si estas diferentes preparaciones (natural vs recombinante) presentan agonismo selectivo y/o estimulan o inhiben diferencialmente la transcripción de genes regulados por la FSH, ya que aunque

básicamente son tetraglicosiladas, todas ellas difieren entre sí en su grado de microheterogeneidad.

La información relacionada con la eficacia comparativa de la coriolfolitropina- α vs recFSH y uFSH, tanto in vivo como in vitro es muy escasa ya que esta preparación fue introducida en el mercado recientemente. Dilucidar parcial o totalmente estas preguntas no es un aspecto trivial que pueda ser aplicado únicamente al tratamiento para la infertilidad.

Estudios recientes han sugerido que la FSH puede ejercer efectos extraováricos (por ejemplo en hueso, regulando la actividad de los osteoclastos [48, 49], angiogénicos [50] y promotores del crecimiento e invasión del cáncer epitelial del ovario [51, 52]). El conocimiento de la relación estructura-actividad de las diferentes formulaciones de la FSH (incluyendo las formas naturales di-, tri- y tetraglicosiladas) y de pequeñas moléculas con actividad gonadotrópica o reguladoras del FSHR, y particularmente sus potenciales efectos selectivos en señales de transducción intracelular y en la expresión génica de sus células blanco, podría tener, por lo tanto, implicaciones importantes en la terapéutica medicamentosa.

En resumen, la FSH es una hormona glicoprotéica del tipo gonadotropina sintetizada y secretada por las células gonadotropas en la glándula pituitaria anterior. La FSH regula el desarrollo, el crecimiento, la maduración y los procesos reproductivos del cuerpo humano. La FSH y la hormona luteinizante (LH) actúan de forma sinérgica en la reproducción. Además presenta 4 sitios de glicosilación en las posiciones en Asn 52 y 78 de la subunidad alfa y en Asn 7 y 24 de la subunidad beta lo que permite la existencia de isoformas confiriéndole diversas propiedades dependiendo de su sitio de glicosilación.

2.3 Receptor para FSH

Los receptores para las hormonas glicoproteicas pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a las proteínas G (GPCR), que son los principales blancos terapéuticos en la actualidad. De hecho, los beneficios de ~50% de todos los

medicamentos aprobados tienen como blanco estos receptores. Específicamente, los receptores de las hormonas glicoproteicas pertenecen a la familia o grupo A de los GPCRs, que corresponde a los receptores semejantes a la rodopsina y al receptor β - adrenérgico [19]. Todos estos receptores tienen en común el estar compuestos por una larga cadena polipeptídica que cruza 7 veces la membrana celular formando dominios transmembranales (TMs) con estructura secundaria de hélices- α , unidas por 3 asas extracelulares (EL) y 3 intracelulares (IL) y con un dominio NH₂-terminal extracelular de longitud variable y un extremo COOH-terminal intracelular [19].

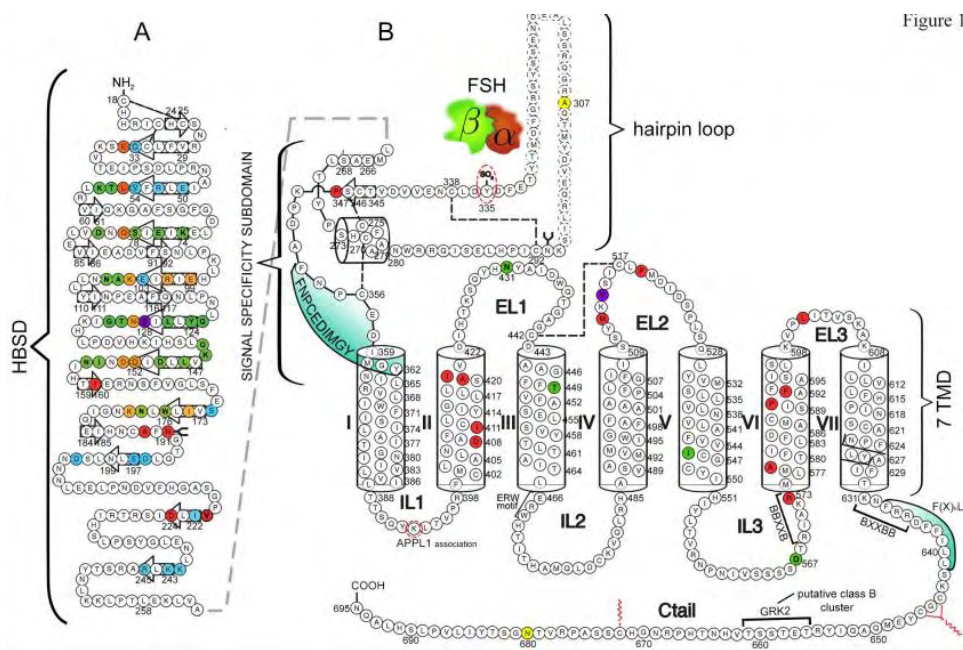


Figure 1

Figura 3. Representación esquemática de la estructura del FSHR humano, incluyendo la secuencia de aminoácidos en círculos. La numeración de los aminoácidos incluye la secuencia líder. Los números romanos representan los dominios transmembranales del receptor mientras que las secciones que aparecen como EL son las fracciones que se encuentran en el exterior de la célula y los segmentos representados con IL se encuentran en el interior de la célula. [94]

En el caso de los receptores para las gonadotropinas (los FSHR y LH/hCGR), el dominio NH₂-terminal es extenso (300 a 400 aminoácidos) y posee una región rica en leucinas (e isoleucinas) que es en donde ocurre la unión específica de sus agonistas o ligantes, en tanto que el dominio o cola COOH-terminal está palmitoilado en 2 ó 3 residuos de cisteína, lo que permite su óptimo transporte intracelular del aparato de Golgi a la membrana plasmática, así como su

reciclamiento a la membrana después de su internalización mediada por la activación del receptor [20, 21]; esta modificación permite también la formación de un lazo intracelular adicional a través del anclaje de los residuos de palmítico a la cara interna de la membrana celular.

En el FSHR, este dominio también posee residuos de serina y de treonina que son blanco de fosforilación y del subsecuente reclutamiento de arrestinas, que son moléculas que intervienen en el desacoplamiento del receptor a su(s) proteína(s) G, previo a su internalización estimulada por el agonista y a la activación de la vía de las MAPKs (por Mitogen Activated Protein Kinases), específicamente de las ERK1/2 (por Extracelular signal Regulated Kinases) independiente de las cinasas A (PKA) y C (PKC) de proteínas [4, 20, 22].

Al igual que los receptores para las otras hormonas glicoproteicas, el FSHR se caracteriza por presentar un dominio extracelular NH₂-terminal (o ectodominio) muy extenso el cual interacciona con su agonista respectivo (la FSH). El ectodominio posee a su vez 2 subdominios principales, el subdominio de unión de alta afinidad para el agonista, localizado en el centro del ectodominio y el subdominio involucrado en la especificidad de la señal. Ambos forman una estructura integral compuesta por repetidos ricos en leucina. En ausencia del agonista, el ectodominio del FSHR inhibe la activación (esto es, los cambios conformacionales, de forma semejante a la ocupación de un receptor por agonistas inversos) del dominio transmembranal a través de su anclaje en los lazos extracelulares del receptor que son parte integral del dominio transmembranal [23, 24].

La unión de alta afinidad de la FSH en el subdominio correspondiente, provoca un cambio conformacional en la hormona formándose de novo un “paquete de unión” en la interface de las 2 subunidades que es específico para un residuo sulfatado de tirosina, presente en la posición 335 (extremo COOH-terminal) del subdominio de la especificidad de la señal (en la región “hinge” o bisagra), ubicado en una estructura semejante a una asa u horquilla. Este residuo de tirosina se impulsa y coloca en el paquete de unión de la hormona elevando así la horquilla y provocando un cambio conformacional que “libera” de la inhibición a la región transmembranal del receptor,

iniciándose así su activación [24]. En este contexto, el ectodominio del FSHR libre (y de los otros receptores relacionados –LHR, TSHR-) actúa como un agonista inverso [25]. Finalmente, los cambios conformacionales en la región transmembranal son transmitidos a los dominios intracelulares, a los que se asocian diferentes moléculas efectoras [26].

La activación del FSHR ocurre después de la unión del agonista. La vía de señalización intracelular clásica o canónica mediada por el módulo Gas/AMPC/PKA (cinasa A de proteínas) ha sido reconocida durante los últimos 20 años como el mecanismo efector básico de la acción biológica de las gonadotropinas. Se ha demostrado, sin embargo, que el FSHR también se acopla a múltiples proteínas G activando así una amplia serie de cinasas de proteínas, con o sin la intervención de andamios específicos (vide infra) [27, 28, 20, 29, 30, 22]. Esta compleja red de señalización, que induce finalmente la transcripción de diferentes genes, indica que la señal de transducción mediada por el complejo FSH/FSHR no es lineal y que su activación involucra varias conformaciones del receptor que pueden ser diferencialmente estabilizadas por agonistas.

En resumen, el FSHR es un GPCR de alta complejidad estructural que tiene como ligando natural a la FSH. La activación del FSHR inducida por su agonista desencadena varias señales de transducción de señal cuya activación selectiva podría estar regulada por cambios conformacionales específicos del receptor provocados por su ligando o por sus isoformas.

2.4 Vías de señalización estimuladas por la FSH

Como se mencionó anteriormente, la vía de señalización intracelular clásica o canónica Gas/AMPC/PKA (cinasa A de proteínas) ha sido reconocida durante los últimos 20 años como el mecanismo efector básico de la acción biológica de las gonadotropinas [27, 28, 20, 22]. Se ha demostrado, sin embargo, que el FSHR también se acopla a otras proteínas G, incluyendo la proteína Gi y a la vía mediada por el trifosfato de inositol, particularmente a dosis altas del agonista [22]. Además

de la PKA, la FSH activa también a otras cinasas de proteínas, incluyendo la PI3K (a través del andamio APPL1, de β -arrestinas y de Src), la PKB (a través de mecanismos dependientes e independientes de G α s/PKA como Epac –proteína de intercambio activada por AMPc-), ERK1/2 (a través de PKA y de β -arrestinas) y a otras vías. [22]. Esta compleja red de señalización, que conlleva a la transcripción de diferentes genes, indica que la señal de transducción mediada por el complejo FSH/FSHR no es lineal y que su activación involucra diferentes conformaciones del receptor que pueden ser diferencialmente estabilizadas por agonistas. En este escenario, el agonista natural activaría todas las vías de señalización dependientes del mismo, en tanto que análogos con actividad agonista (y aún antagonista para ciertos efectos), podrían preferentemente activar una (o varias) cascadas de señalización, lo que se conoce como agonismo selectivo [53, 54, 33, 55, 56, 22].

Se han empleado diversos estudios de secuenciación de alto rendimiento (Next-Generation Sequencing –NGS-) en un intento por caracterizar los efectos de esta gonadotropina en la transcripción de células de la granulosa (murales) y del cumulus ooforus (que son las células de la granulosa que rodean al ovocito) de folículos preovulatorios en primates no humanos y en mujeres sometidas a hiperestimulación ovárica controlada [58-62]. El gran problema prácticamente con todos estos estudios es que los esquemas de inducción de la maduración folicular han incluido, además de FSH recombinante (o de la combinación FSH/LH de origen urinario), la administración de dosis elevadas de hCG para estimular la maduración final ovocitaria, lo que indudablemente ha influido de manera dramática en los perfiles de expresión génica de las células de la granulosa al provocar su diferenciación a células granulosa-luteínicas [58-62].

Aunque la información derivada de estos estudios ha sido, indudablemente, útil para conocer el perfil general de la transcripción de numerosos genes en células de la granulosa y del cumulus (las cuales no expresan el FSHR) de folículos preovulatorios estimulados con recFSH o la combinación uFSH/uLH, su diseño no ha permitido identificar si los diferentes análogos de la FSH empleados inducen de

manera diferencial y selectiva la expresión de genes particulares regulados por esta hormona.

En resumen la activación del FSHR por su agonista (FSH) en la célula de la granulosa activa a su vez diversas cascadas de señalización, que eventualmente influyen en la transcripción de diferentes genes que regulan una gran variedad de funciones celulares, incluyendo la proliferación y diferenciación, la inhibición de la apoptosis, la esteroidogénesis y la aromatización de los andrógenos producidos en la célula de la teca, la producción de diversas hormonas no esteroideas y de factores de crecimiento, etc. [57, 28].

2.5 Agonismo selectivo

El agonismo selectivo (también conocido como selectividad funcional, tráfico dirigido por el agonista, eficacia colateral y agonismo sesgado –biased agonism-) es un concepto de gran importancia en la farmacología moderna, que describe la propiedad o capacidad de ciertos ligandos y análogos de activar de forma diferencial una o varias cascadas de señalización a través de un GPCR particular [53]

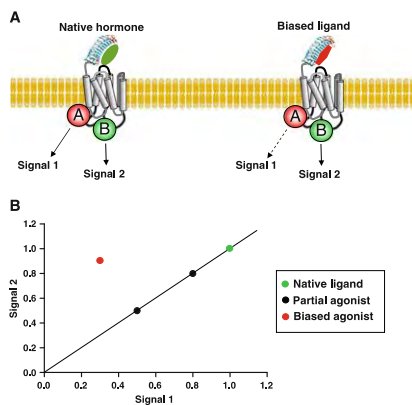


Figura 4. Modelo de agonismo selectivo, en la figura se muestra como el ligante natural estimula de manera simultánea dos cascadas de señalización mientras que un agonista sesgado estimula preferencialmente una de ellas, a diferencia de un agonista parcial, el cual estimula ambas cascadas pero con una menor potencia. [94]

Este concepto ha retado al concepto clásico de eficacia intrínseca, en el que agonistas completos o parciales activan consistente y simultáneamente varias señales de transducción a través de la estabilización de una sola conformación activa del receptor (o de una conformación inactiva como en el caso de agonistas inversos), dependiendo de su afinidad por el mismo (es decir, por la intensidad de la interacción ligante-receptor) y de su eficacia intrínseca, determinada por la capacidad del ligante unido para inducir una respuesta biológica [33, 56]. El concepto de agonismo selectivo implica, por lo tanto, que no existe una sola conformación activa del receptor y que ligantes diferentes (o mutaciones en la molécula del receptor) pueden estabilizar ciertas conformaciones activas del receptor de forma selectiva [32].

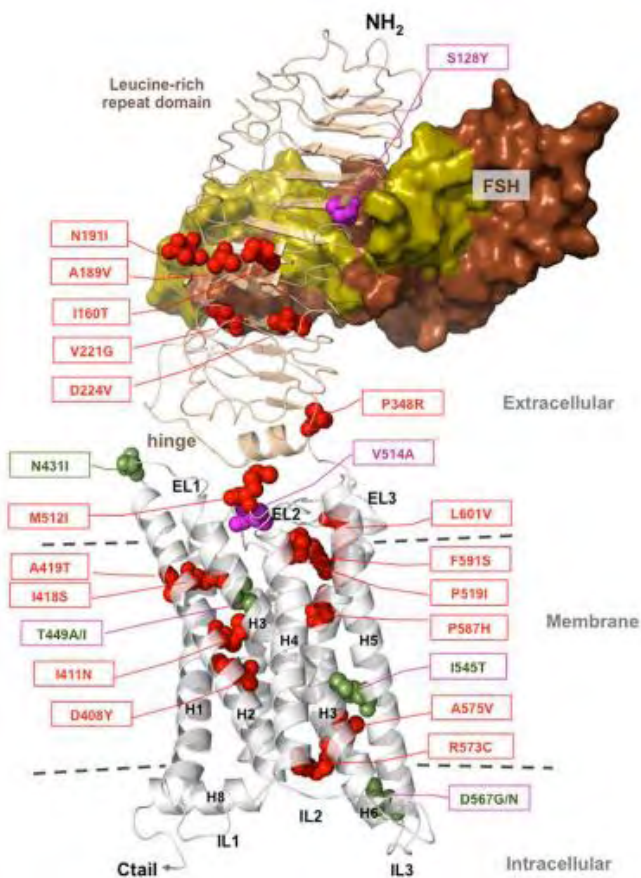


Figura 5. Modelo tridimensional del complejo FSH/FSHR mostrado con la posición de las mutaciones que ocurren de forma natural en el FSHR. La localización de las mutaciones que ocurren de forma natural se resaltan con las cadenas laterales de tipo silvestre (esferas de hidrógeno). Mutaciones con ganancia de función (verde) se caracterizan por un aumento de la actividad basal, o provocando la unión de diferentes ligandos. Pocas sustituciones en el séptimo dominio transmembranal generan aumento de la actividad basal y al mismo tiempo la unión de otros ligando. Las mutaciones de pérdida de función se indican en rojo. Esta disposición espacial ayuda a identificar las zonas funcionales con información estructural, lo que permite la localización de importantes regiones que son indispensables para la transducción de señales, incluyendo el pliegue del carboxilo terminal.[94]

Estos ligandos incluyen aquellos que se comportan como antagonistas para una vía de señalización en particular y como agonistas para una vía diferente en la misma célula. Así, por ejemplo, ciertos agonistas (o una mutación particular del receptor) podrían preferencialmente reclutar o activar efectores no dependientes de las proteínas G, como son las β -arrestinas, es decir, modular un subconjunto de señales de transducción activadas habitualmente por un agonista completo, sin provocar efectos sobre otras señales (activadas por el agonista completo) [63, 64]. Se ha demostrado que, en respuesta a ciertos compuestos, algunos GPCR pueden activar de forma diferencial y selectiva sus cascadas de señalización asociadas; estos receptores incluyen los receptores 5-HT₂ serotoninérgicos, los receptores opioides- μ , los receptores para angiotensina II, β 2-adrenérgicos y D_{2L} y D₁ dopaminérgicos y el receptor V₂ de vasopresina, por citar algunos [54, 33, 55, 65].

Para el caso de ligantes serotoninérgicos asociados a los receptores 5HT_{2A} y 5HT_{2B}, se ha observado que la eficacia relativa de ciertos agonistas para cada uno de los receptores difiere dependiendo del efecto que se evalúe (acumulación de fosfatos de inositol –IP- mediada por la activación de la fosfolipasa C –PLC- o liberación de ácido araquidónico [33]. Igualmente, la eficacia de agonistas serotoninérgicos para activar los mecanismos de desensibilización de su receptor varía dependiendo del agonista [66, 33]. En el caso de receptores opioides- μ , se han encontrado diferencias en la capacidad de sus agonistas para inducir endocitosis del receptor en fibroblastos transfectados y en neuronas que expresan estos receptores in vivo [67, 68], la cual no correlaciona con su eficacia intrínseca para activar la adenilato ciclasa o canales GIRK (canales de potasio rectificadores hacia el interior activados por una proteína G). Para los receptores β 2-adrenérgicos, se ha encontrado que determinados agonistas pueden inducir efectos diferenciales en sitios específicos de fosforilación del receptor y en su endocitosis [69], en tanto que para agonistas del receptor V₂ de vasopresina es posible separar los efectos en la inducción de transducción de señales de aquellos involucrados en la endocitosis [70]. La aplicación de este concepto relativamente reciente, ha abierto nuevos caminos para el descubrimiento de estrategias terapéuticas innovadoras.

En el caso de la FSH, las variaciones en su glicosilación pueden potencialmente conferir a una variante determinada la capacidad de comportarse como agonista selectivo y de ejercer, por ejemplo, control sobre la expresión de diferentes ARNm. De hecho, en estudios recientes se ha encontrado que una isoforma parcialmente deglicosilada de la LH equina, con capacidad de unirse tanto al receptor de LH como al de FSH, ejerce agonismo preferencial hacia la señalización dependiente de β -arrestinas a juzgar por el patrón de fosforilación de la proteína ribosomal S6 (rpS6); esta misma variante también promovió de forma selectiva la fosforilación de ERK1/2 a través de la vía de la β -arrestina, independientemente de la mediada por la proteína Gs [71].

Se ha demostrado que a concentraciones equimolares, las variantes pobres en ácido siálico eran más potentes que las intensamente sializadas para provocar la producción de AMPc, la aromatización de andrógenos y la actividad del activador de plasminógeno tisular (incluyendo la producción de sus ARNm) en células de la granulosa en cultivo; por el contrario, las variantes fuertemente sializadas fueron más potentes que sus contrapartes menos sializadas para inducir la producción del ARNm de la inhibina- α [35]. Esta serie de estudios también encontró que una variante de FSH escasamente sializada y con antenas ricas en manosa y oligosacáridos híbridos, inhibió la aromatización de los andrógenos y la actividad del activador de plasminógeno tisular e indujo una curva dosis respuesta de tipo bifásica, con la disminución en producción de AMPc a concentraciones elevadas de la variante, lo que sugirió la activación simultánea de diferentes subtipos de proteínas G, en este caso en particular, de la proteína Gi/Go [34].

Aquí es importante subrayar que toda esta serie de estudios se realizó empleando variantes semipurificadas de extractos de hipófisis anterior humanas y que hasta la fecha no existen estudios con macrovariantes de glicosilación naturales ni recombinantes, ni con pequeñas moléculas con actividad agonista de FSH, que

hayan documentado efectos selectivos de estos agonistas en la transducción de señales mediadas por el FSHR.

El estudio del agonismo selectivo a nivel del FSHR humano es de gran importancia, no sólo conceptualmente sino también para su aplicación en la terapéutica medicamentosa. La caracterización de los efectos selectivos de diversos agonistas de la FSH a través del estudio de la expresión de ARNm inducidos por estas variantes, de la activación de diversas señales de transducción y cascadas de señalización mediadas por el FSHR y de su eficacia colateral (evaluada a través del estudio de su cinética de internalización), en diferentes contextos celulares, podría tener un gran impacto en el tratamiento de la infertilidad, la prevención del síndrome de hiperestimulación ovárica en los programas de ART, la osteoporosis en la posmenopausia y la anticoncepción, por ejemplo, en los que sus efectos diferenciales podrían ser explotados para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas Ulloa-Aguirre A, Crepieux P, Poupon A, Maurel MC, Reiter E. Novel pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism. *Rev Endocr Metab Disord* (2011) **12**, 259-74.

En resumen el agonismo selectivo es un concepto de gran importancia que describe la propiedad o capacidad de ciertos ligandos y análogos de activar de forma diferencial una o varias cascadas de señalización a través de un GPCR particular por su aplicación farmacológica y medicamentosa.

2.6 Resonancia de plasmón de superficie (SPR) para determinar la constante de afinidad de un ligando.

La relación entre afinidad, concentración de ligando y ocupación de los receptores puede expresarse a través de la constante de disociación en equilibrio (K_d), la concentración del ligando que permite la ocupación de 50% de los receptores en condiciones de equilibrio. La K_d es la expresión directa de la afinidad del complejo ligando-receptor. Cuando la afinidad del complejo ligando-receptor es alta, se requieren concentraciones bajas de ligando para producir ocupación del receptor, y

la K_d es baja. Por el contrario, cuando la afinidad del complejo ligandoreceptor es baja, se requieren concentraciones altas de ligando para lograr la ocupación del receptor, y la K_d es alta. La K_d es un parámetro único para cada complejo ligando-receptor. Además, la K_d representa la ocupación de 50% de los receptores, de manera independiente a su número. Ya sea que existan 10 receptores o un millón de ellos, a la concentración K_d de un ligando 50% de los receptores está ocupado y en equilibrio. [93]

La resonancia de plasmón de superficie (SPR) es un proceso físico que puede ocurrir cuando luz polarizada en un plano golpea una lámina delgada de metal en condiciones de reflexión interna total. [72]

La unidad óptica SPR consiste en una fuente de luz que se hace pasar a través de un prisma y golpea la superficie de una celda de flujo en un ángulo determinado, de tal manera que el haz de luz se refleja totalmente. En estas condiciones, un componente electromagnético del rayo de luz, la onda evanescente, se propaga en la capa acuosa y puede interactuar con los electrones móviles en la película de oro en la superficie del vidrio. [73]

A un ángulo de longitud de onda incidente en particular se produce una onda de plasmón superficial de electrones excitados (la resonancia de plasmón) en la capa de oro y se detecta como una intensidad reducida del haz de luz reflejada. En los instrumentos Biacore, se utiliza luz monocromática en la forma de una cuña (con una amplia distribución de ángulos de incidencia). [73]

Cada ángulo del haz reflejado incide en el detector del instrumento en un punto diferente y, por lo tanto, el detector registra continuamente la posición de la intensidad de luz reducida, y calcula el ángulo de SPR de esa cifra. [73]

El dispositivo óptico no tiene partes móviles y la geometría fija de este aumenta la estabilidad de la lectura y permite que la unión sea monitoreada en tiempo real. El ángulo de SPR es sensible a la composición de la capa en la superficie del oro. Primero se determina un ángulo de SPR de punto de partida por un buffer de lavado sobre la superficie con una cantidad fija de ligando unido. Para este flujo de buffer,

se añade una cantidad de analito. La unión de este analito a su ligando inmovilizado produce un aumento en el índice de refracción en la superficie, cambiando así el ángulo de SPR debido a que es directamente proporcional a la cantidad de analito unido. No es necesario el marcaje de moléculas en la metodología de detección por SPR, y la unión de moléculas con pesos moleculares menores o iguales a 200 Da se puede detectar con bastante precisión. El cambio de ángulo SPR se reporta como unidades de resonancia (RU), donde 1000 RU corresponden a un cambio de ángulo de aproximadamente 0.1°. [73]

Para la mayoría de las proteínas, se requiere la unión de 1 ng por mm² de proteína en la superficie de dextrano para provocar un cambio de señal de 1000 RU. La relación exacta entre la RU y ng de material unido varían dependiendo del índice de refracción de la sustancia analizada. Si la molécula añadida no se une su ligando, el cambio de ángulo SPR en las celdas de flujo de muestra y de referencia será el mismo, y, después de la resta de ambas, dará una respuesta RU neta igual a cero indicando que no se produjo ninguna unión. Sólo proteína unida genera una señal de SPR positiva y esa señal es registrada con el tiempo produciendo un sensograma. [73]

La física subyacente de los principios de la SPR es complicada. Sin embargo, un conocimiento práctico de la técnica no requiere una comprensión detallada de la teoría. [73]

Básicamente, los instrumentos basados en SPR utilizan un método óptico para medir el índice de refracción cercano (dentro de 300 nm) en la superficie de un sensor. En los instrumentos de Biacore, esta superficie representa una cara de una celda de flujo (micro-fluídica de 20-60 nL). A través de este flujo de moléculas una solución acuosa (Buffer de desplazamiento) se hace pasar bajo una velocidad de flujo constante (1 a 100 uL / min). Para permitir la detección de una interacción de una molécula (denominada por Biacore como el ligando) se inmoviliza sobre la superficie del sensor. Posteriormente se inyecta su pareja de unión (denominado por Biacore como el analito) en solución acuosa (idealmente con los mismos

componentes y composición que el buffer de desplazamiento) a través de la celda de flujo, en flujo continuo. [73]

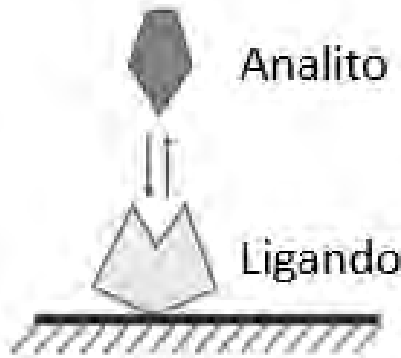


Figura 6. "Ligando" se refiere al interactuante inmobilizado y "analito" se refiere al interactuante en la muestra inyectada sobre la superficie del sensor.[72]

A medida que el analito se une al ligando la acumulación de proteína en la superficie del sensor provoca un aumento en el índice de refracción como se aprecia en la figura 6. Este cambio de índice de refracción se mide en tiempo real (toma de muestras en un experimento de análisis cinético se toma cada 0.1 s), y el resultado se representa como unidades de respuesta (RU) frente al tiempo (denominado un sensograma). Es importante destacar que también se genera una respuesta (respuesta de fondo) si hay una diferencia en los índices de refracción de las memorias intermedias de funcionamiento y de la muestra. Esta respuesta de fondo se debe restar del sensograma para obtener la respuesta de unión real. La respuesta de fondo se registra mediante la inyección del analito a través de una celda de flujo de control o de referencia, que no tiene ligando o un ligando inmobilizado irrelevante a la superficie del sensor. La verdadera medición del tiempo de asociación y disociación de una interacción de unión permite el cálculo de constantes de asociación y de velocidad de disociación y las correspondientes constantes de afinidad como se muestra en la figura 7. [73]

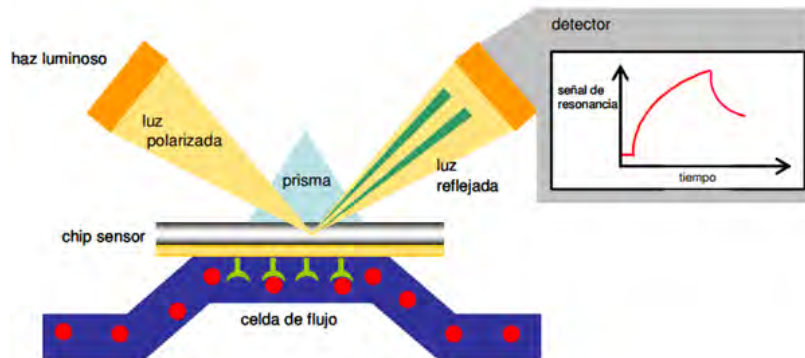


Figura 7. Los componentes básicos de un instrumento para biosensores SPR: Una lámina de oro adherida a la superficie de un vidrio. La luz pasa a través del prisma y del vidrio y se refleja en la lámina de oro y pasa de nuevo a través del prisma y posteriormente al detector. Los cambios en la reflectividad frente ángulo o longitud de onda dan una señal de que es proporcional a la masa adherida a la superficie. Una celda de flujo permite que las soluciones pasen por encima de la superficie de oro y provoquen las interacciones. [72,74]

Una RU representa la unión de 1 pg de proteína por mm cuadrado. Se necesita más de 50 pg por milímetro cuadrado de analito en la práctica para generar buenas respuestas reproducibles, y es prácticamente difícil de inmovilizar una densidad suficientemente alta del ligando directamente sobre la superficie del sensor para lograr este nivel de analito. Para sortear esta dificultad técnica, los chips tienen un matiz gruesa de dextrano carboximetilado de 200 nm. Esto añade una tercera dimensión a la superficie, lo que resulta en la capacidad de generar niveles mucho más altos de la inmovilización del ligando como se muestra en la figura 8. [73]

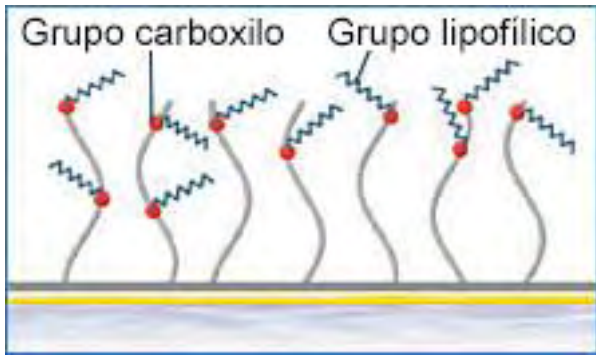


Figura 8. Matriz: Grupos lipofílicos unidos covalentemente a dextrano carboximetilado, haciendo que la superficie sea adecuada para la unión directa de vesículas lipídicas, tales como liposomas. Después de la unión, la estructura de bicapa lipídica se mantiene, lo que facilita el estudio de las interacciones que implican receptores transmembranales en entornos similares. [72]

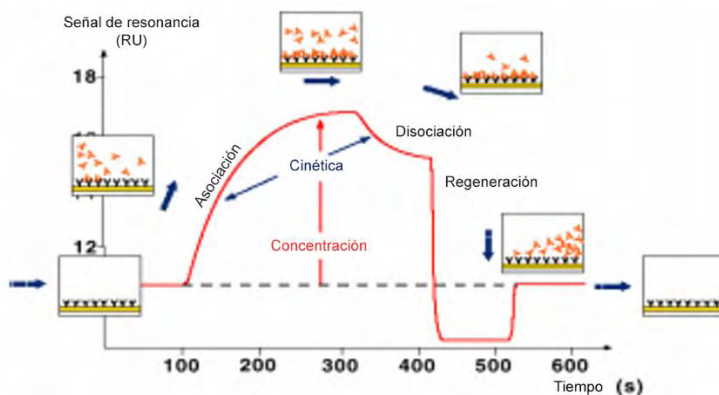


Figura 9. Componentes básicos de un sensograma. La asociación es la velocidad a la cual el analito se une a su ligando. La disociación es la velocidad a la cual el analito se separa de su ligando. La regeneración es el proceso por el cual el aparato retira todo analito de la superficie del chip. [76, 77]

En resumen la resonancia de plasmón de superficie es una metodología de alta tecnología que nos permite realizar análisis de interacción molecular proporcionando datos de la más alta calidad para cada parámetro de interacción

mediante un sensograma como puede apreciarse en la figura 9. El sistema monitoriza en tiempo real las interacciones sin necesidad de un marcaje, proporcionando datos ricos e información de forma rápida y eficiente para permitir conclusiones bien informadas a las preguntas clave de investigación y proporcionar confianza, selección y caracterización de los candidatos terapéuticos.

2.7 Calcio como segundo mensajero

El descubrimiento del regulador de la actividad de la fosfodiesterasa dependiente de calcio proporcionó la base para comprender la manera en que el Ca^{2+} y el AMPc interactúan dentro de la célula. El término con el que se conoce ahora a la proteína reguladora dependiente del calcio es calmodulina, una proteína de 17 KDa homóloga a la proteína muscular troponina C en estructura y función. La calmodulina tiene cuatro sitios para fijación del calcio y la ocupación total de estos sitios conduce a un cambio notable de la conformación, de modo que la mayor parte de la molécula asume una estructura de hélice alfa. Se presume que este cambio de conformación confiere a la calmodulina la propiedad para activar o inactivar enzimas (por ejemplo, adenil ciclasa, fosfolipasa A2, glicerol-3 fosfato deshidrogenasa, piruvato carboxilasa, piruvato dashidrogenasa, proteína cinasa dependiente Ca^{2+} /fosfolípido entre otras). La interacción de calcio con la calmodulina (con el cambio resultante de actividad de la última) es conceptualmente análoga a la fijación del AMPc a la proteína cinasa y la activación subsiguiente de esta molécula. Con frecuencia, la calmodulina es una de las subunidades reguladoras de proteínas oligoméricas, entre ellas varias cinasas y enzimas, participando en el metabolismo de combustibles como en la generación y degradación de nucleótidos cíclicos y el transporte de iones. Además de estos efectos, el complejo calcio/calmodulina regula la actividad de numerosos elementos estructurales en las células. Los niveles de calcio citosólicos pueden modificarse tanto por ingreso del calcio extracelular como por la liberación desde su principal depósito intracelular: el retículo endoplásmico. La variación de los niveles de calcio puede modificarse directamente por el ligando de la hormona al receptor (ej: FSH) o a través de las modificaciones en los niveles de IP3- DAG por acción de la

fosfolipasa C. Una hormona que opera a través de este sistema se une a un receptor específico de la membrana celular, que interacciona con una proteína G según un mecanismo similar al de la ruta de la proteína cinasa A y transduce la señal, lo que da como resultado la estimulación de la fosfolipasa C. Esta enzima cataliza la hidrólisis de fosfatidilinositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para formar dos segundos mensajeros, diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trisfosfato (IP₃). El inositol 1,4,5-trisfosfato difunde hacia el citoplasma y se une a un receptor de IP₃ en la membrana de un depósito de calcio, que puede estar separado del retículo endoplasmático o bien formar parte del mismo. Esta unión da como resultado la liberación de iones de calcio, que contribuye a un gran incremento del calcio citoplasmático. Por otro lado, el IP₃ se metaboliza por eliminación progresiva de grupos fosfato hasta formar inositol, el cual se combina con ácido fosfatídico (PA) para formar fosfatidilinositol (PI) en la membrana celular. Este último es fosforilado doblemente por una cinasa para formar PIP₂, que bajo estímulo hormonal ya puede entrar en otra ronda de hidrólisis y formación de segundos mensajeros (DAG e IP₃). Si el receptor todavía está ocupado por una hormona, pueden producirse varias rondas del ciclo antes de que se disocie el complejo hormona-receptor. Por último, es importante destacar que no todo el IP₃ es desfosforilado durante la estimulación hormonal. Parte del IP₃ es fosforilado mediante la IP₃ cinasa para dar lugar a inositol 1,3,4,5-tetrafosfato (IP₄), que puede mediar en algunas de las respuestas hormonales más lentas o prolongadas -a través de la activación de cascadas de cinasa/fosfatasas con la modificación final de la expresión genética como puede apreciarse en la figura 10. [86]

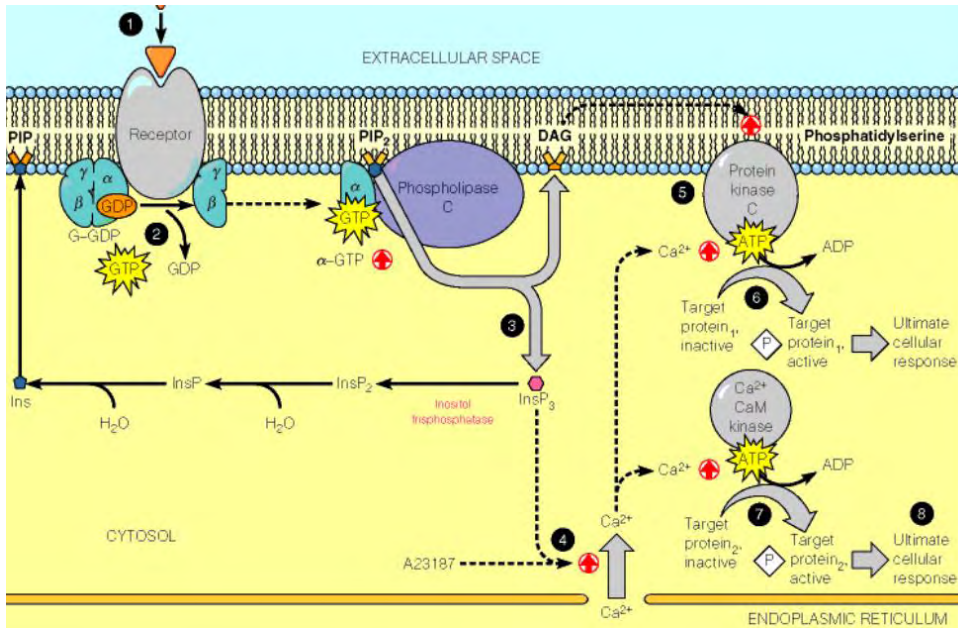


Figura 10. Cascada de señalización mediada por la liberación de calcio intracelular. [86]

El DAG activa la ruta de la proteína cinasa C. Simultáneamente al aumento de Ca^{2+} citoplasmático inducido por el IP₃, el cual procede de la hidrólisis de PIP₂, el DAG produce diversos efectos. El DAG activa una importante proteína cinasa de serina/treonina denominada proteína cinasa C por su dependencia de calcio. El aumento inicial del calcio citoplasmático inducido por IP₃ parece alterar de algún modo la proteína cinasa C, de modo que ésta es translocada desde el citoplasma hacia la cara citoplasmática de la membrana plasmática. Una vez translocada, es activada por una combinación de calcio, DAG y el fosfolípido negativo de la membrana, fosfatidilserina. Tras su activación, la proteína cinasa C fosforila proteínas específicas en el citosol o, en ocasiones, en la membrana plasmática. Estas proteínas fosforiladas llevan a cabo funciones específicas que no pueden realizar en el estado desfosforilado. Por ejemplo, una proteína fosforilada podría migrar hasta el núcleo e incrementar la mitosis y el crecimiento. Además, el sistema IP₃-DAG puede modificar la actividad de una familia de enzimas llamadas genéricamente fosfodiesterasas, de las cuales es más abundante la fosfodiesterasa 1 (FD1), cuya activación permite la destrucción de moléculas de cAMP. De este

modo hormonas cuyo segundo mensajero es el IP3 pueden reducir los niveles de cAMP en forma indirecta. [86]

En resumen el Ca^{2+} como segundo mensajero como medida de la acción farmacológica es un concepto de enorme importancia ya que es un peldaño fundamental para la traducción de señales en la cascada de señalización y para la activación de factores de la transcripción.

3. Materiales

- Células HEK-293 que expresan de manera estable el FSHR humano: Esta línea celular está disponible en el laboratorio del Dr. Alfredo Ulloa Aguirre y se tiene amplia experiencia en su manejo
- FSH recombinante –análogo tetraglicosilado- producida por células CHO (Gonal-F, Laboratorios Merck-Serono, México).
- FSH equina proporcionada por el Dr. George Bousfield, Wichita State University, Wichita, KA, EUA.
- FSH hipofisaria, triglicosilada (hFSH21) y tetraglicosilada (hFSH24). Ambas proporcionadas por el Dr. George Bousfield, Wichita State University, Wichita, KA, EUA. La obtención y purificación de ambas preparaciones son parte del macroproyecto *“Age-related changes in gonadotropin glycosylation and function”*, en desarrollo en esta universidad.
- Medio de cultivo Eagle modificado (Dulbecco; DMEM, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY).
- Pen Strep 15140 GIBCO® 10000 u/mL Penicilina, 10000ug/ mL streptomina
- Anti Anti (100X) Antibiótico-Antimicótico GIBCO®
- Suero Fetal Bovino CORNING®
- Dulbecco’s Phosphate-Buffered Saline 1X GIBCO®
- Cajas de Petri 100 mm x 20mm poliestireno CORNING®
- Tubos Falcon 15 mL CORNING®
- Pipetas desechables 10mL COSTAR®
- Biacore™ T200 GE Healthcare
- Fura-Red® AM CELL PE-10
- Citómetro de Flujo BD LSR Fortessa
- Buffer de lisis con inhibidor de proteasas y fosfatasas
- Chip L1 Series S Sensor Chip L1 BIACORE
 - Captura rápida y reproducible de vesículas de membrana de lípidos
 - No necesita moléculas de anclaje

4 Metodología

4.1 Cultivos celulares

Las células HEK-293 fueron expandidas y cultivadas siguiendo las técnicas descritas por el laboratorio del investigador asesor de esta tesis. Las células HEK-293 que expresan de forma estable el FSHR, se cultivaron y mantuvieron en medio Eagle modificado (Dulbecco; DMEM, Life Technologies, Inc., Grand Island, NY) suplementado con suero fetal bovino (SFB) al 10% y antibióticos.

4.2 Resonancia de plasmón de superficie

Para la obtención de las constantes de afinidad se utilizó el principio de la resonancia del plasmón de superficie explicada a detalle en el apartado 1.6 de la presente tesis, por medio de un equipo Biacore T200. Esta metodología es ampliamente utilizada en la investigación para el estudio de la interacción antígeno-anticuerpo y el cálculo de la constante de afinidad, por lo cual, se decidió utilizarla para estudiar la interacción hormona-receptor.

Las células HEK 293 (Human Embryonic Kidney 293, por sus siglas en inglés), que expresan establemente el receptor para FSH se cultivaron en placas para cultivo de 10 cm de diámetro, en medio DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10%, a 37°C y ambiente con 5% de CO₂.

Para la obtención de los extractos membranales se utilizaron 10 cajas Petri confluentes, las cuales fueron lavadas por triplicado con PBS frío no estéril al 1% para retirar el medio de cultivo de las células, posteriormente se incubaron durante 40 minutos con 750 uL de buffer de lisis con inhibidor de proteasa y fosfatasas en baño de hielo, al término de los 40 minutos se retiró el extracto y se homogenizó 40 veces con un homogeneizador de teflón. Se recuperó el homogenizado en un tubo Falcon de 50 mL, el cual se centrifugó durante 30 minutos a 3800 rpm, se recuperó el sobrenadante y se desechó el pellet. El sobrenadante se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 30 minutos, se desechó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 2 mL del buffer de lisis con inhibidor de proteasas y fosfatasas,

alicutándose en 4 fracciones de 500 uL las cuales fueron homogeneizadas con un homogeneizador automático en cuatro pulsos de un minuto cada uno con intervalos de 1 minuto entre ellos. Finalmente se congelaron a -70°C para su uso posterior.

Los extractos membranales son pequeñas vesículas esféricas formadas a partir de la membrana plasmática producto de la lisis celular provocada por los métodos previamente mencionados con una doble capa de fosfolípidos, que constan de partes hidrosolubles y liposolubles teniendo embebidas proteínas de superficie como lo es el receptor para la FSH.

Para la obtención de las constantes de afinidad se utilizó el principio de plasmón de superficie utilizando un equipo Biacore T200 en el cual se inmovilizaron los liposomas obtenidos a partir del cultivo celular en un chip L1 serie S que está diseñado para el análisis de la interacción en el equipo Biacore. La superficie consiste en una matriz de dextrano carboximetilado preinmovilizado con grupos lipófilos para la rápida y reproducible captura de vesículas lipídicas con y sin proteínas de membrana.

El proceso de inmovilización implica la difusión e incorporación de las vesículas a la superficie de las estructuras lipofílicas adheridas en el chip L1, el anclaje se realiza de forma no covalente.

Se estandarizó el método para optimizar el proceso inmovilizando 3000 sitios, resultando el número óptimo y el más representativo para la interacción hormona-receptor, garantizando así una mejor curvatura en las gráficas, mismas que son necesarias para realizar el arreglo matemático con el software del Biacore para el cálculo de las constantes de afinidad, las cuales se encontraron bajo las siguientes condiciones:

| | |
|--------------------|-----------|
| Tiempo de contacto | 1800 s |
| Flujo | 30 UL/min |

Tabla 1. Condiciones ajustadas en el equipo Biacore T200 para la inmovilización de los liposomas

Para la realización de la cinética se prepararon diluciones seriadas partiendo de una concentración de 150 nM, para obtener concentraciones de FSH de 1.17 a 150 nM que fueron inyectadas en el equipo.

Para la elaboración de la cinética se utilizó la concentración de 37.5 nM, ya que fue la que mostró un mejor desempeño. Y posteriormente se estandarizó el flujo y el tiempo de contacto de la hormona sobre la superficie del chip siendo este de 30 uL/min y de 1800 segundos respectivamente.

Es importante encontrar el equilibrio entre el flujo y el tiempo de contacto, para así permitir una correcta interacción del receptor con su ligando, ya que a un flujo elevado se provoca el desprendimiento de los liposomas, y a un flujo bajo no se da una correcta interacción.

| | |
|--------------------|---------------|
| Tiempo de contacto | 1800 segundos |
| Flujo | 30 uL/min |

Tabla 2. Parámetros del Biacore T200 elegidos para la cinética de interacción ligando receptor.

Se realizó el experimento estudiando las cuatro diferentes preparaciones de la FSH en cuatro ocasiones separadas y cada concentración de hormona por duplicado, con un total de 32 muestras analizadas.

El cálculo de las constantes de afinidad se obtuvo mediante un algoritmo matemático incluido en el software del equipo.

4.3 Citometría de flujo

Se realizó la estandarización del método probando diferentes concentraciones de Fura-Red[®] AM con un cultivo de células HEK 293 tratado bajo las mismas condiciones de descritas anteriormente en el método de la resonancia del plasmón de superficie. Se despegaron las células con movimientos suaves de la pipeta serológica, se transfirieron a un tubo Falcon de 15 mL y se centrifugaron 5 minutos a 1500 rpm a temperatura ambiente, (las centrifugaciones se realizaron de la misma

manera), posteriormente se eliminó el sobrenadante con cuidado de no perder el pellet y adicionando un mililitro de medio DMEM sin suero fetal bovino, y se conservaron en hielo.

Se realizó el conteo de las células de la suspensión por medio de una cámara de Neubauer con una dilución 1:10. De acuerdo con la cuenta realizada, se ajustó el volumen de la suspensión para colocar en cada tubo de citómetro 0.5×10^5 células.

Se centrifugaron los tubos con 0.5×10^5 células para eliminar el sobrenadante, se le dieron golpes suaves a cada tubo para disgregar el botón y se resuspendieron en 100 uL de medio de cultivo DMEM sin suero fetal bovino.

Posteriormente se realizaron 5 diluciones para el colorante en tubos diferentes y se tomó un tubo con células sin teñir para realizar los ajustes de voltaje en el citómetro y otro tubo para el ajuste del volumen, es decir siete tubos en total.

Se añadieron las siguientes cantidades de colorante Fura-Red[®] AM con la micropipeta correspondiente. (Se utilizó una punta nueva en cada adición).

- a. Tubo 1. No se agregó Fura-Red[®] AM (células sin teñir)
- b. Tubo 2. 0.2 uL de Fura-Red[®] AM
- c. Tubo 3. 0.3 uL de Fura-Red[®] AM
- d. Tubo 4. 0.5 uL de Fura-Red[®] AM
- e. Tubo 5. 0.75 uL de Fura-Red[®] AM
- f. Tubo 6. 1 uL de Fura-Red[®] AM
- g. Tubo 7. 1 uL de Fura-Red[®] AM (tubo control para ajustar el volumen del citómetro)

Posteriormente se incubaron a 37°C y 5% de CO₂ en una gradilla por 30 minutos. Al término de la incubación se le adicionaron 2 mL de PBS 1X y se centrifugaron. Se decantó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 300 uL de medio para lectura (PBS con calcio).

Todos los tubos se dejaron incubando 20 minutos a 37°C para estabilizar su temperatura e iniciar las lecturas.

Se procedió a la lectura en el citómetro, ajustando con el tubo de células sin teñir, ajustando los parámetros de voltaje para el tamaño (FSC) y la granularidad (SSC) Inicialmente se tomó una lectura de 60 segundos basales previos a la adición del estímulo y posteriormente a éste, 180 segundos más

Los estímulos se realizaron añadiendo a cada tubo un volumen de 2 uL de ionomicina 3 mM al término de los 60 segundos de lectura basal en el citómetro

4.3.1 Medición de Calcio intracelular por citometría de flujo

Para la medición del calcio intracelular se utilizaron células HEK 293 cultivadas en cajas Petri de 10 cm de diámetro confluentes cultivadas bajo las mismas condiciones mencionadas en los experimentos anteriores, las cuales fueron despegadas y tratadas con el colorante de la forma anteriormente descrita.

Se realizó el conteo de células en una cámara de Neubauer con una dilución 1:10 y de acuerdo con la cuenta realizada se ajustó el volumen para colocar en cada tubo de citómetro 1 millón de células.

Se utilizaron ocho tubos para las cuatro diferentes preparaciones de FSH y dos tubos controles, un positivo y un negativo, es decir un total de diez tubos de citómetro. Los tubos se centrifugaron de la misma manera mencionada anteriormente para eliminar el sobrenadante, y una vez hecho esto se disgregó el botón y se resuspendieron en 100 uL de medio de cultivo DMEM sin suero fetal bovino.

Se incubaron los diez tubos durante 30 minutos con 0.3 uL de Fura-Red AM® a 37 °C y 5% de CO₂. Pasados los 30 minutos se realizó un lavado y una centrifugación en los tubos de la manera descrita en la estandarización del colorante, posteriormente se resuspendieron los tubos en 300 uL de PBS 1x sin calcio con excepción del el control positivo que se resuspendió en 300 uL de PBS 1X con calcio. Se dejaron incubando durante 20 minutos a 37 para su lectura.

Se realizaron las lecturas en el citómetro durante cuatro minutos para cada preparación hormonal realizando un estímulo hormonal al minuto de lectura basal

Las lecturas se realizaron en el citómetro estimulando con 100ng de cada una las preparaciones hormonales al minuto de lectura basal y se leyó el estímulo por tres minutos más. Se eligió la cantidad de 100 ng de FSH ya que fue la que presentó una buena respuesta utilizando la menor cantidad de reactivo posible.

Para el control negativo se estimuló con 100 ng de TSH y el control positivo se estimuló con 2 uL de ionomicina.

Para el análisis estadístico de los resultados se utilizó un análisis de varianza con una prueba pos-hoc (Tukey-Kramer).

5. Resultados

5.1 Resultados Constantes de Afinidad

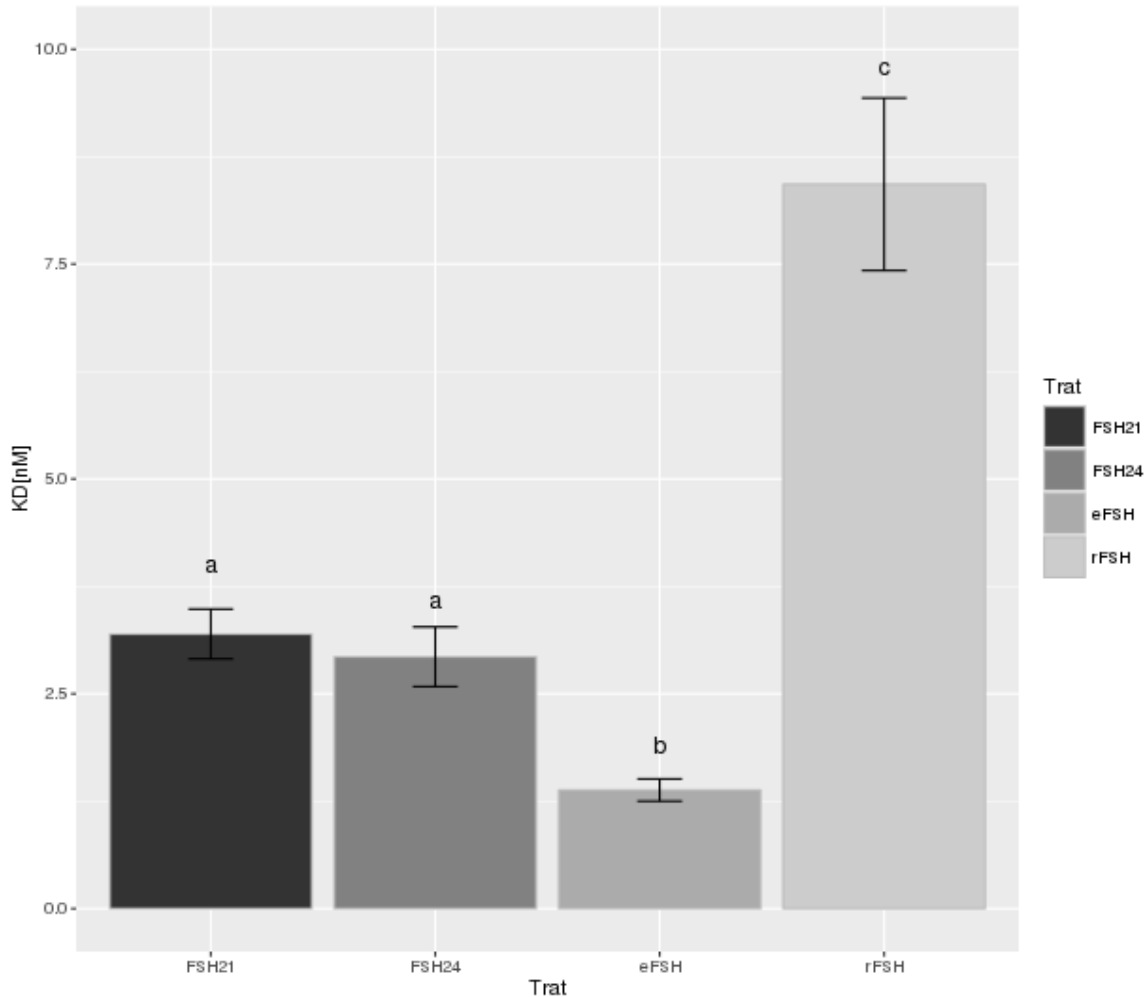
Las constantes de afinidad de las preparaciones de la hormona folículo estimulante fueron obtenidas mediante la resonancia del plasmón de superficie por medio de un equipo Biacore T200 como se muestra en la tabla 3.

| | KD [nM] Repeticiones | | | | | | | Promedio[nM] | DE |
|---------------|----------------------|------|------|------|-------|------|------|--------------|------|
| Gonalf | 6.27 | 5.66 | 9.97 | 12.5 | 10.79 | 7.54 | 6.27 | 8.43 | 2.66 |
| eFSH | 1.077 | 1.71 | 1.35 | 1.38 | | | | 1.38 | 0.26 |
| FSH21 | 3.21 | 3.99 | 2.95 | 2.63 | | | | 3.20 | 0.58 |
| FSH24 | 2.09 | 2.91 | 3.79 | 2.93 | | | | 2.93 | 0.69 |

Tabla 3. Constantes de afinidad de la FSH. **Gonalf** FSH recombinante cuatro sitios de glicosilación, **eFSH** FSH equina con cuatro sitios de glicosilación, **FSH21** FSH con tres sitios de glicosilación, **FSH24** FSH con cuatro sitios de glicosilación.

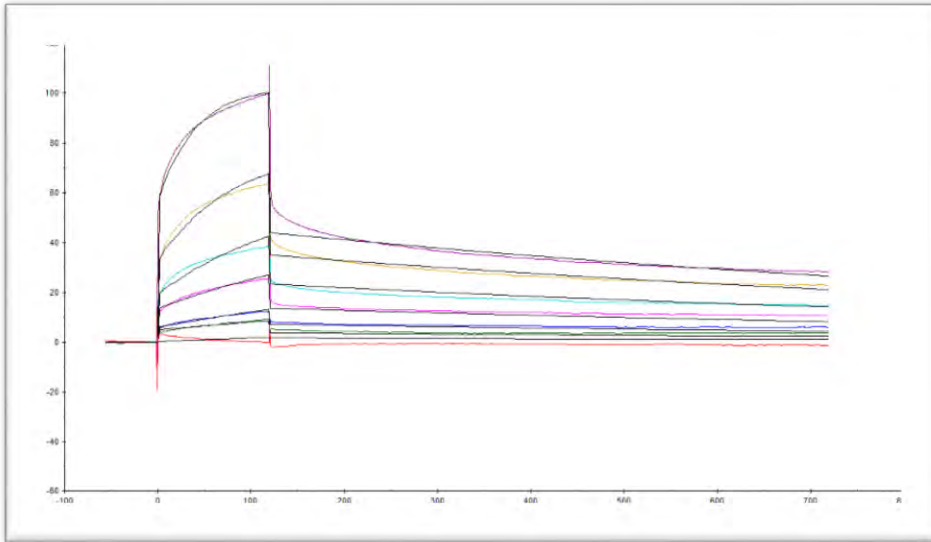
Se realizó un análisis de varianza con 'corrección' para varianzas no homogéneas. Posteriormente se aplicó una prueba pos-hoc (Tukey-Kramer) para corregir por la diferencias entre tamaños de muestra.

Resultado: Existen diferencias significativas en las constantes de afinidad [nM] entre las diferentes preparaciones de FSH ($F_{3,7.1} = 24.503$, $P = 0.0003834$) como se puede apreciar en la gráfica 1.



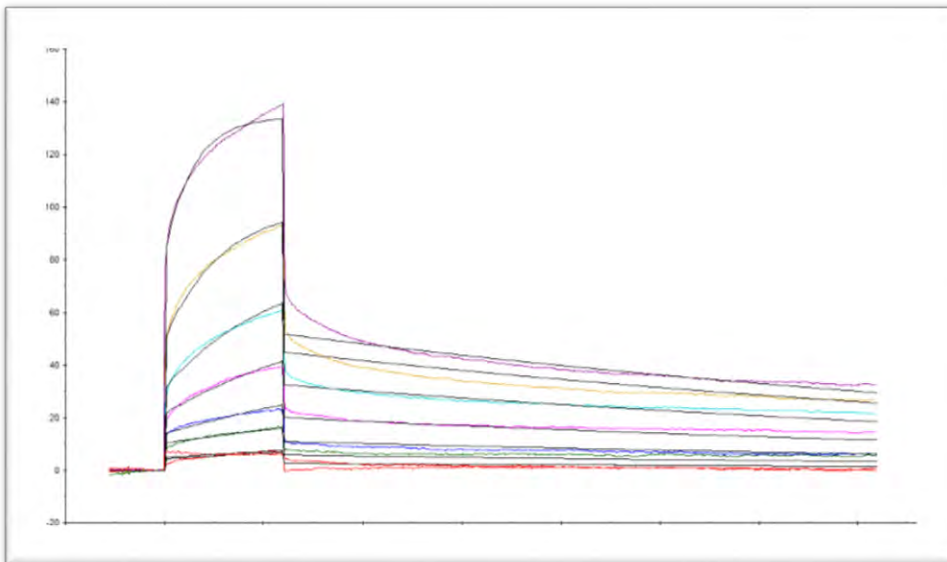
Gráfica 1. Se observa las constantes de afinidad de las cuatro diferentes preparaciones hormonales de forma comparativa en concentración [nM], letras iguales representa que no existe diferencia significativa entre ellas, como es el caso de la FSH21 y la FSH24. y que si existe diferencia significativa en las muestras con letras diferentes con respecto a las demás muestras, en total se encontraron tres grupos que son diferentes entre sí estadísticamente.

Se realizó en análisis de las constantes e afinidad obteniendo los siguientes sensogramas de cada preparación como se puede apreciar de la gráfica 2 a 5, la primera parte del sensograma corresponde al proceso de unión de la hormona a su ligando y la segunda parte corresponde al proceso de separación de la hormona con su ligando.

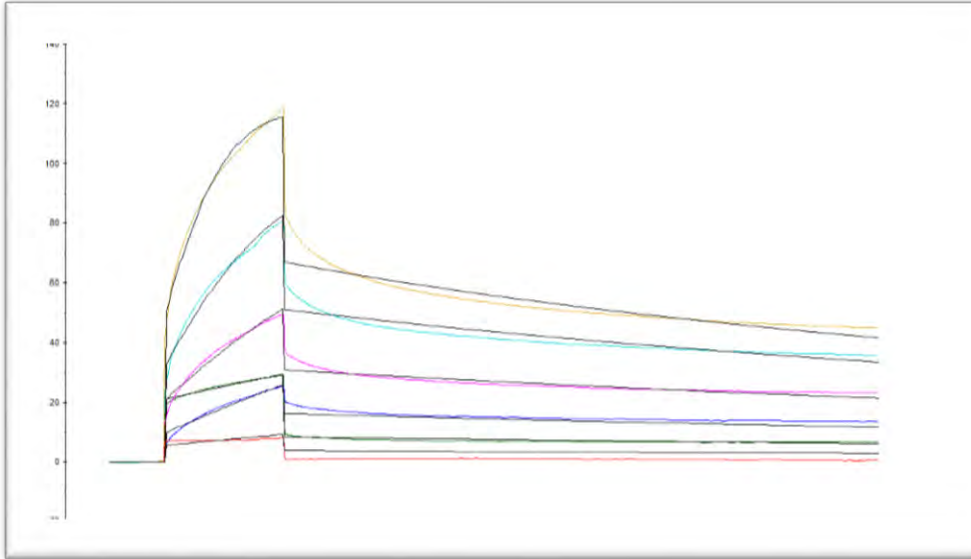


Gráfica 2. Sensograma de la preparación triglicosilada de la hormona folículo estimulante o FSH21 obtenida del equipo Biacore T200 donde se representa las diferentes concentraciones de la hormona corridas en el experimento con concentraciones de 37.5 a 1.17 nM medidas en unidades de resonancia contra el tiempo. Figura representativa de los experimentos.

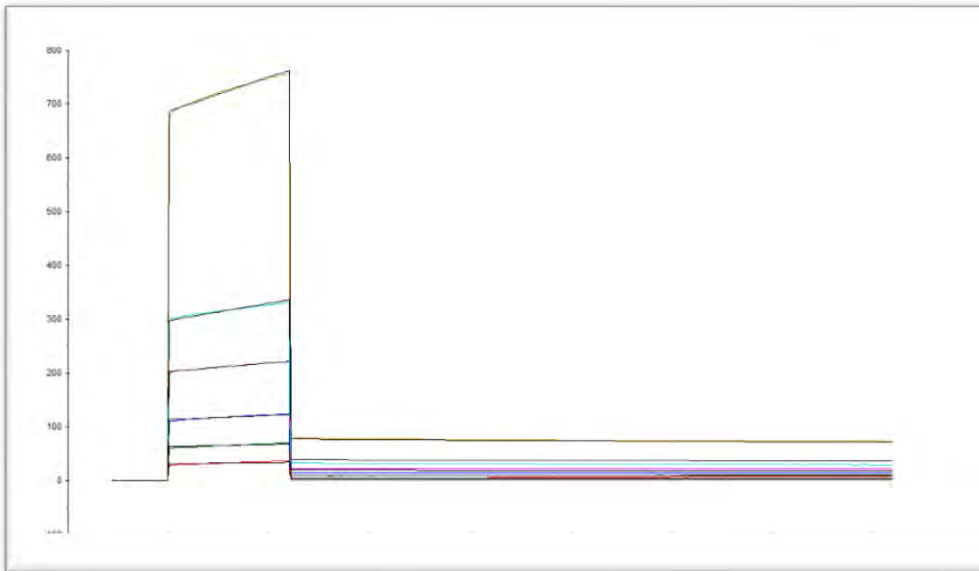
1



Gráfica 3. Sensograma de la preparación tetraglicosilada de la hormona folículo estimulante o FSH24 obtenida del equipo Biacore T200 donde se representa las diferentes concentraciones de la hormona corridas en el experimento con concentraciones de 37.5 a 1.17 nM medidas en unidades de resonancia contra el tiempo. Figura representativa de los experimentos.



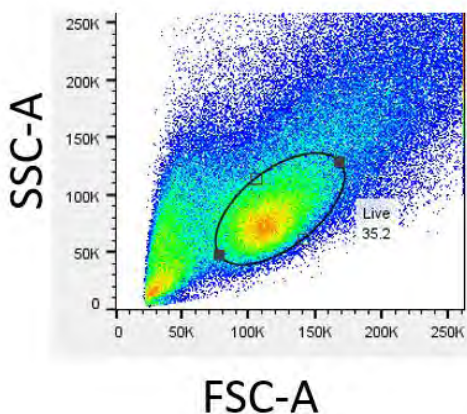
Gráfica 4. Sensograma de la preparación equina de la hormona folículo estimulante o eFSH obtenida del equipo Biacore T200 donde se representa las diferentes concentraciones de la hormona corridas en el experimento con concentraciones de 37.5 a 1.17 nM medidas en unidades de resonancia contra el tiempo. Figura representativa de los experimentos.



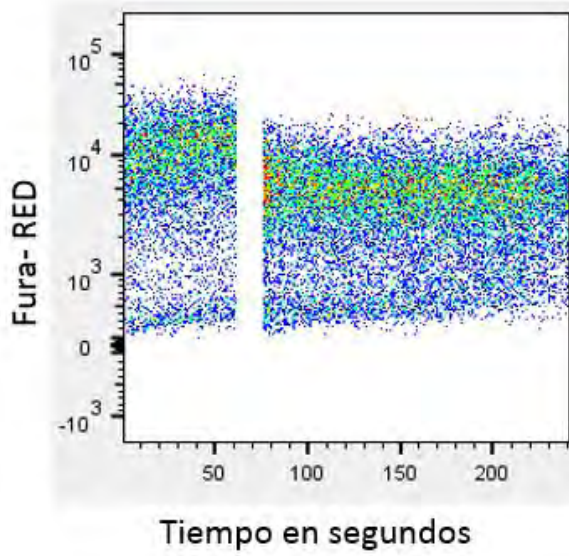
Gráfica 5. Sensograma de la preparación recombinante de la hormona folículo estimulante o Gonalf obtenida del equipo Biacore T200 donde se representa las diferentes concentraciones de la hormona corridas en el experimento con concentraciones de 37.5 a 1.17 nM medidas en unidades de resonancia contra el tiempo. Figura representativa de los experimentos.

5.2 Resultados de medición de calcio intracelular

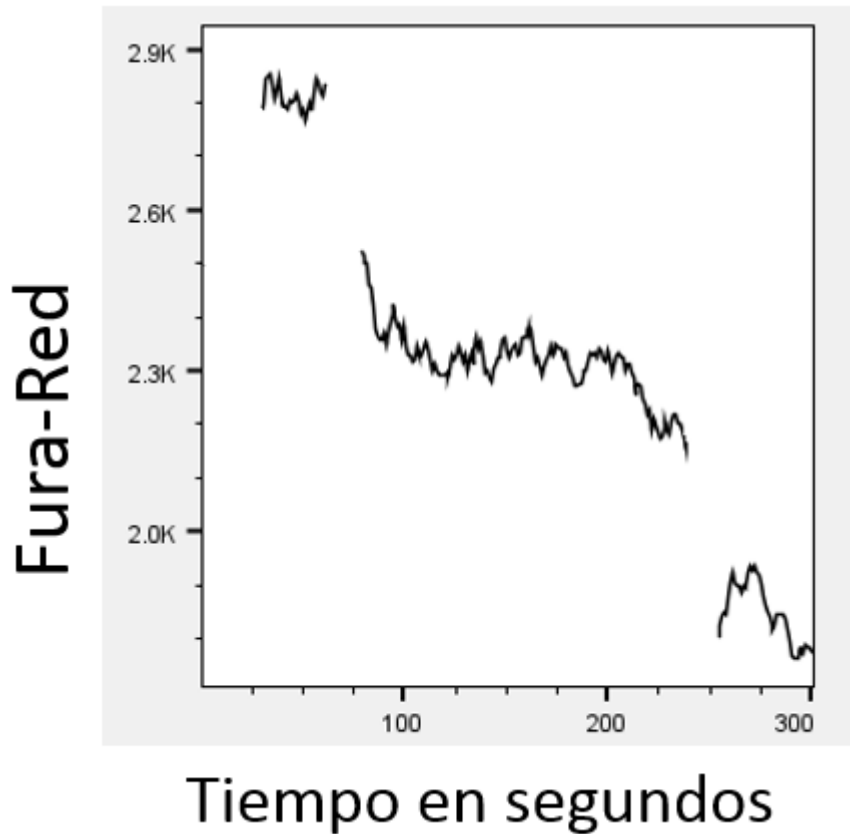
La medición del calcio intracelular inducida por la estimulación con las cuatro diferentes preparaciones de la hormona folículo estimulante se realizó por medio de citometría de flujo con un citómetro de flujo BD LSRFortessa haciendo una cinética de fluorescencia contra el tiempo. El colorante preincubado en la célula al existir una liberación de calcio intracelular el colorante lo captura generando una disminución en la fluorescencia del mismo siendo directamente proporcional, a mayor liberación de calcio intracelular mayor la disminución en su fluorescencia y viceversa como se muestra en la gráfica 7 y 8. Se utilizó la TSH como control negativo. Las células Hek293 al no tener el receptor para la TSH no se generó ninguna respuesta. Como control positivo se utilizó ionomicina que es un ionóforo de calcio hidrofóbico, que se intercala en la bicapa lipídica de la membrana celular y aumenta la permeabilidad del Ca^{2+} . [85] Permitiendo la entrada de calcio extracelular dando una respuesta máxima.



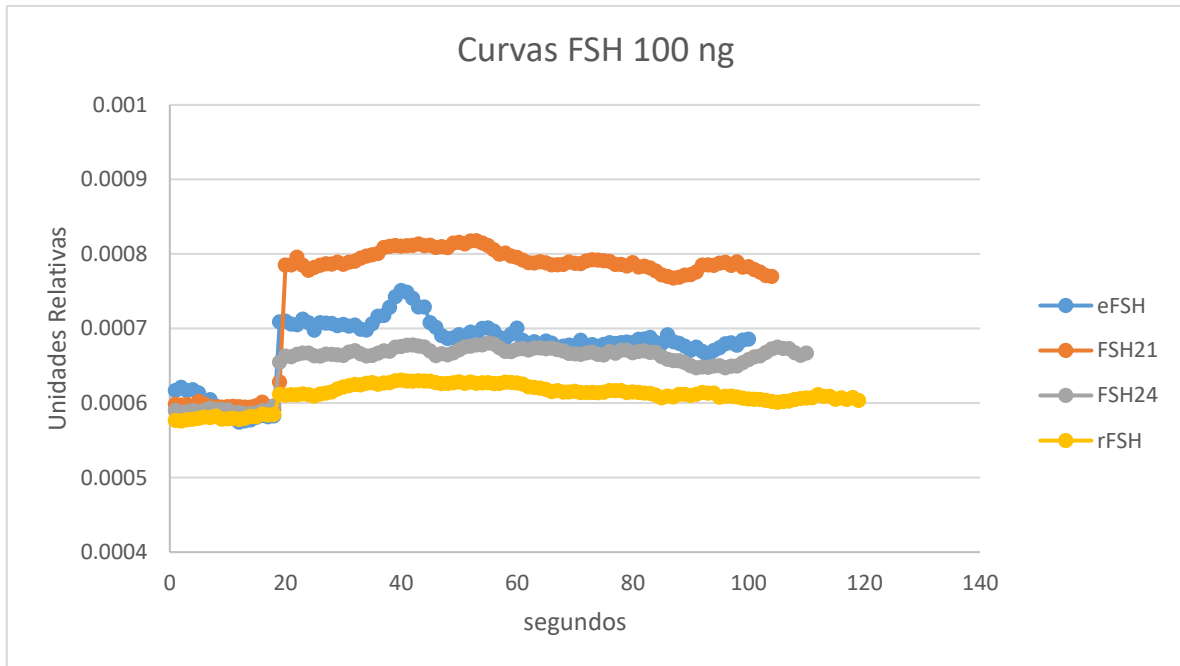
Gráfica 6. Dot plot de forward Scatter (FS) que mide el diámetro celular contra Side scatter (SC) que mide granularidad cada punto representa una sola célula analizada por el citómetro de flujo. La posición característica de cada población celular está determinada por el tamaño celular y su granulosidad. Para el presente estudio se seleccionó la población que se encuentra encerrada la cual representa una población celular de células vivas como se muestra en la figura. Gráfica representativa de los experimentos.



Gráfica 7. Cinética de intensidad del fluorocromo contra el tiempo, el espacio que se muestra representa el estímulo hormonal y posteriormente sucede la caída en la intensidad que representa la liberación de calcio intracelular. Gráfica representativa de los experimentos.



Gráfica 8. Cinética de intensidad del fluorocromo contra el tiempo analizado en el software FlowJo, el primer corte en la gráfica representa el estímulo hormonal con las posterior caída en la señal representando la liberación de calcio intracelular inducida por la hormona, la segunda interrupción corresponde a un control interno para verificar la viabilidad celular con ionomicina diluida en cloruro de calcio. Este control interno se utilizó en todos los experimentos. Gráfica representativa de los experimentos.



Gráfica 9.

Se muestra el inverso de la disminución de fluorescencia emitida por el colorante Fura-Red® que al ser liberado el calcio de la manera intracelular inducida por las cuatro diferentes preparaciones hormonales se une al colorante lo cual provoca una disminución en la fluorescencia de colorante graficado contra el tiempo. Gráfica representativa de los experimentos.

6. Discusión

La constante de afinidad en farmacología es un término de gran importancia ya que determina la capacidad que tiene un ligando de unirse a su receptor y puede o no ser un reflejo de su acción farmacológica que es el cambio específico que provoca el fármaco y su efecto farmacológico.

Sin embargo, la unión de la hormona al receptor es el primer peldaño para la obtención de una serie de respuestas, esta unión puede provocar cambios conformacionales en la molécula del receptor que puede o no permitir la asociación con un transductor de señal. Esto último depende de diversas características estructurales del ligando, incluyendo la flexibilidad de la molécula para acoplarse a la molécula del receptor. Para el caso particular de la FSH al ser una hormona glicoproteica posee grandes residuos de carbohidratos que le confieren a la hormona diversas características como flexibilidad, rigidez, y vida media plasmática entre otros (imagen 1), al tener una gran cantidad de carbohidratos podría a generar un impedimento estérico provocando que el sitio activo de la hormona tenga dificultad para su correcta interacción con el receptor.

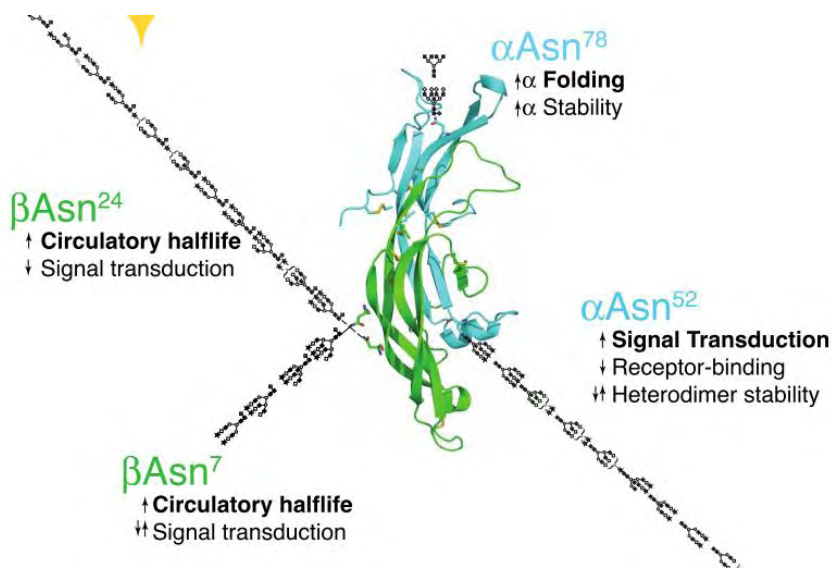


Imagen 1. Características hormonales conferidas por sus sitios de glicosilación [92]

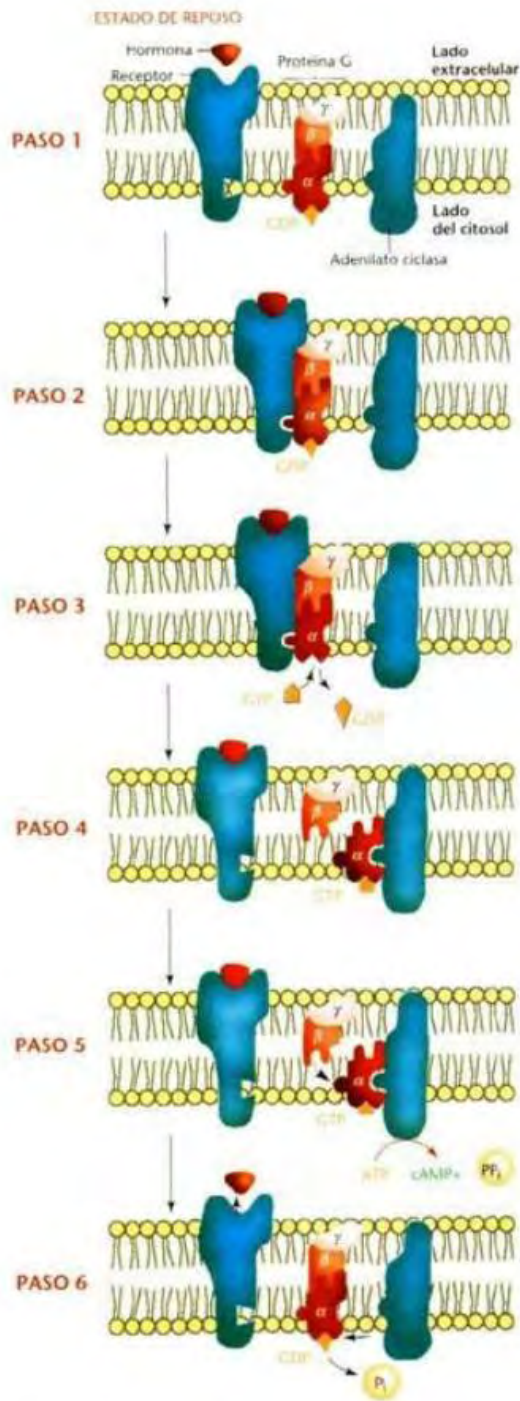


Imagen 2. Activación de la adenilato ciclasa por unión de la hormona a su receptor. [84]

La hormona al unirse a receptor en la membrana (Paso 1) provoca un cambio conformacional en el receptor que deja expuesto un sitio para la fijación de proteína $G\alpha$ (Paso 2); la proteína G puede ser tanto estimuladora, G_s , como inhibidora, G_i , dependiendo del efecto final sobre la actividad de la adenilato ciclasa; el receptor interacciona con la proteína $G\alpha$ permitiendo que la subunidad intercambie el GDP unido por GTP (Paso 3); la disociación de GDP provoca la separación entre la subunidad α y la subunidad β/γ de la proteína G con lo que en la superficie de la subunidad α de la proteína G se origina un sitio de unión para la interacción con la adenilato ciclasa (Paso 4); la subunidad α se une a la adenilato ciclasa y activa el centro catalítico, de modo que el ATP es convertido en cAMP (Paso 5); el GTP se hidroliza a GDP por la actividad de GTPasa intrínseca de la subunidad α , devolviéndola a su conformación original y permitiendo de nuevo su interacción con la subunidad β/γ (Paso 6); el GDP se asocia con la subunidad α y el sistema retorna al estado no estimulado en espera de otro ciclo de actividad.

Es importante destacar las pruebas que sugieren que los complejos β/γ pueden desempeñar funciones importantes en la regulación de determinados factores, incluida la adenilato ciclasa. La importancia de la

señalización de calcio intracelular ha sido bien demostrada en muchos sistemas biológicos. Sin embargo, en el caso de la FSHR, se ha prestado poca atención a esta potencialmente importante vía. [84]

En este sentido, se ha demostrado que la exposición de FSH a células de la granulosa porcina o a células de Sertoli de rata da como resultado un rápido aumento en concentraciones intracelulares de Ca^{2+} y que este aumento puede ocurrir de forma dependiente o independiente de cAMP [78, 79, 80]. En el primer caso, el AMPc parece aumentar el calcio intracelular mediante la movilización de calcio intracelular, un efecto que podría estar mediado por la estimulación de AMPc de la fosfolipasa $C\epsilon$, mientras que en el segundo caso, diferentes proteínas G o el heterodímero β/γ de G α s podrían estar involucrados.[81]. En este sentido se ha demostrado recientemente que la FSH incrementa el Ca^{2+} en células de Sertoli en rata mediado por una diferente vía de señalización, la proteína G α h/PLC- δ 1-inositol 1,4,5 -trifosfato (IP3) que es independiente de la liberación de Ca^{2+} intracelular y que ocurre a través de los canales T, o a través de la vía Gq/11-IP3 [82]. Cualquiera que sea el mecanismo involucrado en el incremento de Ca^{2+} dependiente de FSH parece ser importante para la diferenciación funcional de células de la granulosa. [83]

El proceso de transducción de señal afecta a una secuencia de reacciones bioquímicas dentro de la célula que se lleva a cabo a través de enzimas unidas a otras sustancias llamadas segundos mensajeros. Cada proceso se realiza en intervalos de tiempo muy pequeños, como milisegundos, o en periodos más largos como algunos segundos.

En muchos procesos de transducción de señales se implican cada vez más un número creciente de enzimas y factores desde el inicio del estímulo, el cual parte desde la unión de un ligando al receptor de membrana, hasta la activación del receptor, que convierte el estímulo en respuesta, la cual, dentro de la célula, provoca una cadena de eventos (cascada de señalización o ruta del segundo mensajero) cuyo resultado es la amplificación de la señal, es decir, que un pequeño estímulo

provoca una gran respuesta celular por lo cual el análisis de calcio como segundo mensajero es de gran importancia y puede ser excelente parámetro para medir su acción farmacológica. Las respuestas desencadenadas por las señales de transducción incluyen la regulación de la activación de genes, la regulación de una vía metabólica como la producción de hormonas por medio del metabolismo o la maduración celular.

La activación de genes provoca un sinúmero de efectos, desde la expresión de genes en proteínas, muchas de las cuales son enzimas, hasta la activación de factores de transcripción u otras proteínas reguladoras de la actividad metabólica. Debido a que los factores de transcripción pueden activar aún más genes, un estímulo inicial puede activar a través de la transducción de señales la expresión de una gama entera de genes y una gran diversidad de eventos fisiológicos. Tal conjunto de activación a menudo se llama programa genético. Un ejemplo de programa genético es la secuencia de eventos que tiene lugar cuando el óvulo es fecundado por un espermatozoide.

En la presente tesis, se compararon las cuatro diferentes preparaciones de FSH y se midieron las diferencias en sus acciones farmacológicas por medio del calcio como segundo mensajero.

Se encontró que la preparación triglicosilada de la FSH estimuló una mayor liberación de calcio con respecto a las demás. Este efecto se correlacionó con su alta constante de afinidad, ya que al estar hipoglicosilada evita un impedimento estérico generando una correcta interacción con su receptor, la cual es necesaria para su activación y la generación de un adecuado cambio conformacional para la transducción de la señal, lo cual implicaría que esta hormona estuviera ejerciendo agonismo preferencial hacia la liberación de calcio ya que en la literatura se informa que la preparación equina es la más potente en términos de AMPc pero no así en calcio. En la literatura se reporta que la FSH21 es significativamente más eficaz que la FSH24 en la estimulación de la acumulación de AMPc, [87]

El aumento de la señalización de la PKA en respuesta a FSH 21 se asoció con el aumento de la actividad biológica evidenciada por el aumento en la síntesis de

estrógenos y progesterona. La observación de que FSH21 tiene mayor actividad biológica que la FSH24 es muy relevante ya que los niveles circulantes de FSH en mujeres premenopáusicas rara vez exceden 3 a 3,5 ng/mL FSH. Es importante destacar que la isoforma de la FSH producida en mujeres jóvenes es predominantemente la hipoglicosilada [89, 90].

Esto demuestra el impacto potencial del efecto natural de la edad en las isoformas de la FSH y en los eventos de señalización mediados por receptor de FSH en las células de la granulosa [91].

Sin embargo, la eFSH siguió a FSH21 en cuanto a su potencia para la liberación de calcio intracelular con respecto a las cuatro preparaciones, lo cual demuestra que es una preparación con una elevada acción farmacológica, aunado a que es la preparación más potente en términos de AMPc y fue la hormona que presentó una mayor constante de afinidad.

Para la preparación recombinante se encontró que esta forma de la FSH es la que libera la menor cantidad de calcio intracelular sin embargo, es la segunda en potencia en términos de AMPc y además tiene la menor constante de afinidad. Esto podría deberse a que es una preparación con 4 cadenas de oligosacáridos así como con diferencias en su microheterogeneidad, lo cual posiblemente le confiere una disminución en la constante de afinidad por impedimento estérico y la posibilidad de que el receptor preferencialmente active al AMPc lo cual estaría indicando un agonismo selectivo para esta vía de señalización.

Aunque no se encontró una diferencia significativa en las constantes de afinidad de las preparaciones 21 y 24, se conoce que la FSH21 es mucho más potente biológicamente que la FSH24, diferencia que radica posiblemente en sus diferentes sitios de glicación, lo cual le confiere mayor flexibilidad para unirse al receptor y activarlo.

La eFSH fue la que presentó una mayor constante de afinidad lo que indica que al tener un patrón de glicación diferente a las totalmente glicosiladas pudiera estar interaccionando de forma más efectiva con su sitio de unión.

7. Conclusiones

A. Se encontró que el orden de las constantes de afinidad de mayor a menor fueron las siguientes: eFSH con 1.38 nM, FSH24 con 2.93 nM seguida de la FSH21 3.20 nM y al final la FSH recombinante humana con 8.43 nM, sin encontrar diferencia significativa entre las preparaciones FSH21 y FSH24,

B. Se encontró que el orden en la liberación de calcio intracelular inducido por las diferentes preparaciones fue el siguiente: FSH 21> eFSH> FSH24> 24 y al final la preparación recombinante por lo tanto se deduce que la de mayor actividad biológica es la FSH21.

Está claro que el concepto de agonismo selectivo es de gran importancia farmacéutica y estos resultados podrían contribuir a la demostración de que dependiendo de su glicosilación la FSH puede inducir de forma preferencial diferentes vías de señalización.

8. Referencias

1. Ulloa-Aguirre A. , Timossi C. *Reprod Biomed Online*, 2000; 1:48-62.
2. Ulloa-Aguirre A., Zarinan T., Dias J.A. , Conn P.M. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:411- 23.
3. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Gotschall R.R., Baker V.L. , Moore W.T. *Mol Cell Endocrinol*, 1996; 125:3-19.
4. Ulloa-Aguirre A. , Timossi C. *Hum Reprod Update*, 1998; 4:260-83.
5. Dias J.A., Cohen B.D., Lindau-Shepard B., Nechamen C.A., Peterson A.J. , Schmidt A. *Vitam Horm*, 2002; 64:249-322
6. Ulloa-Aguirre A., Midgley A.R., Jr., Beitins I.Z. , Padmanabhan V. *Endocr Rev*, 1995; 16:765-87.
8. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Damian-Matsumura P. , Dias J.A. *Endocrine*, 1999; 11:205- 15.
10. Ulloa-Aguirre A., Timossi C., Barrios-de-Tomasi J., Maldonado A. , Nayudu P. *Biol Reprod*, 2003; 69:379-89.
11. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Walton W.J., Nguyen V.T., Huneidi J., Singh V., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2007; 260-262:40-8.
12. Barrios-De-Tomasi J., Timossi C., Merchant H., Quintanar A., Avalos J.M., Andersen C.Y., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2002; 186:189-98.
13. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Butnev V.Y., Nguyen V.T., Gray C.M., Dias J.A., et al. *Biochemistry*, 2004; 43:10817-33.
14. Barrios-de-Tomasi J., Nayudu P.L., Brehm R., Heistermann M., Zarinan T. , Ulloa-Aguirre A. *Reprod Biomed Online*, 2006; 12:428-41.
15. Blithe D.L. *J Biol Chem*, 1990; 265:21951-6.
16. Bishop L.A., Robertson D.M., Cahir N. , Schofield P.R. *Mol Endocrinol*, 1994; 8:722-31.
17. Bishop L.A., Nguyen T.V. , Schofield P.R. *Endocrinology*, 1995; 136:2635-40.
18. Blithe D.L. , Iles R.K. *Endocrinology*, 1995; 136:903-10
19. Ulloa-Aguirre A. , Conn P.M., G protein-coupled receptors and the G protein family, in *Handbook of Physiology-Endocrinology: Section 7, Cellular Endocrinology*, P.M. Conn, Editor 1998, Oxford University Press: New York, USA. p. 87-141

20. Ulloa-Aguirre A., Zarinan T., Pasapera A.M., Casas-Gonzalez P. , Dias J.A. *Endocrine*, 2008; 32:251-63.
21. Uribe A., Zarinan T., Perez-Solis M.A., Gutierrez-Sagal R., Jardon-Valadez E., Pineiro A., et al. *Biol. Reprod.*, 2008; 78:869-82.
22. Ulloa-Aguirre A., Crepieux P., Poupon A., Maurel M.C. , Reiter E. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011; 12:259-74.
23. Jiang X., Liu H., Chen X., Chen P.H., Fischer D., Sriraman V., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109:12491-6.
24. Jiang X., Dias J.A. , He X. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:424-51.
25. Vassart G., Pardo L. , Costagliola S. *Trends Biochem Sci*, 2004; 29:119-26.
26. Ulloa-Aguirre A., Reiter E., Bousfield G., Dias J.A. , Huhtaniemi I. *Adv Pharmacol*, 2014; 70:37-80.
27. Gonzalez-Robayna I.J., Falender A.E., Ochsner S., Firestone G.L. , Richards J.S. *Mol Endocrinol*, 2000; 14:1283-300.
28. Richards J.S., Russell D.L., Ochsner S., Hsieh M., Doyle K.H., Falender A.E., et al. *Recent Prog Horm Res*, 2002; 57:195-220.
29. Musnier A., Heitzler D., Boulo T., Tesseraud S., Durand G., Lecureuil C., et al. *Cell Mol Life Sci*, 2009; 66:3487-503.
30. Musnier A., Blanchot B., Reiter E. , Crepieux P. *Cell Signal*, 2010; 22:707-16.
31. Kobilka B.K. *Biochim Biophys Acta*, 2007; 1768:794-807.
32. Kobilka B.K. , Deupi X. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:397-406.
33. Urban J.D., Clarke W.P., von Zastrow M., Nichols D.E., Kobilka B., Weinstein H., et al. *J Pharmacol Exp Ther*, 2007; 320:1-13.
34. Timossi C.M., Barrios de Tomasi J., Zambrano E., Gonzalez R. , Ulloa-Aguirre A. *Neuroendocrinology*, 1998; 67:153-63.
35. Timossi C.M., Barrios-de-Tomasi J., Gonzalez-Suarez R., Arranz M.C., Padmanabhan V.,

- Conn P.M., et al. *J Endocrinol*, 2000; 165:193-205.
36. Bousfield G.R. , Dias J.A. *Rev Endocr Metab Disord*, 2011; 12:289-302.
37. Bousfield G.R., Butnev V.Y., Butnev V.Y., Hiromasa Y., Harvey D.J. , May J.V. *Mol Cell Endocrinol*, 2014; 382:989-97.
38. Walton W.J., Nguyen V.T., Butnev V.Y., Singh V., Moore W.T. , Bousfield G.R. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001; 86:3675-85.
40. Fan Q.R. , Hendrickson W.A. *Nature*, 2005; 433:269-77.
41. Damian-Matsumura P., Zaga V., Maldonado A., Sanchez-Hernandez C., Timossi C. , Ulloa-Aguirre A. *J Mol Endocrinol*, 1999; 23:153-65.
42. Zambrano E., Olivares A., Mendez J.P., Guerrero L., Diaz-Cueto L., Veldhuis J.D., et al. *J Clin Endocrinol Metab*, 1995; 80:1647-56.
43. Timossi C., Damian-Matsumura P., Dominguez-Gonzalez A. , Ulloa-Aguirre A. *Mol Hum Reprod*, 1998; 4:1032-8.
44. Verboost P., Sloot W.N., Rose U.M., de Leeuw R., Hanssen R.G. , Verheijden G.F. *Eur J Pharmacol*, 2011; 651:227-33.
45. Daya S. *Fertil Steril*, 2002; 77:711-4.
46. Andersen C.Y., Westergaard L.G. , van Wely M. *Reprod Biomed Online*, 2004; 9:231-6.
47. Lispi M., Bassett R., Crisci C., Mancinelli M., Martelli F., Ceccarelli D., et al. *Reprod Biomed Online*, 2006; 13:179-93.
48. Robinson L.J., Tourkova I., Wang Y., Sharrow A.C., Landau M.S., Yaroslavskiy B.B., et al. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010; 394:12-7.
49. Zhu L.L., Blair H., Cao J., Yuen T., Latif R., Guo L., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2012; 109:14574-9.
50. Radu A., Pichon C., Camparo P., Antoine M., Allory Y., Couvelard A., et al. *N Engl J Med*, 2010; 363:1621-30.
51. Choi J.H., Wong A.S., Huang H.F. , Leung P.C. *Endocr Rev*, 2007; 28:440-61.
52. Leung P.C. , Choi J.H. *Hum Reprod Update*, 2007; 13:143-62.
53. Galandrin S., Oligny-Longpre G. , Bouvier M. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:423-30.
54. Mailman R.B. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:390-6.
55. Violin J.D. , Lefkowitz R.J. *Trends Pharmacol Sci*, 2007; 28:416-22.

56. Andresen B.T. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets*, 2011; 11:92-8.
57. Richards J.S. *Endocrinology*, 2001; 142:2184-93.
58. Xu F., Stouffer R.L., Muller J., Hennebold J.D., Wright J.W., Bahar A., et al. *Mol Hum Reprod*, 2011; 17:152-65.
62. Yerushalmi G.M., Salmon-Divon M., Yung Y., Maman E., Kedem A., Ophir L., et al. *Mol Hum Reprod*, 2014; 20:719-35.
63. Tranchant T., Durand G., Gauthier C., Crepieux P., Ulloa-Aguirre A., Royere D., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2011; 331:109-18.
64. Casas-Gonzalez P., Scaglia H.E., Perez-Solis M.A., Durand G., Scaglia J., Zarinan T., et al. *Mol Cell Endocrinol*, 2012; 364:71-82.
65. Reiter E., Ahn S., Shukla A.K. , Lefkowitz R.J. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012;52:179-97.
66. Gonzalez-Maeso J., Yuen T., Ebersole B.J., Wurmbach E., Lira A., Zhou M., et al. *J Neurosci*, 2003; 23:8836-43.
67. Sternini C., Spann M., Anton B., Keith D.E., Jr., Bunnett N.W., von Zastrow M., et al. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996; 93:9241-6.
68. Keith D.E., Anton B., Murray S.R., Zaki P.A., Chu P.C., Lissin D.V., et al. *Mol Pharmacol*, 1998; 53:377-84.
69. Benovic J.L., Staniszewski C., Mayor F., Jr., Caron M.G. , Lefkowitz R.J. *J Biol Chem*, 1988; 263:3893-7.
70. Barak L.S., Oakley R.H., Laporte S.A. , Caron M.G. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2001; 98:93-8.
71. Wehbi V., Tranchant T., Durand G., Musnier A., Decourtye J., Piketty V., et al. *Mol Endocrinol*, 2010; 24:561-73
72. Biacore AB BIACORE Technology Handbook. (1998).
73. Wear, M. & Bruce, S. (2016). SPR - Surface Generation. Ctc.bio.ed.ac.uk. Retrieved 30 June 2016, from [http://ctcb.bio.ed.ac.uk/CTCB/SPR - Surface Generation and Results.html](http://ctcb.bio.ed.ac.uk/CTCB/SPR_-_Surface_Generation_and_Results.html)
74. Rich, R.L. and D.G. Myszka, Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, 2002. 15(6): p. 352-376.
75. Rich, R.L. and D.G. Myszka, Survey of the year 2000 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition*, 2001. 14(5): p. 273-294.

76. Jung, L.S., et al., SPR Measurements of Binding and Disassociation of Wild-Type and Mutant Streptavidin on Mixed Biotin-Containing Alkyl-Thiolate Monolayers. *Sensors and Actuators B*, 1999. 54: p. 137-144.
77. Xia, N., et al., A Streptavidin Linker Layer that Functions after Drying,. *Langmuir*, subm.
78. Y.F. Lin, M.J. Tseng, H.L. Hsu, Y.W. Wu, Y.H. Lee, Y.H. Tsai, *Mol. Endocrinol.* 20, 2514–2527 (2006)
79. . P. Grasso, L.E. Reichert Jr., *Endocrinology* 125, 3029–3036 (1989)
80. C.L. Dahia, A.J. Rao, *Mol. Cell. Endocrinol.* 247, 73–81 (2006)
- 81 M. Conti, *Biol. Reprod.* 67, 1653–1661 (2002)
- 82 . Y.F. Lin, M.J. Tseng, H.L. Hsu, Y.W. Wu, Y.H. Lee, Y.H. Tsai, *Mol. Endocrinol.* 20, 2514–2527 (2006)
- 83 F.C. Jayes, R.N. Day, J.C. Garmey, R.J. Urban, G. Zhang, J.D. Veldhuis, *Endocrinology* 141, 2377–2384 (2000)
- 84 Parekh, A. and Penner, R. (1997) Store depletion and calcium influx. *American Physiological Society.*, 77, 902-924.
- 85 Elzi, D. J., Bjornsen, A. J. Kenzie, T. M., Wyman, T. H. and Silliman, C. C. (2001) Ionomycin causes activation of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinases in human neutrophils. *Am J Physiol Cell Physiol.*, 281, C350-C360.
- 86 Brandan, N., Llanos, C., & Miño, C. *Receptores Hormonales* (1st ed., pp. 10-14). Montevideo. Retrieved from <http://www.uaz.edu.mx/histo/Biologia/FaiUnneAr/Pdf/receptor.pdf>
- 87 Gonzalez GA, Montminy MR. Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell.* 1989;59(4):675–680.
- 88 Hale GE, Robertson DM, Burger HG. The perimenopausal woman: endocrinology and management. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2014;142:121–131.
- 89 Bousfield GR, Butnev VY, Walton WJ, Nguyen VT, Huneidi J, Singh V, Kolli VS, Harvey DJ, Rance NE. All-or-none N-glycosylation in primate follicle-stimulating hormone beta-subunits. *Mol Cell Endocrinol.* 2007;260–262:40–48
- 90 Bousfield GR BV, Rueda-Santos MA, Brown A, Smalter Hall A, and Harvey DJ. Macro and Micro Heterogeneity in Pituitary and Urinary Follicle Stimulating Hormone Glycosylation. *J Glycomics Lipidomics.* 2014;4:125

- 91 Hypoglycosylated hFSH Has Greater Bioactivity Than Fully Glycosylated Recombinant hFSH in Human Granulosa Cells. Available from: https://www.researchgate.net/publication/275525401_Hypoglycosylated_hFSH_Has_Greater_Bioactivity_Than_Fully_Glycosylated_Recombinant_hFSH_in_Human_Granulosa_Cells [accessed Aug 3, 2016].
- 92 Bousfield, G. R. (2015). Influence of glycans on biological activities of pituitary gonadotropins, follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone. *Journal of Glycobiology*, 03(03). doi:10.4172/2168-958x.s1.002
- 93 Waldman, S. (2016). *Interacciones fármaco-receptor*. 1st ed. Editorial Manuel Moderno, p.http://www.manualmoderno.com/descargas_gratuitas/01_waldman.pdf.
- 94 Novel Pathways in gonadotropin receptor signaling and biased agonism" publicaa en *Rev. Endocr Metab Disord* (2011) 12:259-274